

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.443>

<https://orcid.org/0000-0001-8568-0516>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Milda Narmontė

Didelės skiriamosios gebos
genominio 5-hidroksimetilcitozino
nustatymo metodas ir jo pritaikymas
epigenetiniams žmogaus ligų tyrimams

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
biochemija (N 004)

VILNIUS 2023

Disertacija rengta 2016-2020 metais studijuojant doktorantūroje Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos institute. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (stipendija už akademinis pasiekimus).

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinė konsultantė – dr. Edita Kriukienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Saulius Serva (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Nariai:

prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Nacionalinis vėžio institutas, gamtos mokslai, biologija, N 010),

prof. dr. Rolandas Meškys (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004),

prof. dr. Artūras Petronis (Toronto universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004),

dr. Gintautas Tamulaitis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2023 m. kovo mėn. 9 d. 13 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R-401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, R-401 auditorija, Vilnius, Lietuva, tel. +37052234419; el. paštas info@gmc.vu.lt

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.443>

<https://orcid.org/0000-0001-8568-0516>

VILNIUS UNIVERSITY

Milda Narmontė

Method for high-resolution
genome-wide analysis of
5-hydroxymethylcytosine and its
application for epigenetic studies of
human diseases

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2023

The dissertation was prepared between 2016 and 2020 at Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biotechnology.

The research was supported by Research Council of Lithuania (promotional scholarship).

The dissertation is defended on an external basis.

Academic consultant – Dr. Edita Kriukienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Saulius Serva (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004).

Members:

Prof. Dr. Sonata Jarmalaitė (National Cancer Institute, Natural Sciences, Biology, N 010),

Prof. Dr. Rolandas Meškys (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004),

Prof. Dr. Artūras Petronis (University of Toronto, Natural Sciences, Biochemistry, N 004),

Dr. Gintautas Tamulaitis (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 1 pm on 9th March 2023 in auditorium R-401 of the Life Sciences Center, Vilnius University.

Address: Saulėtekio Ave 7, auditorium R-401, Vilnius, Lithuania

Tel. +370 52234419; e-mail: info@gmc.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

SANTRUMPOS

5caC	5-karboksicitozinas
5fC	5-formilcitozinas
5hmC	5-hidroksimetilcitozinas
5hmCG	hidroksimetilinta CG seka
5mC	5-metilcitozinas
ACE-seq	angl. APOBEC-coupled epigenetic sequencing
Ado-6-N ₃	AdoMet analogas, turintis 6-azido-2-heksinilgrupę
AdoMet	S-adenozil-L-metioninas
ADRN	adrenerginis ląstelių tipas
BGT	β -gliukoziltransferazė
BS	natrio bisulfitas, NaHSO ₃
cfDNR	laisvai cirkuliuojanti neląstelinė DNR (angl. cell-free)
CH	dinukleotidinė DNR seka, kur H – A, T arba C bazė
CMS	citozin-5-metilensulfonatas
Ct	PGR ciklo numeris, kai fluorescencija pasiekia slenkstinę vertę (angl. cycle threshold)
DBCO	dibenzociklooktinas
DEG	angl. differentially expressed gene
DEHG	angl. differentially expressed and hydroxymethylated gene
DHG	angl. differentially hydroxymethylated gene
eM.SssI	mutantinė MTazė SssI (angl. engineered MTase SssI)
EMT	epitelinė-mezenchiminė tranzicija
ESC	angl. embryonic stem cell
FA	formaldehidas
gDNR	genominė DNR
Glc	gliukozė
GO	angl. gene ontology
H3K27ac	acetilintas histono H3 27-asis lizinas
H3K27me3	trimetilintas histono H3 27-asis lizinas
H3K36me3	trimetilintas histono H3 36-asis lizinas
H3K4me1	monometilintas histono H3 4-asis lizinas
H3K4me3	trimetilintas histono H3 4-asis lizinas
H3K9me3	trimetilintas histono H3 9-asis lizinas
h-density	normalizuotas 5hmC tankis
hmTOP-seq	angl. 5hmC-specific TOP-seq
iRNR	informacinė RNR

lincRNR	ilga intergeninė nekoduojančioji RNR (angl. long intergenic non-coding)
lncRNR	ilga nekoduojančioji RNR (angl. long non-coding)
kDNR	kopijinė DNR
MES	mezenchiminis ląstelių tipas
miRNR	mažoji nekoduojančioji RNR (angl. micro)
MTazė	metiltransferazė
N ₃ -Glc	6-azido-gliukozė
NB	neuroblastoma
NHS	N-hidroksisukcinimidas
NIPT	neinvaziniai prenataliniai tyrimai
nkRNR	nekoduojančioji RNR
ODN	oligodeoksiribonukleotidas
oksi-5mC	oksiduotos 5-metilcitozino formos
PKA	principinių komponentų analizė
PMD	angl. partially methylated domain
R	replika, pakartojimas
RA	retinoinė rūgštis
REazė	restrikcijos endonukleazė
RPKM	angl. reads per kilobase per million reads mapped
T21	21-osios chromosomos trisomija
TAB-Seq	angl. TET-assisted bisulfite sequencing
TOP-seq	angl. tethered oligonucleotide-primed sequencing
uCG	nemodifikuota CG seka (angl. unmodified)
UDP-6-N ₃ -Glc	uridino difosfato 6-azido-gliukozė
uTOP-seq	angl. uCG-specific TOP-seq
UTR	angl. untranslated region
VNP	vieno nukleotido polimorfizmas

TURINYS

ĮVADAS.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1. DNR citozino epigenetinės modifikacijos.....	15
1.1.1. DNR metilinimas ir DNMT baltymai.....	15
1.1.2. Oksiduotų 5mC formų susidarymas ir TET baltymai	17
1.1.3. DNR citozino modifikacijų pasiskirstymas genome ir biologinė reikšmė	19
1.1.4. 5mC ir 5hmC genomino profiliavimo metodai	28
1.2. Neuroblastoma	38
1.2.1. Neuroblastomos apibrėžimas ir kilmė	38
1.2.2. Molekuliniai NB patogenezės mechanizmai	40
1.2.3. Neuroblastomos epigenomo pokyčiai	41
1.2.4. Neuroblastomos gydymas	43
1.2.5. NB ląstelių įvairovė.....	44
1.2.6. Hipoksija ir NB	46
1.3. Neląstelinė laisvai cirkuliuojanti DNR, jos reikšmė ir pritaikymas vaisiaus neinvaziam prenataliniam tyrimui.....	48
1.3.1. Neląstelinė DNR kraujo plazmoje.....	48
1.3.2. Vaisiaus cfDNR motinos kraujo plazmoje	49
1.3.3. Vaisiaus cfDNR panaudojimas neinvaziam prenataliniam tyrimui	51
1.3.4. Vaisiaus T21 neinvazinis prenatalinis tyrimas pagal epigenetinius biožymenis	54
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	56
2.1. Medžiagos	56
2.1.1. Reagentai.....	56
2.1.2. Fermentai ir molekulinės biologijos rinkiniai	56
2.1.3. Buferiniai ir kiti tirpalai.....	57
2.1.4. DNR oligonukleotidai	57
2.1.5. Ląstelių linijos	60
2.1.6. Išgrynintos DNR mėginiai.....	60
2.2. Metodai.....	60
2.2.1. Modelinių DNR fragmentų ruošimas PGR metodu	60

2.2.2. Modelinių DNR fragmentų 5hmC glikozilinimas	61
2.2.3. Modelinių DNR fragmentų hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis ..	61
2.2.4. ODN jungimas prie modelinių DNR fragmentų	61
2.2.5. Adapterių sulydymas	61
2.2.6. Pelės ESC gDNR hmTOP-seq bibliotekų ruošimas	62
2.2.7. TOP-seq bibliotekų amplifikavimo efektyvumo vertinimas	63
2.2.8. Neuroblastomos ląstelių kultivavimas	63
2.2.9. NB genomines DNR skyrimas	64
2.2.10. gDNR kiekybinė analizė didelio našumo skysčių chromatografijos- tandeminės masių spektrometrijos (HPLC-MS/MS) metodu	64
2.2.11. NB ląstelių gDNR hmTOP-seq bibliotekų ruošimas	64
2.2.12. NB ląstelių gDNR uTOP-seq bibliotekų ruošimas	65
2.2.13. Visuminės RNR skyrimas	65
2.2.14. Kopijinės DNR (kDNR) sintezė	65
2.2.15. DNR kiekių vertinimai tikro laiko PGR	65
2.2.16. RNR sekoskaitos bibliotekų ruošimas	66
2.2.17. Žaizdos gijimo testas	66
2.2.18. cfDNR uTOP-seq ir hmTOP-seq bibliotekų ruošimas	66
2.2.19. Regioninė uTOP-PGR	67
2.2.20. Vaisiaus kariotipo nustatymas kiekybinės PGR analize, panaudojant TOP-seq bibliotekas	67
2.2.21. Bioinformatinė analizė	68
3. REZULTATAI	69
3.1. hmTOP-seq metodo kūrimas, validavimas ir įvertinimas pelės embrioninių kamieninių ląstelių viso genomo 5hmC analizėje	69
3.1.1. hmTOP-seq metodo kūrimas	69
3.1.2. hmTOP-seq metodo validavimas	75
3.1.3. hmTOP-seq metodo įvertinimas pelės embrioninių kamieninių ląstelių viso genomo 5hmC analizėje	76
3.2. TOP-seq metodų taikymas epigenetiniams skirtingų neuroblastomos tipų ląstelių identiteto tyrimuose	82
3.2.1. NB ląstelių 5hmC analizė	82
3.2.2. Hipoksiniai NB ląstelių genų 5hmCG ir raiškos pokyčiai	86
3.2.3. NB tarpląstelinis skirtumų analizė	90

3.2.4. Dalinai metilintų DNR regionų analizė NB ląstelėse.....	95
3.2.5. 5hmCH sąryšis su PMD ir genų raiška.....	100
3.3. TOP-seq metodų taikymas epigenetiniam neinvaziniam prenataliam vaisiaus lyties ir 21-osios chromosomos trisomijos nustatymui	104
3.3.1. TOP-seq metodų optimizavimas darbui su cfDNR.....	105
3.3.2. Vaisiaus cfDNR analizė TOP-seq metodais.....	106
3.3.3. Vaisiaus T21 epigenetinis nustatymas sekoskaitos būdu	108
3.3.4. Regioninės uTOP-PGR metodo kūrimas.....	109
3.3.5. Vaisiaus lyties nustatymas regioninės uTOP-PGR būdu	111
3.3.6. Vaisiaus T21 epigenetinis nustatymas tikro laiko PGR analize, panaudojant TOP-seq bibliotekas.....	113
4. REZULTATŲ APTARIMAS	119
4.1. hmTOP-seq – naujas 5hmC profiliavimo metodas	119
4.2. hmTOP-seq panaudojimas multi-ominėje neuroblastomos skirtingų tipų ląstelių analizėje	122
4.3. hmTOP-seq ir uTOP-seq metodų taikymas neinvaziniams vaisiaus kariotipo tyrimams	125
IŠVADOS.....	128
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	129
PRIEDAI	154
SUMMARY OF THE DOCTORAL DISSERTATION	166
CURRICULUM VITAE	191
DISERTACIJOS RENGIMUI NAUDOTŲ PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS.....	193
PADĖKA.....	195

IVADAS

Genetinė informacija yra užkoduota DNR sekoje keturių bazių pagalba: adenino (A), citozino (C), guanino (G) ir timino (T). Epigenetinės DNR bazių modifikacijos nepakeisdamos esamos genomo sekos dalyvauja genų raiškos reguliacijoje, judriųjų genomo elementų ir X chromosomos inaktyvacijoje, genominiame imprintinge, apsprendžia ląstelių ir audinių skirtumus (Greenberg ir Bourc'his, 2019; Titcombe et al., 2022). Seniausiai žinoma ir todėl geriausiai ištirta žinduolių DNR epigenetinė modifikacija yra 5-metilcitozinas (5mC), susidarantis DNR metiltransferazėms DNMT metilinant citoziną 5-oje pozicijoje. 5mC gali būti pašalinamas aktyvaus DNR demetilinimo keliu, paremtu TET (angl. Ten-eleven translocation) šeimos baltymų vykdoma 5mC oksidacija iki 5-hidroksimetilcitozino (5hmC), 5-formilcitozino bei 5-karboksicitozino (Lio et al., 2020). 5mC yra slopinanti žymė promotoriuose ir lemia transkripcijos inaktyvaciją, o 5hmC žymi aktyvius genomo lokusus – jis aptinkamas aktyvių genų kūnuose ir stiprikluose (Skvortsova et al., 2019). Tačiau 5hmC yra ne tik aktyvaus DNR demetilinimo tarpininkas, bet ir galimai stabili, savitą epigenetinę funkciją turinti žymė (Bachman et al., 2014). Priešingai nei 5mC, kurio kiekiai panašūs visose ląstelėse, 5hmC mastas įvairiose ląstelėse yra skirtingas, pavyzdžiui, daugiausiai 5hmC aptinkama smegenų ląstelėse (Nestor et al., 2012). Dėl savo išskirtinio, audiniams būdingo kiekio ir išsidėstymo bei dar mažai ištirtos epigenetinės funkcijos, 5-hidroksimetilcitozinas yra įdomus ir svarbus epigenetinių tyrimų objektas.

Šiuo metu esamus 5-hidroksimetilcitozino tyrimo genomo mastu metodus galima suskirstyti į kelias grupes pagal 5hmC nustatymui pritaikomas chemines ar fermentines reakcijas, antikūnų panaudojimą (Zeng et al., 2019). Tačiau tik nedidelė dalis šių metodikų leidžia sudaryti 5hmC genolapius vienos bazės tikslumu. Populiariausi tokie metodai yra paremti bisulfitine konversija, kurių didelis trūkumas – DNR degradacija (Zeng et al., 2019). Taip pat svarbi šių metodų taikymo silpnybė yra didelės sekoskaitos kainos dėl nuskaitymų visų genomo sekų, net ir tokių, kuriose nėra tiriamosios 5hmC modifikacijos. Naudojant afiniškumu paremtus metodus yra nuskaitymi tik praturtinti 5hmC modifikaciją turintys DNR fragmentai, tačiau jiems būdinga maža, ~200-400 bp skiriamoji geba (Hofer et al., 2019). Mūsų tyrėjų grupė anksčiau buvo sukūrusi bisulfitinės konversijos nenaudojančią, didelės skiriamosios gebos nemodifikuotų CG sekų profiliavimo metodą uTOP-seq (angl. unmodified CG-specific tethered oligonucleotide-primed sequencing) (Staševskij et al., 2017). Todėl atsižvelgiant į esamų 5hmC profiliavimo metodų trūkumus buvo iškelta idėja sukurti uTOP-seq giminingą viso genomo

5hmC analizės metodą, pagrįstą DNR žymėjimu paremta DNR sekoskaita – hmTOP-seq (angl. 5hmC-specific TOP seq). Sėkmingai sukūrus šį metodą, siekėme jo veikimą pademonstruoti analizuojant žmogaus vėžinių ląstelių epigenetines transformacijas bei iširti epigenetinės žmogaus genetinių ligų analizės galimybes.

DNR epigenetinės modifikacijos kinta organizmų vystymosi ir ląstelių diferenciacijos metu, taip pat vystantis įvairioms patologinėms būsenoms. Pavyzdžiui, vėžiniams susirgimams būdingas lokalus DNR hipermetilinimas, lemiantis naviką slopinančių genų nutildymą, ir globalus genomo hipometilinimas, siejamas su onkogenų aktyvinimu ir genomo nestabilumu (Fetahu ir Taschner-Mandl, 2021). Įvairių tipų vėžio atvejais taip pat stebimas sumažėjęs 5hmC kiekis ir pakitęs jo pasiskirstymas genome, kuris gali būti panaudojamas kaip biožymuo šių ligų detekcijai (Yang et al., 2013; Xu ir Gao, 2020). Be to, DNR metilinimas ir hidroksimetilinimas kinta kompleksinių ligų, pavyzdžiui, Alzheimerio, atvejais ir yra susieti su neurodegeneraciniais procesais (Perkovic et al., 2021). Svarbu tai, kad pakitę DNR epigenetinių modifikacijų profiliai stebimi net esant genetinėms ligoms, pavyzdžiui, 21-osios chromosomos trisomijai – Dauno sindromui (Yu et al., 2020).

Neuroblastoma (NB) yra pediatriškas simpatinės nervų sistemos vėžys, kuriam būdinga didelė klinikinė ligos eigos variacija nuo savaime sunykstančių auglių iki plačiai metastazavusių gydymui atsparių navikų (Otte et al., 2021). Taip pat NB stebimas reikšmingas ląstelinis heterogeniškumas – NB auglio ląstelės, būdamos genetiškai vienodos, pasižymi įvairialypėmis morfologinėmis ir biocheminėmis savybėmis. NB ląstelių įvairovę yra labai svarbu suprasti, nes ji galimai nulemia NB gydymo nesėkmes dėl skirtingų ląstelių atsparumo mechanizmų (Campos Cogo et al., 2020). Be to, įvairių vėžių navikuose dažnai stebimos hipoksinės, deguonies stygiaus, zonos, kurios yra susietos su padidėjusiu vėžio agresyvumu. Hipoksija nulemia mažiau diferencijuotų NB ląstelių fenotipą ir skatina jų metastazavimą (Huertas-Castaño et al., 2020). Įdomu tai, kad mažos deguonies koncentracijos sąlygomis NB ląstelėse daugėja 5hmC ir jis buvo susietas su ląstelinio atsaku į hipoksiją (Mariani et al., 2014; Thienpont et al., 2016). Tačiau vis dar trūksta duomenų apie 5hmC genominių pasiskirstymą ir jo įtaką skirtingų NB tipų ląstelių susiformavimui. Manoma, kad NB vėžio vystymasis ir fenotipas didele dalimi yra nulemiami epigenetiniu perprogramavimu, todėl yra svarbu išanalizuoti epigenetinius NB biožymenis, nes tai gali padėti ateityje sukurti naujas terapines strategijas (Durinck ir Speleman, 2018).

Kaupiantis žinioms apie plataus masto epigenetinius pokyčius žmogaus ligų atvejais buvo iškelta idėja, kad šių pakitimų tyrimas gali būti svarbus net ir genetinių ligų diagnostikoje. Viena iš potencialių DNR epigenetinių

žymenų pritaikymo sričių yra vaisiaus neinvaziniai prenataliniai tyrimai (NIPT). Žmogaus kraujo plazmoje yra aptinkama laisvai cirkuliuojanti neląstelinė (angl. cell-free) DNR (cfDNR), susidaranti apoptozės metu iš įvairių kūno audinių, daugiausiai iš kraujo ląstelių (Moss et al., 2018). Įdomu tai, kad nėštumo atveju moters kraujyje aptinkama ne tik jos pačios, bet dar ir vaisiaus cfDNR (Dennis Lo et al., 1997). Tai suteikia galimybę atlikti neinvazinius vaisiaus DNR tyrimus. Plačiausiai vaisiaus NIPT taikomi dėl chromosomų aneuploidijos, iš kurių dažniausia yra 21-osios chromosomos trisomija – Dauno sindromas (Hui ir Bianchi, 2017). Šie tyrimai paprastai yra atliekami cfDNR visuminės ar selektyvios, tam tikrų chromosomų praturtintų DNR fragmentų, sekoskaitos būdu (Skrzypek ir Hui, 2017). Tačiau 10-21 nėštumo savaitėmis, kai yra atliekami vaisiaus kariotipo tyrimai, vaisiaus cfDNR kiekis sudaro vidutiniškai tik 10-20 % visuminės motinos kraujo plazmos cfDNR (Taglauer et al., 2014). Todėl patikimam NIPT atlikimui norima surasti ir panaudoti vaisiui specifinius epigenetinius biožymenis, pagal motinos ir vaisiaus cfDNR skirtingai metilintus regionus. Tokiai analizei jau yra pasiūlyti metodai, paremti bisulfitine konversija, DNR imunoišsodinimu ir metilinimui jautriomis restrikcijos endonukleazėmis, iš kurių pastarieji gali praturtinti vaisiaus cfDNR. Tačiau šiems metodams yra būdingi nemenki trūkumai: bisulfitas sukelia DNR degradaciją, ypač žalingą mažiems vaisiaus cfDNR kiekiams; antikūnams būdingas CG sekų tankio šališkumas (angl. bias); o restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekos apriboja analizei tinkamų genomo regionų skaičių (Papageorgiou et al., 2011, 2014). Taigi, patikimiems vaisiaus neinvaziniams prenataliniams tyrimams yra reikalingi nauji technologiniai sprendimai. Taip pat svarbu pažymėti, kad dar nėra iširtos vaisiaus kariotipo epigenetinių NIPT, paremtų 5hmC analize, galimybės, nors dėl savo specifiskumo audiniams 5hmC potencialiai galėtų būti panaudotas jautriam prenataliniam testavimui.

DARBO TIKSLAS:

Sukurti naują, ekonomišką, bisulfitinės konversijos nenaudojantį, bet didelės skiriamosios gebos 5hmC analizės metodą ir jį, kartu su nemodifikuotų CG sekų uTOP-seq sekoskaitos metodu, pritaikyti epigenetiniams tyrimams įvairiuose biologiniuose kontekstuose.

UŽDAVINIAI:

1. Sukurti naują DNR žymėjimu paremtą sekoskaitos metodą, hmTOP-seq, skirtą didelės skiriamosios gebos 5hmC analizei.
2. Įvertinti hmTOP-seq metodo veikimą pelės embrioninių kamieninių ląstelių genomineje 5hmC analizėje.
3. Panaudojant hmTOP-seq ir RNR sekoskaitos metodus nustatyti žmogaus neuroblastomos ląstelių atsaką į hipoksiją.
4. Pagal hmTOP-seq ir uTOP-seq suteikiamą epigenetinio DNR modifikavimo bei genų raiškos informaciją parodyti neuroblastomos skirtingų ląstelių identitetus.
5. Įvertinti hmTOP-seq ir uTOP-seq metodų arba juose naudojamo citozino žymėjimu paremtos DNR sintezės technologijos pritaikomumą neinvaziniam prenataliniam vaisiaus kariotipo tyrimui, nustatant vaisiaus lytį ir 21-osios chromosomos trisomiją.

MOKSLINIS NAUJUMAS:

Šiame darbe aprašytas naujo 5-hidroksimetilcitozino profiliavimo metodo hmTOP-seq sukūrimas. hmTOP-seq metodas pagrįstas DNR žymėjimu paremta sekoskaita, kaip ir mūsų grupės anksčiau sukurtas uTOP-seq metodas (Staševskij et al., 2017), skirtas nemodifikuotų CG sekų analizei. hmTOP-seq atveju, 5hmC pažymimas azido grupe glikozilinant su T4 β -gliukoziltransferaze, reakcijoje naudojant uridino difosfato 6-N₃-gliukozės (UDP-6-N₃-Glc) kofaktorių. „Click“ reakcijos metu prie 6-N₃-Glc-5hmC prijungiamas DNR oligonukleotidas ir naudojant jam komplementarų pradmenį vykdoma naujos DNR grandinės sintezė nuo žymėto 5hmC. Tuomet amplifikavus naująsias DNR grandines ir atlikus jų sekoskaitą, galima sužinoti tikslias 5hmC genomines pozicijas.

hmTOP-seq metodo privalumai buvo įrodyti analizuojant pelės embrioninių kamieninių ląstelių genomine DNR. Tyrimai pademonstravo, kad hmTOP-seq yra labai didelės, beveik vienos bazės skyros metodas, suteikiantis galimybę tyrimus atlikti plačiose (5-500 ng) pradinės DNR kiekio ribose. Naujasis metodas pasižymi specifiskumu 5hmC ir geru atsikartojamumu. Taip pat buvo parodyta aukšta hmTOP-seq koreliacija su etaloniniu bisulfitinės sekoskaitos TAB-Seq (angl. TET-assisted bisulfite sequencing) metodu, bet lyginant su juo, hmTOP-seq pasižymi dideliu pranašumu – analizės ekonomiškimu, nes yra nustatomas ne visas tiriamasis genomas, o tik DNR pozicijos, turinčios 5hmC modifikaciją, kurių paprastai genome yra labai mažas kiekis.

Panaudodami sukurtą hmTOP-seq metodą, pirmą kartą atlikome detalią multi-ominę (5hmC, transkriptomine ir nemodifikuotų CG sekų) skirtingų neuroblastomos ląstelių tipų analizę. Buvo ištirti NB ląstelių genų hidroksimetilinimo ir raiškos pokyčiai hipoksijos sąlygomis ir nustatytos jų sąsajos su ląstelių vystymosi ir diferenciacijos procesais. Šiame darbe kompleksiskai tyrėme NB tarpląstelinius skirtumus. Genų 5hmCG kiekių ir jų ryšio su genų raiška bei dalinai metilintų DNR domenų (angl. partially methylated domains, PMD) išsidėstymo duomenys parodė ne tik to paties N-tipo BE(2)-M17 ir LA1-55n ląstelių, bet ir skirtingiems tipams priskiriamų I-tipo BE(2)-C ir S-tipo LA1-5s ląstelių tarpusavio panašumus. Taip pat mūsų analizė atskleidė galimą 5hmC ir ląstelėms specifinių PMD ryšį su NB ląstelių identiteto reguliacija. Tirdami 5hmC, esančius ne CG sekose, parodėme jų reikšmę PMD slopinamų genų raiškos aktyvinimui bei BE(2)-C ir LA1-5s ląstelių specifinių genų sąsajai su aukšta NB klinicine rizika.

Taip pat šiame darbe pirmą kartą parodyta, kad hidroksimetilintų arba nemodifikuotų CG sekų analizė gali būti pritaikoma vaisiaus neinvaziam prenataliniam tyrimui, siekiant nustatyti 21-osios chromosomos trisomiją (Dauno sindromą). Iš besilaukiančių moterų kraujo plazmoje laisvai cirkuliuojančios neląstelinės DNR paruošus hmTOP-seq ir uTOP-seq bibliotekas, tiksli vaisiaus 21-osios chromosomos trisomijos detekcija galima tiek sekoskaitos, tiek plačiau mokslinėms bei klinikinėms laboratorijoms prieinamo tikro laiko PGR metodais.

GINAMIEJI TEIGINIAI:

1. Sukurtas didelės skiriamosios gebos genomino 5-hidroksimetilcitozino (5hmC) profiliavimo metodas hmTOP-seq.
2. hmTOP-seq veikimas ir patikimumas įrodytas pelės embrioninių kamieninių ląstelių DNR epigenetinėje 5hmC analizėje, duomenis lyginant su informacija, gauta kitais metodais.
3. hmTOP-seq 5hmCG ir RNR sekoskaitos duomenys leidžia įvertinti hipoksijos sąlygomis vykstančius neuroblastomos ląstelių genų aktyvumo pokyčius ir stebėti ląstelių atsaką į hipoksiją.
4. Neuroblastomos ląstelių identitetus padeda geriau atskleisti jų multi-ominė – 5hmC, transkriptomikos ir nemodifikuotų CG sekų – analizė.
5. Panaudojant hmTOP-seq ir uTOP-seq metodais nustatytą epigenetinę CG sekų modifikavimo informaciją galimą net vaisiaus genetinių ligų, pavyzdžiui, 21-osios chromosomos trisomijos, detekcija, tiriant besilaukiančių moterų laisvai cirkuliuojančią neląstelinę kraujo plazmos DNR.

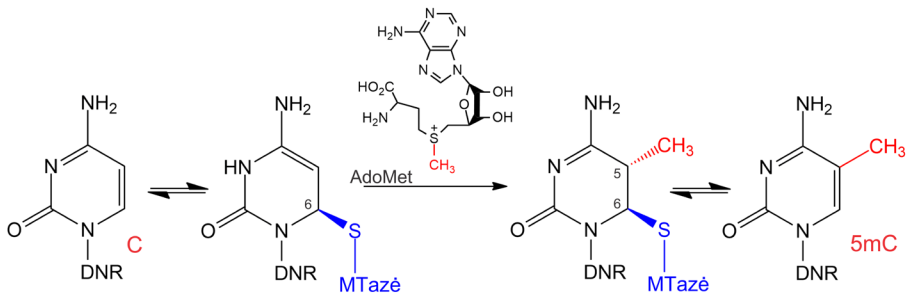
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. DNR citozino epigenetinės modifikacijos

Žinduolių DNR citozino epigenetinės modifikacijos atlieka svarbias genų reguliacines funkcijas vystymosi, diferenciacijos ir patologijų formavimosi metu (Bhattacharyya et al., 2017). Seniausiai žinoma ir geriausiai ištirta citozino modifikacija – 5-metilcitozinas (5mC), susidarantis DNR citozino C5 metiltransferazių katalizuojamos fermentinės reakcijos metu (Jurkowska et al., 2011). Vėliau DNR buvo atrastos TET baltymų oksiduotos 5mC formos – 5-hidroksimetilcitozinas, 5-formilcitozinas ir 5-karbonsicitozinas (Kriaucionis ir Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009; He et al., 2011; Pfaffeneder et al., 2011).

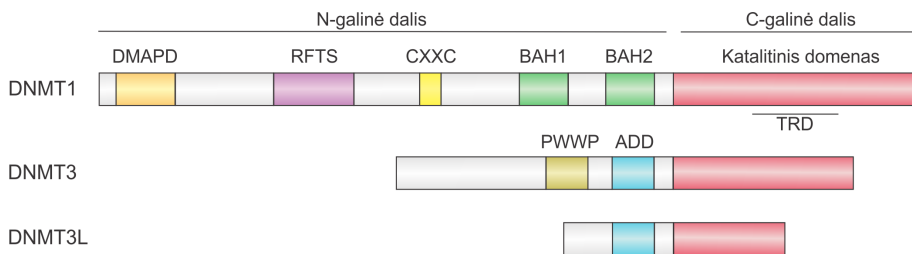
1.1.1. DNR metilinimas ir DNMT baltymai

5-metilcitozinas (5mC) – pirmoji surasta ir geriausiai ištirta žinduolių DNR epigenetinė modifikacija. 5mC susidaro DNR metiltransferazių (MTazių) katalizuojamos metilgrupės pernašos nuo S-adenozil-L-metionino (AdoMet) kofaktoriaus ant citozino bazės 5-oje padėtyje metu (žr. 1.1 pav.). Žmogaus ląstelėse *de novo* DNR metilinimą vykdo DNMT3A ir DNMT3B metiltransferazės, o replikacijos metu metilinimo profilis išsaugo palaikančioji DNMT1 MTazė (Jurkowska et al., 2011). Kanoniniai DNMT šeimos baltymai yra sudaryti iš daugiadomeninės reguliacinės N-galinės dalies ir katalitinės C-galinės dalies, kurioje yra aktyvusis fermento centras (žr. 1.2 pav.). DNMT3L yra nekanoninis baltymas, neturintis fermentinio DNMT aktyvumo, tačiau jis yra svarbus kofaktorius, stimuliuojantis DNMT3 metiltransferazių aktyvumą (Lyko, 2018).



1.1 pav. DNR metilinimo fermentinis mechanizmas. Reakcijos metu vyksta DNMT aktyviojo centro cisteino nukleofilinė ataka į citozino 6-ąją padėtį ir aktyvinama citozino 5-oji padėtis, ant kurios yra pernešama AdoMet kofaktoriaus metilgrupė (pagal Liutkevičiūtė et al., 2009).

DNMT3A/B turi konservatyvų metiltransferazinį domeną ir du su chromatinu sąveikaujančius domenų: cisteinų turtingą ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L) ir PWWP domeną, turintį Pro-Trp-Trp-Pro motyvą (Lyko, 2018). ADD domenas jungiasi prie histonų H3K4, tačiau nesijungia esant lizino trimetilinizui (H3K4me3). Kai ADD nesąveikauja su H3K4, tada jungiasi prie MTazės domeno ir autoslopinina DNMT3 aktyvumą, ir priešingai, ADD prisijungus prie nemetilinto H3K4 yra stebimas MTazinis aktyvumas. Atitinkamai yra parodyta, kad aktyvių genų CG sekų turtingi promotoriai dažniausiai yra nemetilinti ir turi H3K4me3 žymes (Greenberg ir Bourc’his, 2019). Tuo tarpu aktyviai transkribuojamų genų kūnai yra stipriai metilinti ir turi H3K36me3 žymes, prie kurių jungiasi DNMT3 PWWP domenas (Greenberg ir Bourc’his, 2019).



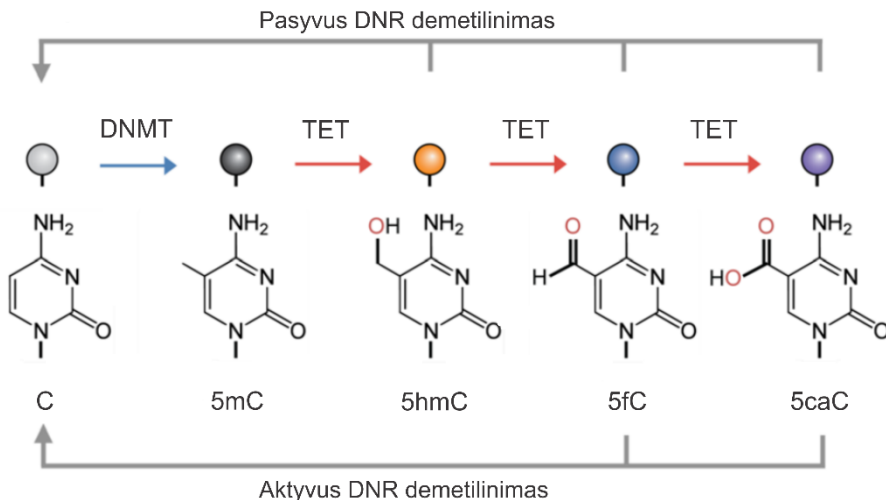
1.2 pav. Žinduolių DNR metiltransferazių domeninė struktūra. DNMT šeimos baltymams būdingas katalitinis domenas baltymo C-galinėje dalyje. N-galinėje dalyje yra išsidėstę reguliaciniai DNMT domenai: nežinomos funkcijos BAH (angl. bromo-adjacent homology) domenai, cinko pirštų CXXC domenas, RFTS (angl. replication foci targeting sequence) domenas, DMAPD – DMAP1 (angl. DNMT1-associated protein 1) jungiantis domenas, svarbus sąveikai su transkripcijos slopikliu DMAP1 ir histonų deacetilaze HDAC2, cinko pirštų ATRX–DNMT3–DNMT3L (ADD) domenas, Pro-Trp-Trp-Pro (PWWP) domenas (pagal Lyko, 2018).

Replikacijos metu epigenetinių DNR metilinimo žymių perdavimą dukterinėms ląstelėms užtikrina DNMT1 palaikomasis DNR metilinimas. Ubikvitino (Ub) E3 ligazė UHRF1 specifiskai jungiasi prie susidariusių hemimetilintų CG sekų, ubikvitilina H3 histonus ir taip pritraukia DNMT1 prie replikacinės šakutės, kur MTazė metilina naujai susidariusias hemimetilintas CG sekas dukterinėje DNR grandinėje (Qin et al., 2015). Ubikvitilintus H3 atpažįsta RFTS (angl. replication foci targeting sequence) domenas, kuris, nesant H3Ub žymių, jungiasi prie katalitinio MTazės domeno ir palaiko DNMT1 autoslopinančioje padėtyje (Greenberg ir Bourc’his, 2019).

Katalitinis DNMT1 domenas yra dalinamas į du subdomenus: katalitinę šerdį ir taikinio atpažinimo domeną TRD (angl. target recognition domain). Kristalografiniai duomenys rodo, kad produktyviajame DNR-DNMT1 komplekse TRD sąveikauja su hemimetilinta CG seka ir skatina jos metilinimą (Song et al., 2012). Tuo tarpu neproduktyviajame nemetilintos DNR-DNMT1 komplekse TRD įgauna nepalankią konformaciją, o cinko pirštų CXXC domenas sąveikauja su nemetilintu CG dinukleotidu ir pozicionuoja CXXC-BAH1 jungtuką tarp DNR ir fermento aktyviojo centro. Toks DNMT1 autoslopinantis mechanizmas apsaugo nuo *de novo* DNR metilinimo (Song et al., 2011b). Tačiau naujausi duomenys rodo, kad DNMT1 atlieka ir nekanoninę DNR *de novo* metilinimo funkciją retrotranspozonuose, dalyvaujant anksčiau minėtam baltymui UHRF1 (Haggerty et al., 2021).

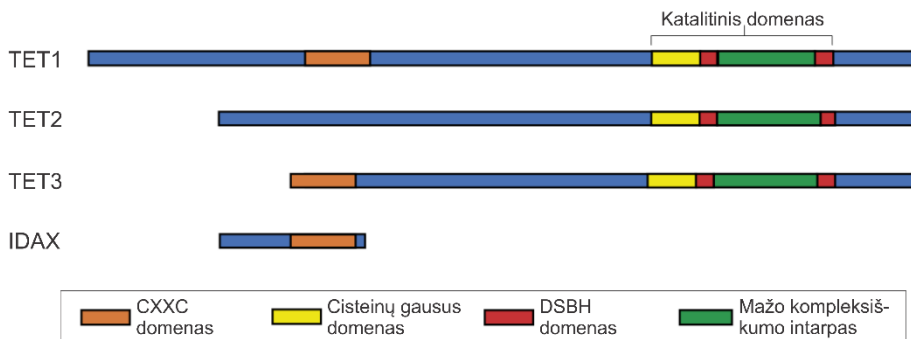
1.1.2. Oksiduotų 5mC formų susidarymas ir TET baltymai

Prieš dešimtmetį žinduolių DNR buvo atrastos naujos DNR modifikacijos – 5-hidroksimetilcitozinas (5hmC) (Kriaucionis ir Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009), 5-formilcitozinas (5fC) (Pfaffeneder et al., 2011) ir 5-karboksicitozinas (5caC) (He et al., 2011). Visos šios naujosios citozino modifikacijos susidaro TET šeimos baltymams oksiduojant 5mC (žr. 1.3 pav.).



1.3 pav. DNR citozino modifikacijos ir DNR demetilinimas. TET šeimos baltymai 5mC oksiduoja iki 5hmC, 5fC ir 5caC. Visos šios trys oksiduotos 5mC formos yra pasyvaus DNR demetilinimo tarpiniai junginiai. 5fC ir 5caC gali būti pašalinami timino DNR glikozilazės TDG aktyvaus DNR demetilinimo metu (modifikuota pagal Lio et al., 2020).

TET šeimos baltymai, kuriems priklauso TET1, TET2 ir TET3, yra nuo α -ketoglutarato, Fe(II) ir deguonies priklausomos dioksigenazės. TET baltymams būdingas konservatyvus C-galinis katalitinis domenas, sudarytas iš DSBH (angl. double-stranded β -helix) domeno, dalyvaujančio substrato oksidacijoje, cisteinų gausaus domeno, svarbaus sąveikai su chromatinu, ir didelio, mažo kompleksiškumo intarpo, atliekančio reguliacinę funkciją dėl potransliacinių TET modifikacijų (Yang et al., 2020; Matuleviciute et al., 2021) (žr. 1.4 pav.). Tačiau TET šeimos baltymų N-galinis domenas yra mažiau konservatyvus. TET1 ir TET3 turi CXXC cinko pirštų domeną, dalyvaujantį prisijungime prie DNR CG sekų, o TET2 sudaro kompleksą su IDAX – atskiru CXXC domeną turinčiu baltymu (Yang et al., 2020; Matuleviciute et al., 2021).



1.4 pav. TET šeimos baltymų domeninė struktūra. TET baltymų C-galinėje dalyje yra katalitinis domenas, sudarytas iš cisteinų gausaus ir DSBH (angl. double-stranded β -helix) domenų bei mažo kompleksiškumo intarpo. TET1 ir TET3 N-galinėje dalyje yra CXXC domenas, kurio neturi TET2, todėl jam reikalinga sąveika su IDAX baltymu (modifikuota pagal Yang et al., 2020).

TET2-5hmC/5fC-DNR kompleksų kristalografinė analizė rodo, kad 5hmC ir 5fC C5 grupės nepalankiai išsidėsto fermento aktyviajame centre, todėl šios bazės yra blogesni substratai TET baltymams nei 5mC (Hu et al., 2015). Tačiau TET2 fermentas vienu prisijungimu prie 5mC gali jį oksiduoti iki galo, t. y. iki 5caC, nedisocijuodamas nuo DNR (Crawford et al., 2016), todėl turėtų būti biologinis mechanizmas, nulemiantis TET baltymų aktyvumo sustojimą ties 5hmC, kurio DNR yra daugiausiai iš visų oksiduotų 5mC formų (žr. 1.1.3.1 skyrelį). Svarstoma, kad TET baltymų aktyvumas galėtų būti reguliuojamas kintančiu metabolitu (pavyzdžiui, α -ketoglutarato) lygiu ar lemiamas TET nekatalitinių domenų bei kitų su jais sąveikaujančių baltymų (Crawford et al., 2016), nors detaliau tai dar nėra apibūdinta.

1.1.3. DNR citozino modifikacijų pasiskirstymas genome ir biologinė reikšmė

1.1.3.1. DNR citozino modifikacijų paplitimas

5mC visuose žinduolių audiniuose randamas panašiais kiekiais, paprastai 4-6 % nuo visų C (Lister et al., 2009; Globisch et al., 2010). Tuo tarpu globalus 5hmC kiekis yra priklausomas nuo audinio tipo – jo kiekis varijuoja nuo 0,03 % iki 1,2 % 5hmC/C (Globisch et al., 2010; Szwagierczak et al., 2010; Nestor et al., 2012), taip pat didėja su amžiumi (Wagner et al., 2015). 5hmC yra iki 10 ir daugiau kartų daugiau smegenyse nei kituose audiniuose ir yra daugiau embrioninėse kamieninėse ląstelėse (ESC, angl. embryonic stem cells) nei neembrioninių ląstelių linijose (Tahiliani et al., 2009; Globisch et al., 2010; Nestor et al., 2012). Vidutiniai 5hmC kiekiai aptinkami inkstuose ir plaučiuose, mažiausi kiekiai – gaubtinėje žarnoje ir blužnyje (Globisch et al., 2010; Nestor et al., 2012; Margalit et al., 2020).

Tolimesnio 5mC oksidavimo formų, 5fC ir 5caC, kiekiai DNR yra 100-1000 kartų mažesni nei 5hmC. 5fC kiekiai žinduolių audiniuose varijuoja nuo 0,00002 iki 0,002 % nuo C, o 5caC aptinkama tik iki 0,0003 % (Ito et al., 2011; Bachman et al., 2015; Tang et al., 2015).

1.1.3.2. DNR demetilinimo keliai

Iki atrandant oksiduotas 5-metilcitozino (oksi-5mC) modifikacijas, buvo žinomas tik pasyvus DNR demetilinimas (žr. 1.3 pav.), kai replikacijos metu susintetinus naują DNR grandinę nėra išsaugomi pradiniai metilinimo profiliai dėl aktyvios DNMT1 trūkumo ląstelėse (Hofer et al., 2019). Vėliau 5hmC, 5fC ir 5caC atradimas leido papildyti šį modelį – kai hemimodifikuotame CG taikinyje yra oksii-5mC bazės, tada stipriai krenta DNMT1 reakcijos efektyvumas dėl nesusidarančių hidrofobinių sąveikų tarp TRD aminorūgščių ir oksiduotų 5mC formų, todėl vyksta pasyvus demetilinimas (Seiler et al., 2018).

Be to, žinduolių DNR aptikus oksii-5mC, buvo pasiūlytas aktyvaus, nuo replikacijos nepriklausomo, DNR demetilinimo kelias (žr. 1.3 pav.). Aktyviame DNR demetilinime pirmiausiai TET oksiduoja 5mC iki 5hmC, 5fC ar 5caC. Tuomet 5fC ir 5caC yra atpažįstami ir pašalinami timino DNR glikozilazės TDG, katalizuojančios jų N-glikozidinės jungties hidrolizę. Taip DNR susidaro abazinė sritis, kuri yra užtaisoma nemodifikuotu citoziniu bazių ekscizinės reparacijos (BER) mechanizmu (Hofer et al., 2019; Pfeifer et al., 2020).

Šiuo metu daugėja duomenų, rodančių hipotetinius alternatyvius aktyvaus DNR demetilinimo kelius. Pelės ir žmogaus DNMT fermentai *in vitro* gali tiesiogiai dehidroksimetilinti 5hmC (Chen et al., 2012). Taip pat nustatyta, kad 5fC yra tiesiogiai deformilinamas iki C *in vivo* pelės ESC, nors tai atliekantys fermentai dar nerasti (Iwan et al., 2018). Be to, parodytas 5caC tiesioginis dekarboksilinimas *in vitro* su žmogaus DNMT baltymais (Liutkevičiūtė et al., 2014) ir *in vivo* vykstantis procesas įvairiose žmogaus ląstelių linijose, nors už dekarboksilinimą atsakingas fermentas neidentifikuotas (Feng et al., 2021). Kadangi TDG veikimas sukuria abazines sritis, kurios potencialiai gali tapti viengrandinių ar dvigrandinių DNR trūkių vietomis ir sukelti genomo nestabilumą, tiesioginis oksidinis 5mC C5 grupių pašalinimas vykdant C-C jungčių nutraukimą būtų saugesnis 5mC demetilinimo kelias (Iwan et al., 2018).

Nors oksidinis 5mC bazės yra pasiūlytos kaip DNR demetilinimo tarpiniai junginiai, tačiau daug duomenų rodo, kad tai ir savitą epigenetinę reikšmę turinčios modifikacijos, ypač 5hmC, kurio didelis kiekis yra randamas smegenyse ir kuris yra susietas su biologinėmis funkcijomis (Nestor et al., 2012; Lister et al., 2013; Bachman et al., 2014). Taip pat yra parodyta, kad 5hmC ir 5fC yra stabilios epigenetinės žymės (Bachman et al., 2014, 2015), kartu su 5caC turinčios specifinius jas atpažįstančius baltymus (Spruijt et al., 2013; Pfeifer et al., 2020). Kadangi TET baltymai efektyviau oksiduoja 5mC nei 5hmC ar 5fC (Hu et al., 2015) ir nėra koreliacijos tarp 5mC ir jo oksiduotų formų kiekių (Bachman et al., 2015; Wilkins et al., 2020), tai galėtų reikšti, kad visų oksidinis 5mC susidarymas *in vivo* yra griežtai kontroliuojamas procesas, vykstantis tik specifinėse genomo sekose ir turintis savitas genų reguliacijos funkcijas (Pfeifer et al., 2020; Wilkins et al., 2020).

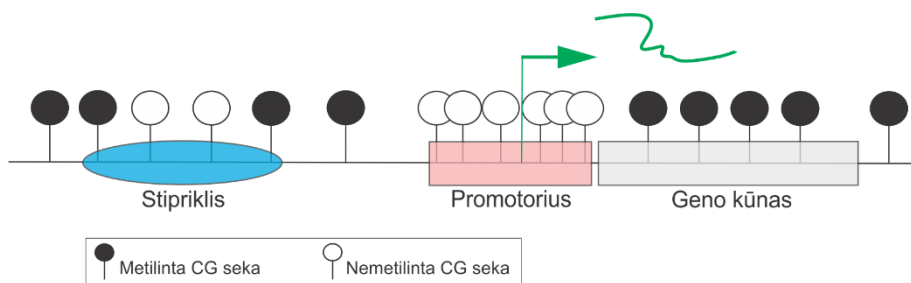
1.1.3.3. DNR citozino modifikacijų reikšmė ir genominiis pasiskirstymas

Labiausiai ištirta DNR citozino modifikacija – 5mC, kuris yra siejamas su genų raiškos slopinimu, pasikartojančių DNR sekų ir transpozonų nutildymu, X chromosomos inaktyvacijos ir genomio imprintingo apsprendimu (Schübeler, 2015; Greenberg ir Bourc'his, 2019). Tuo tarpu oksidinis 5mC, priešingai, yra labiau siejami su genų raiškos aktyvinimu (Lu et al., 2015; Cui et al., 2020). Daugiausiai duomenų yra sukaupta apie 5mC ir 5hmC, jų biologinė reikšmė yra geriausiai atskleista, todėl toliau šiame darbe būtent šioms epigenetinėms modifikacijoms bus skiriamas didžiausias dėmesys.

Įvairūs *in vitro* tyrimai nurodo galimus citozino modifikacijų dalyvavimo genų reguliacijoje mechanizmus. Susiejant su genų slopinimu parodyta, kad 5mC didina dvigrandinės DNR stabilumą ir jos lydymosi temperatūrą, o

5hmC ir 5fC jį sumažina ir tokiu būdu galėtų paskatinti genų raišką (Rodríguez López et al., 2012; Sanstead et al., 2020). Taip pat 5fC pakeičia DNR spiralės konformaciją, o tai galėtų turėti įtakos chromatinio susipakavimui ir genų raiškai (Raiber et al., 2015). Be to, 5fC gali suformuoti šifo bazės *in vivo* su histonų baltymų lizinių šoninėmis grandinėmis, padidindamas nukleosomų stabilumą, ir tai yra pasiūlyta kaip nukleosomų pozicionavimo reguliacijos mechanizmas (Ji et al., 2017; Raiber et al., 2018). Nors 5caC fiziologinėmis sąlygomis reikšmingos įtakos DNR stabilumui neturi lyginant su nemodifikuota DNR (Sanstead et al., 2020), bet 5fC ir 5caC yra atpažįstami RNR polimerazės II ir lėtina jos aktyvumą, galimai taip dalyvaudami transkripcijos reguliacijoje (Wang et al., 2015). Modifikuoti citozinai išlaiko galimybę formuoti vandenilinius ryšius su guanino bazėmis, todėl sėkmingai dalyvauja DNR replikacijoje. O C5 šoninės grupės yra prieinamos su DNR sąveikaujantiems baltymams didžiajame DNR griovyje, todėl 5mC ir oks-5mC gali dalyvauti biologiniuose procesuose (Wang et al., 2022).

Somatiniuose žinduolių audiniuose ~70-80 % CG sekų yra metilintos, išimtį sudaro CG salos ir kitos genų reguliacinės sritys – promotoriai, stiprikliai – kuriose stebimas mažesnis DNR metilinimas (žr. 1.5 pav.) (Lister et al., 2009; Luo et al., 2018; Greenberg ir Bourc’his, 2019). Žmogaus genome yra apie 30 000 CG salų, 500-1000 bp ilgio aukšto GC sąstato regionų, iš kurių 50-60 % yra išsidėsčiusios promotoriuose (Papageorgiou et al., 2014; Skvortsova et al., 2019). Neaktyvūs CG salų promotoriai dažniausiai yra nutildomi Polycomb baltymų kompleksų vykdomu histonų metiliniu H3K27 padėtyse (Greenberg ir Bourc’his, 2019). Regionai 2 kb atstumu nuo CG salų yra vadinami CG salų krantais, kurie taip pat paprastai yra nemetilinti ir turi žemą GC tankį (Skvortsova et al., 2019).



1.5 pav. CG sekų metilinimas žinduolių genome. Didžioji dalis genomo CG sekų yra metilintos, išskyrus stiprikliai ir promotorines CG salas (pagal Skvortsova et al., 2019).

Transpozonai, mobilūs genomo elementai, užima apie 46 % žmogaus genomo (Jain et al., 2017). Jie kelia grėsmę genomo stabilumui ir kaip apsaugos mechanizmas jie yra metilinami tam, kad būtų stabdoma jų raiška ir mobilumas (Greenberg ir Bourc’his, 2019). Taip pat genominiis stabilumas palaikomas metilinant DNR subtelomeriniuose ir centromeriniuose regionuose (Greenberg ir Bourc’his, 2019).

DNR metilinimas yra praturtintas genų egzonuose lyginant su intronais. Manoma, kad 5mC genų kūnuose reikalingas dėl dviejų priežasčių. Pirma, metilinimas genų kūnuose reguliuoja transkripcijos elongaciją ir kotranskripcinį splaisingą per poveikį RNR polimerazei II (Pol II) (Greenberg ir Bourc’his, 2019). Prie egzono prisijungęs CTCF (CCCTC jungiantis veiksnys) sulėtina Pol II ir tai lemia egzono įtraukimą į transkriptą, tačiau esant metilintai DNR, CTCF nesijungia ir egzonas yra neįtraukiamas. Priešingai, kituose lokusuose DNR metilinimas lemia MeCP2 (angl. methyl CG binding protein 2) prisijungimą ir egzono įtraukimą, o tai sutinka su pastebėjimu, kad alternatyvūs egzonai turi mažesnę DNR metilinimo lygį nei konstitutyvūs egzonai (Gelfman et al., 2013). Antra, 5mC gali slopinti intrageninius alternatyvius ar audiniui specifinius promotorius bei apsaugoti geno kūnus nuo klaidingo Pol II prisijungimo ir klaidingos transkripcijos iniciacijos (Greenberg ir Bourc’his, 2019; Skvortsova et al., 2019).

Nors iš pradžių galvota, kad 5hmC tėra DNR demetilinimo tarpinis junginys, jau yra parodyta, kad jis turi savitą rolę genų transkripcijos ir chromatino prieinamumo reguliacijoje (Bhattacharyya et al., 2017; Wilkins et al., 2020). 5hmC, esantis genų kūnuose ir stiprikluose, yra žinomas kaip aktyvios transkripcijos žymė (Tsagaratou ir Rao, 2014; Pfeifer et al., 2020; Wilkins et al., 2020), o promotoriuose – paprastai kaip slopinanti žymė (Wu et al., 2011; Huang et al., 2014). 5hmC trūksta aktyvių genų promotoriuose, bet jis žymi promotorinių CG salų kraštus (Skvortsova et al., 2019; Wilkins et al., 2020) ir yra praturtintas genų egzonuose (Cui et al., 2020; He et al., 2021a). Be to, 5hmC genominiis išsidėstymas koreliuoja su atviromis chromatino sritimis (Bhattacharyya et al., 2017). Įdomu tai, kad ankstyvojoje embriogenezėje dauguma 5hmC modifikacijų susidaro ne iš jau esamų 5mC, bet iš *de novo* metilintų C, kas galėtų reikšti, kad 5hmC turi labai specifinę funkciją vystymuisi (Amouroux et al., 2016). Taip pat konstitutyvūs egzonai pasižymi didesniais 5hmC lygiais nei alternatyvūs egzonai (Khare et al., 2012) ir 5hmC rodo stiprią lokalizaciją kartu su RNR polimeraze II, todėl manoma, kad 5hmC dalyvauja transkripcijos procese (Zeng et al., 2018).

Padidėjęs 5hmC kiekis aptinkamas sustojusios replikacinės šakutės vietose ir yra susietas su padidėjusiu jos nestabilumu (Kharat et al., 2020). Taip pat 5hmC yra praturtintas replikacijos pradžios srityse ir yra svarbus replikacijos

pradžios veiksmų pritraukime (Prikrylova et al., 2019). Įdomu tai, kad 5hmC yra aptinkamas DNR pažaidų vietose ir skatina DNR reparaciją somatinėse ląstelėse (Kafer et al., 2016) bei yra stebimas mejozinių dvigrandinių DNR trūkių srityse gametose (Imai et al., 2020). Neseniai buvo parodyta, kad oksidacinės alkilintos DNR reparacijos fermentai ALKBH2 ir ALKBH3, kurie anksčiau buvo žinomi kaip galintys oksiduoti N-metilintas bazes, gali oksiduoti ir 5mC, 5hmC bei 5fC *in vitro*. Tai rodo galimai esantį ryšį tarp DNR reparacijos ir epigenetinės genų reguliacijos (Bian et al., 2019).

Prie 5mC besijungiantys baltymai turi metil-CG jungiantį domeną MBD (angl. methyl-CpG binding domain), kurio jungimasi prie DNR slopina oksiduotos 5mC formos (Pfeifer et al., 2020). MBD turintys baltymai dažnai įeina į slopinančius chromatiną kompleksus, kurie deacetilina histonus ir pertvarko chromatiną. Prie metilintos DNR taip pat jungiasi cinko pirštų, BTB/POZ ir homeodomenų turintys transkripcijos veiksniai, kurie paprastai slopina transkripciją (Pfeifer et al., 2020). Yra parodyti keli baltymai, specifiskai sąveikaujantys su 5hmC, pavyzdžiui, UHRF2 ir SALL4A. UHRF2 sąveikauja su hidroksimetilintomis CG sekomis didesniu afiniškumu nei su metilinta DNR (Zhou et al., 2014). UHRF2 yra alosteriskai aktyvinamas 5hmC ir skatina TDG-BER baltymų komplekso susiformavimą, kas nulemia pilną aktyvų DNR demetilimą (Liu et al., 2021a). Afininis baltymų gryninimas ir proteominė analizė parodė daugiau baltymų, sąveikaujančių su 5fC ir 5caC nei su 5hmC, bet detalesnės informacijos apie jų biologinę reikšmę nėra. Nors 5fC ir 5caC kiekiai DNR yra žymiai mažesni nei 5hmC, daugiau baltymų gauta galimai dėl to, kad 5fC ir 5caC turi didesnę poliariškumą ar neigiamą krūvį (Pfeifer et al., 2020).

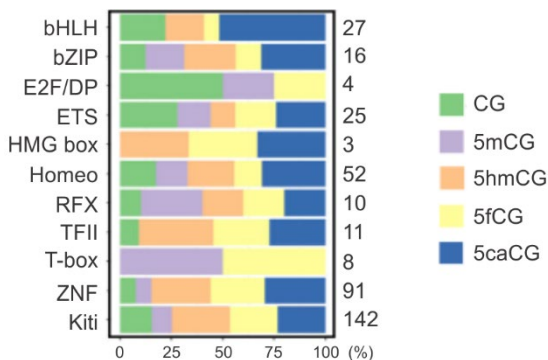
1.1.3.4. 5mC ir 5hmC sąsaja su genų raiška

DNR metilinimas ± 1 kb regione aplink transkripcijos pradžios vietą koreliuoja su genų slopinimu (Tirado-Magallanes et al., 2017), o genų kūnuose – teigiamai koreliuoja su genų raiška (Greenberg ir Bourc'his, 2019). Taip pat genų kūnų 5hmC lygis teigiamai koreliuoja su genų, ypač audiniui specifinių, raiška, ir 5hmC duoda stipresnę koreliaciją nei 5mC (Li et al., 2019; He et al., 2021a). 5hmC labiau linkęs išsidėstyti genų regionuose nei intergeninėse srityse, kuriose stebimas 5hmC trūkumas, ir tai paremia hipotezę, kad 5hmC svarbus genų raiškos reguliacijoje (Cui et al., 2020).

5hmC yra praturtintas bivalentiniuose genų promotoriuose, turinčiuose H3K4me3 ir H3K27me3 histonų modifikacijas, atitinkamai siejamas su transkripcijos aktyvinimu ir slopinimu. Toks dvilypis žymėjimas nurodo promotorius genų, kurie yra „pasirengę“ tapti aktyvintais esant tinkamam

išorės signalui (Tsagaratou ir Rao, 2014). Be to, 5hmC gali būti audiniui specifinis biožymuo, nes geriau atspinti audiniui specifinius genus nei aktyvios transkripcijos histonų H3K36me3 žymė genų kūnuose ir audiniui specifinius genų stipriklis nei H3K27ac žymė (Cui et al., 2020). Audiniams specifiniai skirtingai hidroksimetilinti regionai persidengia su transkripcijos veiksnių prisijungimo vietomis, kas galėtų lemti audiniams specifinę genų raišką (He et al., 2021a).

Manoma, kad transkripcijos veiksnių prisijungimą prie atpažįstamos DNR sekos moduluoja citozino modifikacijos, pavyzdžiui, vieni transkripcijos veiksniai jungsis prie metilintos, kiti – tik prie nemetilintos DNR sekos. Ir iš tiesų, net 61 % tirtų žmogaus transkripcijos veiksnių jungimuisi prie DNR įtaką (teigiamą arba neigiamą) daro 5mC ir tik nedidelės dalies, 6 %, jungimuisi prie DNR 5mC jokios įtakos neturi (likę 33 % neturėjo CG dinukleotido atpažinimo sekoje) (Yin et al., 2017). Be to, yra rasti žmogaus transkripcijos veiksniai, specifiskai besijungiantys prie atpažinimo sekų, turinčių 5mC, 5hmC, 5fC ar 5caC (Bai et al., 2021; Song et al., 2021). Tačiau transkripcijos veiksnių šeimos viduje buvo stebima variacija ir nebuvo patikimos pirmenybės vieno tipo DNR modifikacijai (žr. 1.6 pav.) (Yin et al., 2017; Song et al., 2021). Vis tik manoma, kad transkripcijos veiksnių jungimosi prie DNR specifiskumas gali būti nulemtas jų biologinės funkcijos (Yin et al., 2017). Taip pat įdomu, kad kompleksuose su transkripcijos veiksniais randamas TET, kas rodo sąsajas su 5mC dinamika po transkripcijos veiksnių prisijungimo (Luo et al., 2018).



1.6 pav. Transkripcijos veiksnių, priskiriamų įvairioms jų šeimoms, sąveika su skirtingomis DNR citozino modifikacijomis, esančiomis atpažinimo sekose. Dešinėje pusėje nurodytas transkripcijos veiksnių skaičius atitinkamoje veiksnių grupėje (modifikuota pagal Song et al., 2021).

1.1.3.5. Nesimetriškas DNR metilinimas ir hidrokسيمetilinimas

Nors DNR citozino modifikacijos pagrindu stebimos CG sekose, tačiau mažesniais kiekiais jos yra aptinkamos ir nesimetriškose ne CG sekose (CH, kur H – A, T arba C bazė), kurių žmogaus genome yra 556 milijonai (Titcombe et al., 2022). Žmogaus neuronuose yra metilinti 2-7 % CH sekų (Lister et al., 2013; Luo et al., 2017), jų metilinimo lygis yra iki 20-25 % (Kinde et al., 2015). Nors kituose audiniuose tik labai nedidelė dalis CH sekų yra metilintos (iki 0,4 % (Schultz et al., 2015)), jų metilinimo profiliai nėra atsiktiniai – jie specifiski audiniui (Titcombe et al., 2022). Įdomu, kad žmogaus embrioninėse ląstelėse 5mCH genų kūnuose teigiamai koreliuoja su genų raiška (Lister et al., 2009), o subrendusiuose audiniuose – neigiamai (Lister et al., 2013; Schultz et al., 2015).

TET baltymai efektyviau oksiduoja 5mC CG nei CH pozicijose (Hu et al., 2013; DeNizio et al., 2021) ir tai galėtų paaiškinti labai nedidelį 5hmCH kiekį. Pagal kristalinę TET:DNR struktūrą baltymo aktyviajame centre matoma sąveika su G baze, esančia šalia 5mC (Hu et al., 2013), todėl su kitomis DNR sekomis krenta TET 5mC oksidacijos aktyvumas. Esant 5hmC, dėl papildomų vandenilinių jungčių susidarymo, sąveika su G nebėra būtina, todėl tolimesnė 5hmC oksidacija minimaliai priklauso nuo DNR sekos (Hu et al., 2015; DeNizio et al., 2021). 5hmC kiekis ne CG sekose varijuoja nuo 0,96 % iki 4,1 % skirtinguose audiniuose, o didžiausias yra smegenyse ir ESC (Sun et al., 2013; Schutsky et al., 2018; He et al., 2021a), tuo tarpu neuronuose net ~38 %, o žmogaus embrioninėse kamieninėse ląstelėse ~24 % visų 5mC aptinkama CH pozicijose (Lister et al., 2009; DeNizio et al., 2021). Tai būtų galima paaiškinti santykiu tarp 5hmC susidarymo ir pašalinimo – CH pozicijose 5mC retai oksiduojamas į 5hmC, bet po tokio virsmo, jis toliau efektyviai oksiduojamas ir susidarę 5fC ir 5caC pašalinami TDG (DeNizio et al., 2021).

Iš ne CG sekų dažniausiai DNMT metilina CA pozicijas (Jurkowska et al., 2011; Lister et al., 2013), turbūt todėl jose dažniausiai aptinkamas ir 5hmC (Sun et al., 2015; He et al., 2021a). Įdomu tai, kad 5hmCG ir 5hmCA skirtingai sąveikauja su MeCP2 ir lemia priešingą genų reguliacijos baigtį neuronuose – stipriai ekspresuojamų genų kūnuose yra aptinkamas 5hmCG ir mažai prisijungusio MeCP2 baltymo, tuo tarpu užslopintuose genuose aptinkamas didesnis 5hmCA kiekis ir prisijungęs MeCP2 (Mellén et al., 2017). Panašiai 5mCA yra praturtintas genų kūnuose ir slopina jų transkripciją per MeCP2 prisijungimą (Kinde et al., 2016).

5mC CG sekose yra beveik visada simetriškas dėl DNMT1 palaikančiojo metilinimo (92-99 % 5mCG sekų yra simetriškos) (Lister et al., 2009; Yu et al., 2012). Nesimetriškai metilintos CG sekos pasiskirsto tolygiai, tuo tarpu

5mCH dažniau stebimos matricinėje DNR grandinėje (Kyriakopoulos et al., 2022). Nedidelė dalis hemimetilintų CG sekų, kurias tikėtina, kad sukuria DNMT3A, gali būti stabilios paveldimos epigenetinės žymės, siejamos su transkripcijos reguliacija (Xu ir Corces, 2018; Liang et al., 2021). Prie hemimetilintų DNR vietų jungiasi transkripcijos reguliatorius CTCF ir kohezinai, kurie reikalingi chromatinui sąveikoms ir genų raiškos kontrolei (Xu ir Corces, 2018). Priešingai nei 5mC atveju, tik 13-21 % 5hmCG sekų yra simetriškų (Yu et al., 2012; He et al., 2021a), nors yra rizika, kad dėl mažo 5hmC kiekio, toks rezultatas galėjo būti iškreiptas esant nepakankamam sekoskaitos gyliui (Yu et al., 2012). Įdomu tai, kad 5hmC asimetriškumo tendencija yra stebima G-turtingoje grandinėje, nors to biologinė funkcija nėra žinoma (Yu et al., 2012).

1.1.3.6. Epigenomo topologija ir dalinai metilinti DNR regionai

DNR metilinimas yra intensyviai tyrinėjamas epigenetinis genų raiškos reguliacijos mechanizmas, dažniausiai analizuojamas nedideliuose geno elementuose, tokiuose kaip CG salos, promotoriai ar stiprikliai. Tačiau taip pat žinduolių ląstelių genuose pastebėtos didelės epigenetinės DNR struktūros – dalinai metilinti domenai, PMD (angl. partially methylated domains) (Lister et al., 2009). PMD pasižymi mažesniu DNR metilinimo lygiu nei likęs genomai, jų dydis svyruoja kelių šimtų ar net tūkstančių kilobazių ribose ir jie gali užimti net apie pusę geno (Lister et al., 2009; Salhab et al., 2018).

PMD regionuose buvo pastebėtas genų trūkumas (mažesnis jų kiekis nei tikimasi teoriškai) ir jie paprastai būna visai neaktyvūs ar tik labai silpnai reiškami (Salhab et al., 2018; Decato et al., 2020). PMD yra siejami su transkripciškai neaktyviais heterochromatino regionais, kuriems būdingos histonų H3K9me3 ir H3K27me3 žymės, ir jie yra linke išsidėstyti vėlyvosios replikacijos geno srityse (Berman et al., 2012; Salhab et al., 2018; Decato et al., 2020). Be to, PMD vietos gerai atitinka su branduolio lamina susijusius domenais (angl. lamina-associated domains, LAD), kas taip pat rodo jų ryšį su genų slopinimo reguliacija (Berman et al., 2012; Zhou et al., 2018).

Nustačius koreliaciją tarp žmogaus amžiaus ir jo audiniuose stebimo PMD 5mC lygio, buvo pasiūlyta, kad DNR hipometilinimas atspindi ląstelių mitotinę istoriją – ląstelių pasidalinimų kiekį (Zhou et al., 2018). Tai patvirtina palyginimo tarp auglių mėginių ir to paties tipo audinio vėžinių ląstelių kultūrų rezultatai, rodantys, kad pastarosioms būdingas mažesnis PMD metilinimas (Decato et al., 2020). Įdomu, kad kuo vėlyvesnė geno regiono replikacija, tuo mažesnis 5mC lygis stebimas PMD viduje, ir šis skirtumas

atsiranda galimai dėl nevienodo laiko, per kurį turi būti įvykdytas dukterinės DNR grandinės metilimas replikacijos metu (Zhou et al., 2018; Decato et al., 2020). Svarbu paminėti, kad PMD atspinti ląstelėms specifiską epigenomo topologiją – pagal PMD duomenis skirtingų ląstelių mėginiai susiklasifikuoja pagal audinio tipą (Salhab et al., 2018).

1.1.3.7. 5mC ir 5hmC pokyčiai žmogaus patologijų atvejais

Įvairių žmogaus patologijų atveju stebimas genomo metilimo profilių pokytis, pavyzdžiui, vėžiniams susirgimams būdingas globalus genomo hipometilimas ir lokalus sričių hipermetilimas, ypač su vėžį slopinančiais genais susijusiose CG salose (Luo et al., 2018). Gausūs tyrimai rodo, kad DNMT gali elgtis dvejopai – jie gali būti ir vėžio slopintojai, ir onkogeniniai baltymai, o tai gali būti nulemta skirtingos ląstelinės aplinkos ir įvairių papildomų kitų genų mutacijų (Zhang et al., 2020). Nors kepenų ir gaubtinės žarnos vėžiniuose audiniuose stebima DNMT3B perraška ir įvairių genų metilimas, skatinantis vėžio vystymąsi, taip pat yra apibūdinta DNMT3B priešvėžinė funkcija limfomos atveju (Zhang et al., 2020).

Vėžinėms ir sveikoms ląstelėms yra būdinga tik dalis persidengiančių jose identifikuotų PMD ir, svarbiausia, juose yra stebimi DNR metilimo skirtumai – vėžinėse ląstelėse aptinkamas mažesnis PMD regionų 5mC lygis, kas galimai paaiškina jose stebimą globalų DNR hipometilimą (Zhou et al., 2018; Brinkman et al., 2019; Zhao et al., 2020b). Pabrėžtina, kad nors vėžinių ląstelių PMD metilimo lygis nepriklauso nuo audinio, bet PMD išsidėstymas genome asocijuojasi su audinio tipu (Brinkman et al., 2019). Tyrimai rodo, kad PMD metilimo variacijos reikšmingai nulemia stebimą vėžinių ląstelių epigenetinį heterogeniškumą ir manoma, kad vėžiniuose PMD yra toleruojamas epigenominis ir transkriptominis nestabilumas (Brinkman et al., 2019; Gull et al., 2022).

Sukaupti duomenys taip pat rodo TET baltymų dvilypumą – jie gali būti onkogeniniai arba vėžį slopinantys baltymai. TET funkcinės mutacijos stebimos eilėje vėžinių susirgimų tipų, pavyzdžiui, *TET2* yra vienas iš dažniausiai mutavusių genų mielomos atveju (Matuleviciute et al., 2021). Įvairiuose vėžiniuose audiniuose stebimas *TET* raiškos ir globalaus 5hmC lygio sumažėjimas lyginant su sveiku audiniu (Yang et al., 2013). Tačiau kiti tyrimai nurodo padidėjusius *TET* raišką ir aktyvumą vėžinėse ląstelėse, ypač hipoksijos sąlygomis (Matuleviciute et al., 2021). Pavyzdžiui, glioblastomos hipoksinėse ląstelėse stebima padidėjusi TET baltymų raiška ir pluriopotentiųjų genų *OCT4* ir *NANOG* indukcija, siejama su 5hmC pagausėjimu šių genų promotorių lokusuose (Prasad et al., 2017). 5hmC

pokyčiai stiprikluose, promotoriuose ir genų kūnuose yra susiję su genų raiškos kitimu ir yra specifiški vėžio tipui (Xu ir Gao, 2020). Be to, pastebėtos 5hmC sąsajos su vėžio stadijomis, metastazavimu bei pacientų išgyvenamumu. Todėl 5hmC yra pasiūlytas kaip potencialus prognostinis ir diagnostinis vėžio biožymuo (Xu ir Gao, 2020; Shekhawat et al., 2021).

Epigenetiniai DNR pokyčiai stebimi esant ne tik vėžiniams susirgimams, bet ir įvairioms kompleksinėms, neurodegeneracinėms ligoms. Alzheimerio, Parkinsono ligų atvejais smegenų ląstelių DNR metilinimo ir hidroksimetilinimo kitimas susietas su atminties formavimosi, uždegiminiais ir neurogenezės procesais (Ghosh ir Saadat, 2021; Perkovic et al., 2021). Taip pat žinomas 5mC sąryšis su žmogaus senėjimu ir ilgaamžiškumu bei nuo amžiaus priklausomomis širdies ir kraujagyslių ligomis (Xiao et al., 2019). Pakitę DNR epigenetinių modifikacijų profiliai aptinkami net genetinių ligų, pavyzdžiui, Dauno sindromo (21-osios chromosomos trisomijos), atvejais. Dauno sindromą turinčių asmenų smegenų, placentos ir kraujo ląstelių DNR tyrimai rodo, kad 5mC ir 5hmC pokyčiai galimai yra susiję su smegenų vystymusi ir jų funkcijomis bei autoimuninės sistemos sutrikimais (Ciccarone et al., 2018; Yu et al., 2020).

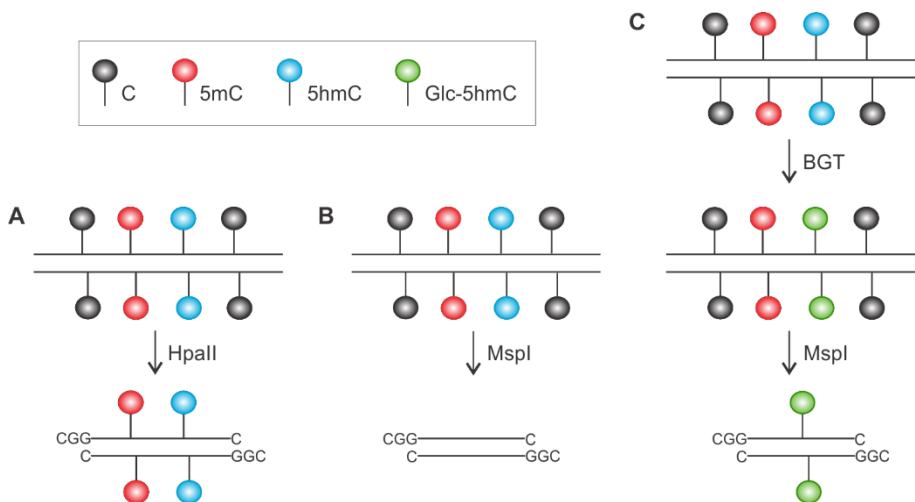
1.1.4. 5mC ir 5hmC genomio profiliavimo metodai

Siekiant išsiaiškinti DNR citozino modifikacijų epigenetines funkcijas, reikalingi specifiški ir jautrūs metodai, leidžiantys tiksliai nustatyti citozino modifikacijų pozicijas genome ir sudaryti jų pasiskirstymo genolapius. Šiame skyrelyje bus apžvelgti pagrindiniai viso genomu 5mC ir 5hmC profiliavimo metodai.

1.1.4.1. Metodai, paremti restrikcijos endonukleazų savybėmis

Pirmasis žmogaus ląstelių viso genomu metilinimo genolapis buvo sudarytas Methyl-seq metodu, panaudojant DNR metilinimui jautrias restrikcijos endonukleazes (REazes). Methyl-seq metodas apjungė naujos kartos DNR sekoskaitos technologijas ir gerai žinomus REazių izoizomerus HpaII ir MspI, atpažįstančius tą pačią DNR seką 5'-CCGG, tačiau turinčius skirtingą jautrumą DNR metilinimui (Brunner et al., 2009). HpaII hidrolizuoja tik nemodifikuotą atpažįstamą DNR seką, o MspI ją hidrolizuoja nepriklausomai nuo metilinimo būsenos (žr. 1.7 A, B pav.). Todėl sekoskaitoje sekos, esančios bibliotekoje, ruoštoje su MspI hidrolize, bet nesančios bibliotekoje, ruoštoje su HpaII, nurodo metilintas DNR sekas (Brunner et al., 2009). Vėliau buvo parodyta, kad R.MspI yra nejautri ir naujai žinduolių DNR nustatyti 5hmC modifikacijai (Kinney et al., 2011), todėl iš

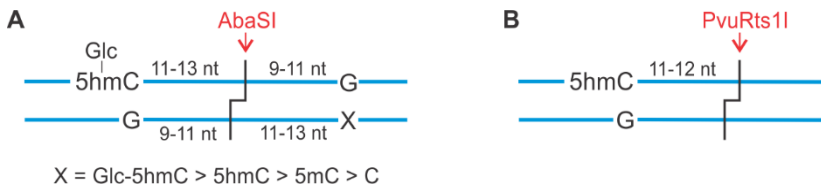
tikrųjų bibliotekose stebimas bendras 5mC ir 5hmC signalas (žr. 1.7 A, B pav.). Pritaikius 5hmC glikozilinimą (Glc-5hmC) galima analizuoti specifiškai tik hidroksimetilintas DNR sekas – Glc-5hmC blokuoja MspI atpažįstamos DNR sekos hidrolizę (žr. 1.7 C pav.) (Kinney et al., 2011). Metilinimui jautrių REazių atpažįstamų sekų kiekis genome apriboja 5mC ir 5hmC analizę bei galimi klaidingi DNR modifikavimo įverčiai dėl nepilnos DNR hidrolizės (Serre et al., 2010). Vis tik pabrėžtina, kad bibliotekų ruošimo metu prie hidrolizuotų DNR fragmentų yra prijungiami adapteriai, atpažįstami sekoskaitoje ir leidžiantys nustatyti tikslias DNR hidrolizės vietas, taip sužinant 5mC ir 5hmC genomines pozicijas vienos bazės tikslumu (Gao et al., 2013).



1.7 pav. DNR hidrolizės schemas, vaizduojančios REazių HpaII ir MspI jautrumą citozino modifikacijoms. A) HpaII hidrolizuoja tik nemodifikuotą citoziną turinčias DNR atpažinimo sekas. B) MspI hidrolizuoja taikinio DNR sekas, kuriose yra nemodifikuoti C, 5mC ar 5hmC. C) MspI nehidrolizuoja atpažįstamos DNR sekos, kai joje yra Glc-5hmC, susidaręs po T4 β-gliukoziltransferazės (BGT) katalizuojamo 5hmC glikozilinimo (pagal Gao et al., 2013).

Vėliau specifiškai 5hmC analizei buvo pasiūlyti sekoskaitos metodai, paremti nuo 5hmC priklausomomis REazėmis. Aba-seq metode naudojama AbaSI restrikcijos endonukleazė, atpažįstanti glikozilintą 5hmC ir hidrolizuojanti DNR 11-13 nukleotidų atstumu nuo jo (žr. 1.8 A pav.), todėl sekoskaitos duomenyse nustatius DNR hidrolizės vietas, 5hmC pozicijas galima įvertinti beveik vieno nukleotido tikslumu (Sun et al., 2013). Tačiau Aba-seq metodas turi šališkumą tam tikriems DNR regionams – AbaSI

efektyviau hidrolizuoja sekas, abipus kurių yra simetriški citozinai, ypač Glc-5hmC (žr. 1.8 A pav.) (Sun et al., 2013). Todėl buvo pasiūlytas panašus metodas Pvu-Seal-seq, paremtas PvuRts1I restrikcijos endonukleaze, kuri atpažįsta 5hmC ir hidrolizuoja DNR 11-12 nukleotidų atstumu pasroviui (žr. 1.8 B pav.). PvuRts1I nereikia C simetrijos aplink DNR hidrolizės vietą, bet ji turi nestiprų aktyvumą atpažįstamoms sekoms su 5mC, todėl specifiskumo didinimui yra naudojamas 5hmC turinčių DNR fragmentų praturtinimas po REazės hidrolizės (Sun et al., 2015). Nors Pvu-Seal-seq jautriai nustato 5hmC lokusus, tačiau kadangi yra naudojamas DNR fragmentų praturtinimas, tai metodas nėra kiekybinis ir gali nustatyti tik santykinius 5hmC lygius (Sun et al., 2015).



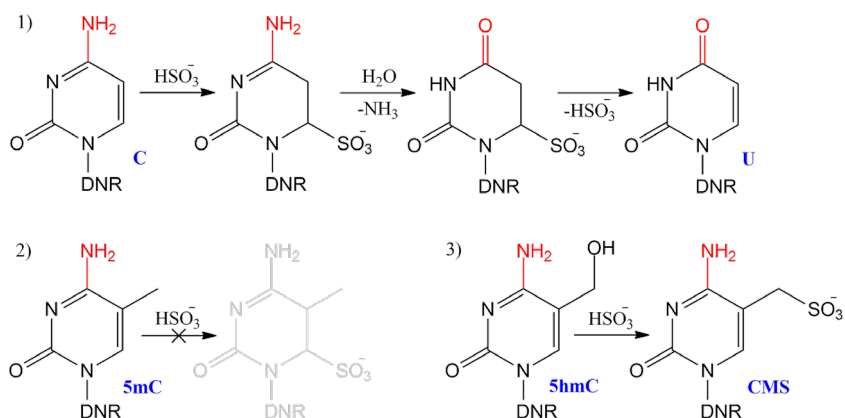
1.8 pav. 5hmC pozicijų nustatymui naudojamų REazių atpažinimo ir DNR hidrolizės sekų schemas. A) R.AbaSI atpažįsta Glc-5hmC ir hidrolizuoja DNR 11-13 nt atstumu. Efektyviai hidrolizei reikalinga C simetrija, ypač Glc-5hmC (pagal Sun et al., 2013). B) R.PvuRts1I atpažįsta 5hmC ir hidrolizuoja DNR 11-12 nt atstumu (pagal Sun et al., 2015).

1.1.4.2. Citozino cheminio deaminavimo metodai

Istoriškai pirmasis detalus, vienos bazės skyros žmogaus ląstelių viso genomo metilinimo genolapis buvo sudarytas panaudojant citozino cheminį deaminimą (Lister et al., 2009). Viengrandinę DNR paveikus natrio bisulfitu (NaHSO₃, BS), citozino bazė yra deamininama iki uracilo, o 5-metilcitozinas lieka nepakitęs (žr. 1.9 pav.). Atlikus DNR deaminimą natrio bisulfitu ir vykdant jos padauginimą PGR, DNR polimerazė 5mC atpažįsta kaip C, o iš C susidariusį U – kaip T (Frommer et al., 1992). Tuo remiantis buvo sukurtas klasikinis bisulfitinės konversijos metodas, pradėjus taikyti naujos kartos sekoskaitos platformas pavadintas BS-seq (angl. bisulfite sequencing). Dėl 5mC nustatymo individualiose DNR grandinėse vienos bazės tikslumu, nepriklausomai nuo DNR sekos konteksto (Frommer et al., 1992), BS-seq buvo įvardytas auksiniu DNR metilinimo sekoskaitos standartu.

Žinduolių DNR nustačius 5hmC, buvo parodyta, kad veikiant BS jis nėra deaminamas – su bisulfitu 5hmC sudaro citozin-5-metilensulfonatą (CMS) (žr. 1.9 pav.). DNR amplifikacijos metu CMS poruojasi su G, todėl bisulfitinės konversijos metodu 5hmC tampa neatskiriamas nuo 5mC (Huang et al., 2010).

Vėliau buvo išsiaiškinta, kad 5fC ir 5caC po BS poveikio yra deamininami ir DNR polimerazė juos atpažįsta kaip T, t. y. taip pat kaip nemodifikuotą citoziną (He et al., 2011; Booth et al., 2012). Visa tai paskatino klasikinio BS-seq metodo variacijų kūrimą.



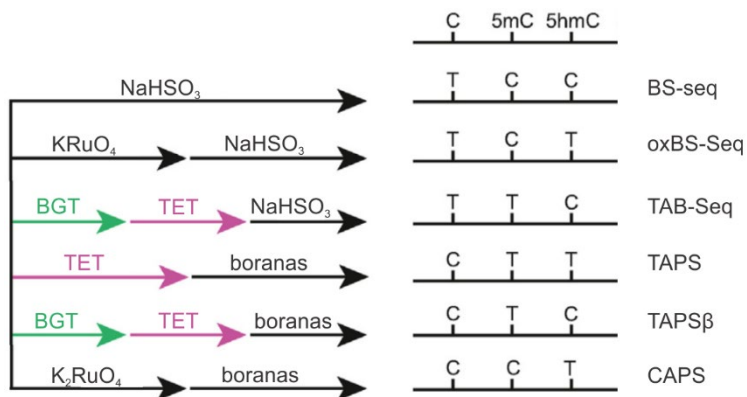
1.9 pav. Natrio bisulfito poveikis nemodifikuotam citozinui (1), 5mC (2) ir 5hmC (3), CMS – citozin-5-metilensulfonatas (pagal Kriukienė et al., 2012).

oxBS-Seq (angl. oxidative bisulfite sequencing) – selektyvus 5mC profiliavimo metodas. Jame naudojamas kalio perrutenatas (KRuO_4) selektyviai oksiduoja 5hmC iki 5fC, todėl tik 5mC lieka inertiškas toliau sekančiam BS deamininimui ir sekoskaitoje identifikuojamas kaip C (žr. 1.10 pav.) (Booth et al., 2012). Taip pat galima identifikuoti 5hmC, bet tik bioinformatiškai iš BS mėginio bibliotekos (5mC + 5hmC signalo, matomo kaip C) atėmus oxBS bibliotekos duomenis (tik 5mC signalą, matomą kaip C) (Booth et al., 2012).

TAB-Seq (angl. TET-assisted bisulfite sequencing) metodas leidžia tiesiogiai iš vienos bibliotekos identifikuoti 5hmC (žr. 1.10 pav.). 5hmC yra glikozilinamas ir taip apsaugomas nuo TET vykdomos oksidacijos, kurios metu tik 5mC virsta 5fC arba 5caC. Todėl toliau DNR paveikus natrio bisulfitu tik originaliai buvę 5hmC lieka atsparūs deamininimui ir sekoskaitoje tik jie yra perskaitomi kaip C (Yu et al., 2012).

Nors BS-seq ir jam giminingi variantai yra vertinami dėl DNR modifikacijų analizės vienos bazės skiriamąja geba, tačiau BS sukelia net iki 99 % DNR degradaciją (Zeng et al., 2019). Sulfoninant citozino bazes susidaro nestabilūs tarpiniai junginiai ir susiformuoja abazinės DNR vietos, kurių dažnis gali viršyti net 1 iš 200 DNR bazių, o tai sukelia DNR grandinių trūkius (Wang et al., 2022). Todėl BS-seq reikia daug pradinės DNR ir metodas ne visada pritaikomas klinikiams mėginiams su labai ribotu DNR

kiekiu. Mažų DNR kiekių problemos sprendimui buvo pasiūlytas naujas 5mC-WGA (angl. 5mC-retained whole-genome amplification) DNR amplifikavimo metodas, išsaugantis originalias 5mC genomines vietas (Liu et al., 2020a). Vykdamas izoterminę DNR amplifikaciją su phi29 DNR polimeraze, naujai susidariusius hemimetilintus CG taikinius metilina DNMT1, tokiu būdu išlaikant metilinimo informaciją padauginant pradinę DNR ≥ 100 kartų (Liu et al., 2020a).

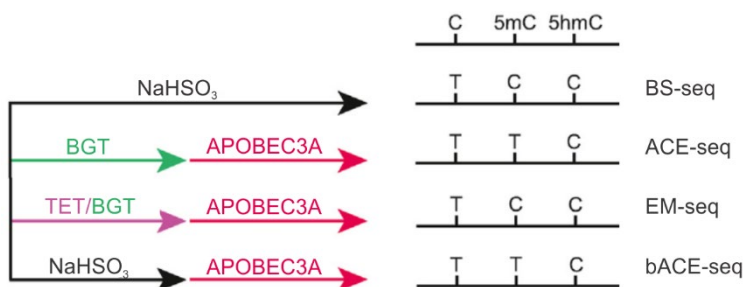


1.10 pav. 5mC ir 5hmC genomino profiliavimo metodų, paremtų cheminiu deaminimu, schemas (modifikuota pagal Wang et al., 2022).

Taip pat BS konversija dėl nemodifikuotų C virsmo į T sumažina DNR sekų kompleksškumą ir didina sekos skirtumų kiekį tarp tiriamojo ir referentinio genomo, kas sumažina atpažintų ir sugretintų DNR sekų kiekį sekoskaitos analizėje (Zeng et al., 2019; Beck et al., 2022). Todėl buvo pasiūlyti metodai, kuriuose chemiškai deamininami tik modifikuoti citozinai. Pavyzdžiui, TAPS (angl. TET-assisted pyridine borane sequencing) metode TET katalizuojamos oksidacijos metu 5mC ir 5hmC virsta į 5fC arba 5caC, kurie paveikus su piridino boranu virsta dihidrouracilais, sekoskaitoje perskaitomais kaip T (žr. 1.10 pav.) (Liu et al., 2019b). Giminingas TAPSβ (angl. TAPS with β-glucosyltransferase blocking) metodas yra specifiškas 5mC, nes 5hmC yra apsaugomas nuo TET oksidacijos jį glikozilinant, todėl po borano poveikio tik su 5mC yra stebimas C→T virsmas (žr. 1.10 pav.) (Liu et al., 2019b, 2021b). CAPS (angl. chemical-assisted pyridine borane sequencing) metodas leidžia nuskaityti tik 5hmC, jį atrankiai oksiduojant su K₂RuO₄ iki 5fC, ir tokiu būdu po borano deaminavimo tik 5hmC modifikacijos yra nuskaitytos kaip T (žr. 1.10 pav.) (Liu et al., 2019b, 2021b).

1.1.4.3. Citozino fermentinio deaminavimo metodai

Siekiant išvengti BS sukkelto DNR degradavimo, buvo pasiūlytas fermentinis DNR deaminavimas su AID/APOBEC citidino deaminazių šeimos baltymais. ACE-seq (APOBEC-coupled epigenetic sequencing) metodas yra skirtas specifiškam 5hmC profiliavimui vieno nukleotido tikslumu (Schutsky et al., 2018). Jame 5hmC yra glikozilinami, taip dėl sterinių efektų apsaugant nuo APOBEC3A deaminavimo iki U, kuris paveikia nemodifikuotą C ir 5mC, o tai leidžia sekoskaitoje kaip C perskaityti tik 5hmC (žr. 1.11 pav.) (Schutsky et al., 2018; Li et al., 2021b). bACE-seq (angl. bisulfite ACE-seq) yra jungtinis BS-seq ir ACE-seq metodas (žr. 1.11 pav.), kuriame DNR pirmiausiai paveikiama natrio bisulfitu, o tuomet deaminazės fermentu (Caldwell et al., 2021; Fabyanic et al., 2021). To privalumas – nuo BS poveikio iš karto sufragmentuojama DNR ir paverčiama viengrandine, kurios reikia APOBEC3A aktyvumui. Tada panaudojus deaminazę, C ir 5mC virsta į U, o iš 5hmC susidaręs CMS tam yra atsparus, todėl šis metodas yra skirtas būtent 5hmC analizei (Caldwell et al., 2021).



1.11 pav. 5mC ir 5hmC nustatymo metodų, paremtų fermentiniu deaminavimu, schemas; palyginimui pateiktas cheminio deaminavimo – bisulfitinės konversijos BS-seq (modifikuota pagal Wang et al., 2022).

EM-seq (angl. enzymatic methyl-seq) leidžia kartu analizuoti 5mC ir 5hmC – tai atitinka BS-seq duomenis (žr. 1.11 pav.), tačiau yra visiškai fermentinis metodas, išvengiantis DNR degradacijos, todėl gaunami tolygesni genomo padengimai su mažesniais pradinės DNR kiekiais. Šiame metode 5mC ir 5hmC yra apsaugomi nuo deaminavimo: TET oksiduoja 5mC iki 5caC, kuris nėra APOBEC3A substratas, o 5hmC yra glikozilinamas, todėl APOBEC3A deaminina tik nemodifikuotus C ir pastarieji sekoskaitoje yra atpažįstami kaip T, o 5mC ir 5hmC – kaip C (Vaisvila et al., 2021).

1.1.4.4. Baltymų afiniškumu paremti metodai

Visi citozino deamininimu paremti metodai DNR modifikacijų profiliavimui naudoja viso genomo sekoskaitą, kuri šiuo atveju yra labai neekonomiška, nes, pavyzdžiui, BS-seq net ~65 % nuskaitymų neturi CG sekų (Ziller et al., 2013). Todėl nuo pat šių metodų atsiradimo buvo kuriami jiems alternatyvūs pigesni metodai, kuriuose dominančias C modifikacijas turintys DNR fragmentai yra praturtinami, kas leidžia nuskaityti ne visą tiriamąjį genomą, o tik informatyvias DNR sekas. Tiesa, tokios metodikos negali suteikti informacijos apie individualių CG modifikavimo lygį – praturtinimu paremtais metodais sudarytiems DNR modifikavimo genolapiams būdinga maža, ~200-400 bp, skiriamoji geba (pagal naudojamos fragmentuotos DNR dydžius) (Hofer et al., 2019).

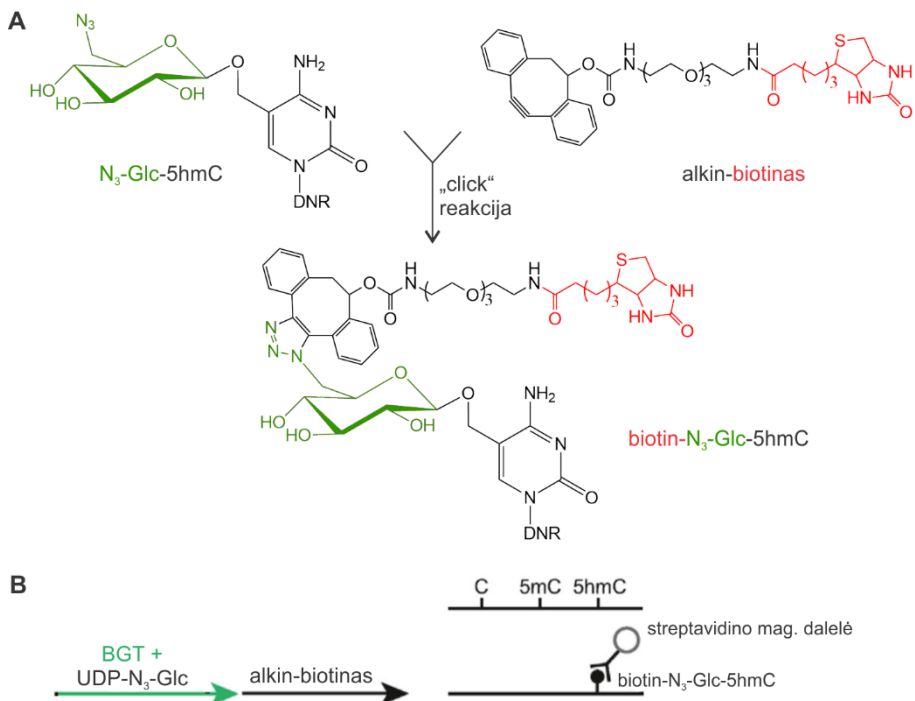
(h)MeDIP-Seq (angl. (hydroxy)-methylated DNA immunoprecipitation followed by sequencing) metode fragmentuota DNR yra praturtinama su 5mC arba 5hmC specifiniais IgG antikūnais ir nuskaityta, kas leidžia atlikti šių modifikacijų genominių profiliavimą (Ficz et al., 2011). Tačiau 5mC specifiniai antikūnai geriau praturtina žemo CG tankio regionus (Nair et al., 2011), o 5hmC specifiniai antikūnai turi polinkį praturtinti stipriai modifikuotus regionus (Ko et al., 2010). Taip pat yra pasiūlytos metodikos, panaudojančios antikūnus prieš glikozilintus 5hmC ir CMS – citozin-5-metilensulfonata, kuris susidaro 5hmC paveikus natrio bisulfitu (žr. 1.9 pav.) (Hofer et al., 2019). Deja, visi IgG antikūnai turi tendenciją jungtis prie nemodifikuotų trumpų tandeminių pasikartojimų (Lentini et al., 2018) ir jiems būdingas kryžminis aktyvumas, duodantis didelius foninius signalus, bei efektyvumo skirtumai tarp gamybos partijų (Zeng et al., 2019).

Kaip alternatyva antikūnams yra naudojami MBD šeimos baltymai arba tik jų metil-CG jungiantys domenai. Pavyzdžiui, MBD-seq metode metilintos DNR sekos yra praturtinamos pritaikant rekombinantinį metil-CG jungiantį domeną iš MBD2 baltymo (Serre et al., 2010). Tačiau MBD prie DNR didesniu afiniškumu jungiasi esant keliems 5mC šalia, todėl labiau praturtinami stipriau metilinti DNR regionai (Serre et al., 2010).

1.1.4.5. Fermentinio kovalentinio modifikavimo ir praturtinimo metodai

Siekiant išvengti citozino modifikacijas atpažįstančių afininių baltymų šališkumą, yra kuriami metodai, kuriuose dominančias C modifikacijas turintys DNR fragmentai yra praturtinami prieš tai juos specifiskai kovalentiškai pažymėjus. Pavyzdžiui, hMe/hmC-Seal (angl. 5hmC selective chemical labeling) metode 5hmC yra glikozilinamas su chemiskai modifikuota gliukoze, turinčia azidinę grupę (6-N₃-gliukoze, N₃-Glc).

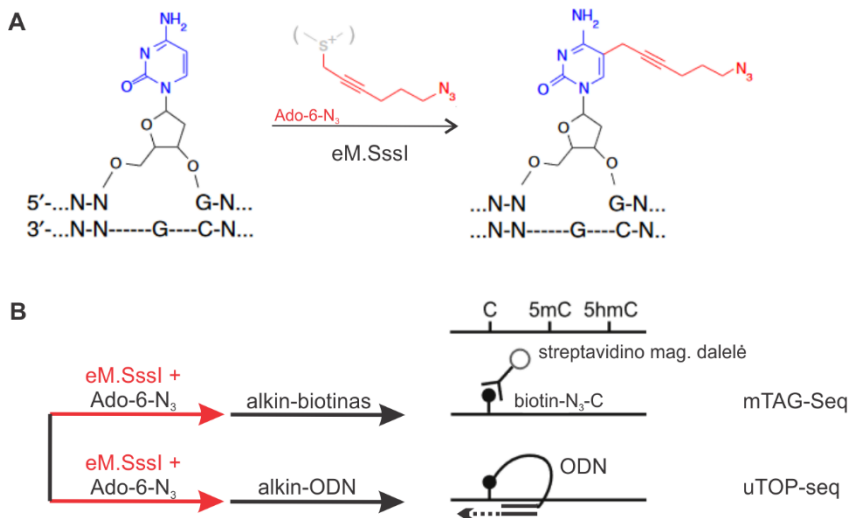
Pritaikius Huisgen azido-alkino ciklizaciją (angl. vadinamą „click“ reakciją), yra įvedamas biotinas, leidžiantis praturtinti ir vėliau nuskaityti hidroksimetilintas DNR sekas (žr. 1.12 pav.) (Song et al., 2011a).



1.12 pav. 5hmC turinčių DNR fragmentų praturtinimas po kovalentinio 5hmC žymėjimo. A) „Click“ reakcijos schema. Prie azidine gliukoze modifikuoto 5hmC (N_3 -Glc-5hmC) yra prijungiamas alkin-biotino reagentas, pavyzdžiui, DBCO-PEG₃-biotinas (pagal Song et al., 2011a). B) hmC-Seal metodo schema. Azidine gliukoze ir biotinu žymėtus 5hmC (biotin- N_3 -Glc-5hmC) turintys DNR fragmentai praturtinami su streptavidinu dengtomis magnetinėmis dalelėmis (modifikuota pagal Wang et al., 2022).

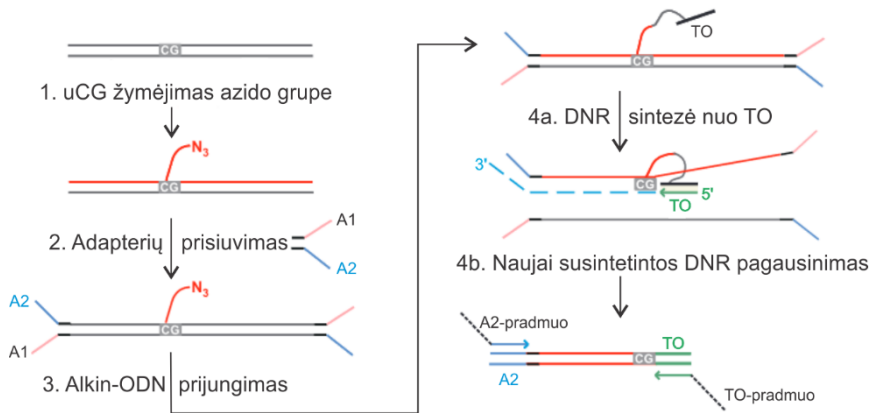
Kadangi žinduolių genome 70-80 % CG sekų yra metilintos (žr. 1.1.3. skyrelį), alternatyvi 5mC tyrimų koncepcija yra mažesniosios dalies, t. y. nemodifikuotų CG sričių, analizė (Kriukienė et al., 2013). mTAG-Seq (angl. methyltransferase-directed transfer of activated groups followed by sequencing) metodas paremtas mutantinės metiltransferazės SssI vykdomu C alkilimu (šiuo atveju, azidimu) CG sekose, panaudojant sintetinį kofaktoriaus AdoMet analogą Ado-6- N_3 , turintį šoninę grandinę su azido grupe (žr. 1.13 A pav.). Tai leidžia prie azidinto citozino „click“ reakcijos metu prijungti biotino reagentą ir praturtinti bei nuskaityti nemodifikuotas

genominės CG sekas turinčius DNR fragmentus (žr. 1.13 B pav.) (Kriukienė et al., 2013).



1.13 pav. Nemodifikuotų CG sekų analizė. A) Mutantinės MTazės Sssl (eM.Sssl, angl. engineered MTase Sssl) vykdoma citozino azidinimo reakcija CG sekose, naudojant sintetinį kofaktorių Ado-6-N₃ (modifikuota pagal Kriukienė et al., 2013). B) Nemodifikuotų CG sekų tyrimo metodų schemas. Biotin-N₃-C – citozinas, prie kurio kovalentiškai prijungta azido grupė ir biotinas, alkin-ODN – alkinio grupę turintis oligodeoksiribonukleotidas (modifikuota pagal Wang et al., 2022).

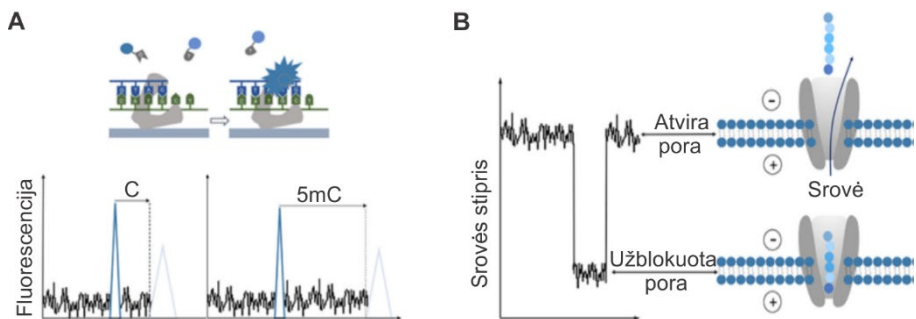
Tačiau visiems DNR modifikacijų genolapiams, sudarytiems naudojant praturtintus DNR fragmentus, buvo būdinga maža skiriamoji geba. Todėl siekiant DNR nemodifikuotas CG sekas tirti vienos bazės tikslumu, mūsų tyrėjų grupė pasiūlė uTOP-seq (angl. unmodified CG-specific tethered oligonucleotide-primed sequencing) metodą, pagrįstą DNR žymėjimu paremta sekoskaita (žr. 1.14 pav.) (Staševskij et al., 2017). Pritaikant mTAG strategiją yra azidinamos CG sekos, prie kurių „click“ reakcijos metu prijungiamas oligodeoksiribonukleotidas (ODN) (žr. 1.13 B, 1.14 pav.). Panaudojant jam komplementarų pradmenį vykdoma naujos DNR grandinės sintezė nuo žymėto C. Naujasis DNR grandines amplifikavus ir atlikus jų sekoskaitą, nustatomos tikslios nemodifikuotų CG sekų genominės pozicijos (Staševskij et al., 2017). Tiesa, uTOP-seq, nors pasižymi labai didele skiriamąja geba, kaip ir kiti DNR praturtinimo metodai leidžia nustatyti tik santykinius C modifikavimo lygius (Staševskij et al., 2017; Wang et al., 2022).



1.14 pav. Detali uTOP-seq metodo schema. 1) Azidinama nemodifikuota CG (angl. unmodified, uCG) seka, 2) prisiuvtami A1/A2 adapteriai, 3) prijungiamas alkinų grupę turintis ODN, 4a) prijungtas ODN (angl. tethered oligodeoxyribonucleotide, TO) naudojamas DNR sintezei nuo žymėtos CG sekos, 4b) naujai susintetinta DNR pagausinama naudojant pradmenis, komplementarius A2 ir TO sekoms (modifikuota pagal Staševskij et al., 2017).

1.1.4.6. Vienos molekulės metodai

Pastaruoju metu vis didesnis dėmesys skiriamas DNR modifikacijų nustatymui trečios kartos tiesioginės DNR sekoskaitos metodais: SMRT (angl. single-molecule real-time) ir nanoporų sekoskaita (žr. 1.15 pav.). SMRT sekoskaitoje yra stebima gardelėje imobilizuota DNR polimerazės molekulė, katalizuojanti DNR grandinės sintezę, kurios metu yra įjungiami skirtingų spalvų fluorescuojantys nukleotidai ir pagal tai nustatoma DNR seka. SMRT leidžia aptikti C modifikacijas remiantis DNR polimerazės kinetikos pokyčiu DNR sintezės metu (Zeng et al., 2019; Liu et al., 2021c). Nanoporų sekoskaitos metodas pagal elektros srovės įtampos svyravimus tiesiogiai detektuoja viengrandinės DNR seką, jai keliaujant per nanoporos jutiklį. DNR modifikacijas galima aptikti pagal elektros srovės pokyčius tarp nemodifikuotos ir modifikuotos bazės (Zeng et al., 2019; Liu et al., 2021c). Sėkmingai modifikuotos žmogaus DNR sekoskaitai yra pritaikomi statistiniai ir mašininio mokymosi modeliai, leidžiantys vienos molekulės 5mC ir 5hmC analizę vienos bazės tikslumu (Simpson et al., 2017; Liu et al., 2021c). Nors SMRT ir nanoporų sekoskaitos metodai kol kas pasižymi mažu našumu ir dideliu klaidų skaičiumi, jų privalumas – nevykdoma DNR amplifikacija prieš sekoskaitą, todėl galimi ilgų sekų nuskaitymai bei genomo ir epigenomo analizė vienu metu (Zeng et al., 2019; Liu et al., 2020b).



1.15 pav. Vienos molekulės DNR sekoskaitos metodai. A) SMRT metode nukleotidų įjungimo į sintetinamą DNR grandinę metu registruojama fluorescencija. Citozino modifikacijos pakeičia trukmę tarp stebimų fluorescencijos signalų. B) Nanoporų sekoskaitos metode DNR bazės identifikuojamos pagal skirtingus elektros srovės pokyčius DNR molekulei keliaujančiai per porą (modifikuota pagal Du et al., 2020).

1.2. Neuroblastoma

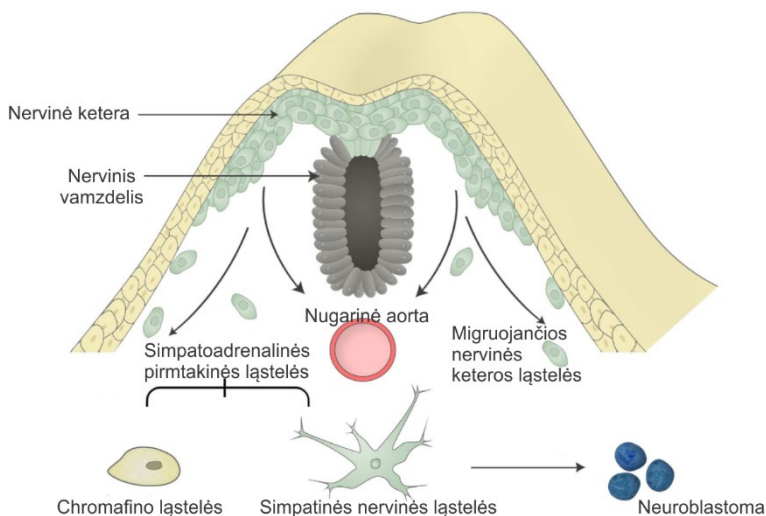
Neuroblastoma (NB) susidaro besivystančioje simpatinėje nervų sistemoje ir yra dažniausias bei mirtingiausias ne kaukolėje aptinkamas (nekranialinis) naviką formuojantis vaikų vėžys (Johnsen et al., 2019). Neuroblastomos išskirtiniai bruožai yra klinikinis heterogeniškumas nuo spontaninių navikų regresijų iki sunkios būklės stipriai išplitusių auglių, fenotipinė įvairovė bei plastiškumas tarp skirtingų NB ląstelių būsenų (Gautier et al., 2021).

1.2.1. Neuroblastomos apibrėžimas ir kilmė

Neuroblastoma yra agresyvus pediatriškas periferinės simpatinės nervų sistemos vėžys. Nors NB yra santykinai reta liga, paveikianti 1 iš 8 000 kūdikių, kas sudaro 6-10 % visų pediatriškas vėžinių susirgimų, tačiau mirtingumas vaikų tarpe siekia net 12-15 % atvejų, siejamų su vėžiu (Johnsen et al., 2019; Gautier et al., 2021; Otte et al., 2021). 40 % pacientų NB diagnozuojama iki 1 metų amžiaus, mediana yra 17-18 mėnesių, ir tik mažiau nei 5 % pacientų yra vyresni nei 10 metų amžiaus (Johnsen et al., 2019; Otte et al., 2021).

NB yra kliniškai heterogeniška liga, kuriai būdingas platus spektras patologijų, varijuojančių nuo auglių, kurie spontaniškai sunyksta arba diferencijuojasi be jokio gydymo, iki gydymui atsparių metastazuojančių auglių net taikant multimodalinę terapiją (Gautier et al., 2021; Otte et al., 2021). Šis heterogeniškumas atsispindi ir pacientų išgyvenamume: mažos ir vidutinės rizikos NB ligoniams būdingas 85-90 % išgyvenamumas, o aukštos rizikos pacientams – tik iki 50 % (Johnsen et al., 2019; Otte et al., 2021).

Neuroblastoma išsivysto iš nervinės keteros – trumpalaikės struktūros embriogenezės metu, sudarytos iš multipotentinių pirmtakinių ląstelių (žr. 1.16 pav.). Nervinės keteros ląstelėse vyksta epitelinė-mezenchiminė tranzicija (EMT) ir jos migruoja į tolimesnes embriono vietas, kur diferencijuoja į įvairius ląstelių tipus: periferinės nervų sistemos, odos pigmentines, lygiųjų raumenų, priekinės kaukolės dalies kaulų ląsteles, odontoblastus, adipocitus (Huertas-Castaño et al., 2020; Otte et al., 2021). Nors tiksli NB ląstelė-pirmtakė dar nenustatyta, bet pagal dabar turimus duomenis manoma, kad tai galėtų būti simpatoadrenalinės pirmtakinės ląstelės, kurios gali diferencijuoti į simpatines nervines ląsteles ir antinksčių katecholaminą išskiriančias chromafino ląsteles (žr. 1.16 pav.) (Jansky et al., 2021; Otte et al., 2021). O spontaninė NB naviko regresija primena simpatoadrenalinio vystymosi pabaigoje vykstančią perteklinių nervinės keteros pirmtakinių ląstelių apoptozę (Johnsen et al., 2019).



1.16 pav. Neuroblastomos išsivystymas iš nervinės keteros. Embriogenezėje iš nervinio vamzdelio susiformuoja nervinė ketera, kurios ląstelės migruoja ir diferencijuoja į įvairius ląstelių tipus, pavyzdžiui, simpatoadrenalines pirmtakines ląsteles. Manoma, kad iš jų dėl genetinių ir epigenetinių pokyčių išsivysto neuroblastoma (modifikuota pagal Johnsen et al., 2019).

Klinikinėje praktikoje NB diagnozuojama atliekant laboratorinius kraujo ir šlapimo testus (pavyzdžiui, katecholamino metabolitai aptinkami beveik visų sergančiųjų šlapime), radiologinius naviko tyrimus ir biopsijų histopatologinius bei genetinius įvertinimus (Matthay et al., 2016; Qiu ir Matthay, 2022). NB augliai dažniausiai aptinkami antinksčiuose, tačiau taip pat gali susidaryti bet kur nuo kaklo iki dubens palei simpatinių nervų grandinę, o

metastazės paprastai stebimos limfiniuose mazguose, kaulų čiulpuose, kepenyse ir odoje (Matthay et al., 2016).

Tarptautinė neuroblastomos rizikos vertinimo sistema NB navikus skirsto į labai žemos, žemos, vidutinės ir aukštos rizikos pagal vėžio stadiją, paciento amžių diagnozės metu, auglio histologiją ir genetines mutacijas (Cohn et al., 2009). NB yra klasifikuojama į subtipus pagal histologinius duomenis, kur labai svarbus yra ląstelių diferenciacijos įvertinimas – mažo laipsnio diferenciacija yra siejama su prasta klinicine prognoze (Campos Cogo et al., 2020). Ir iš tiesų, aukštos rizikos NB augliuose dominuoja nesubrendusios, o žemos rizikos – labiau subrendusios neuroblastus primenančios ląstelės (Jansky et al., 2021; Kameneva et al., 2021).

1.2.2. Molekuliniai NB patogenezės mechanizmai

Chromosomų analizė – vienas iš svarbiausių kriterijų, skirstant NB pacientus į mažos ir didelės rizikos grupes. Žemos rizikos NB augliuose dažnai stebimos visos chromosomos amplifikacijos – hiperploidinės (triploidinės-heksaploidinės) chromosomos, o aukštos rizikos NB būdingi segmentiniai chromosomų pakitimai, iš kurių dažniausi yra 17q įgijimas, 1p ir 11q delecijos, 2p amplifikacija, kuriame yra N-MYC transkripcijos veiksnio *MYCN* ir tirozino kinazės *ALK* (angl. anaplastic lymphoma kinase) genai (Johnsen et al., 2019; Otte et al., 2021).

Viena iš NB vystymosi hipotezių nurodo, kad vykstant segmentiniams chromosomų praradimams yra inaktyvinami vėžį slopinantys genai. Pavyzdžiui, 1p regione yra chromatino pertvarkos baltymo *ARID1A* genas, kurio sutrikusi funkcija paspartina N-MYC nulemtą naviko formavimąsi (Durinck ir Speleman, 2018; Qiu ir Matthay, 2022). Taip pat 1p regione yra kitas svarbus NB vėžį slopinantis genas *CHD5*, koduojantis chromatino pertvarkos baltymą, siejamą su nervų sistemos vystymusi (Campos Cogo et al., 2020).

Taip pat manoma, kad chromosomų struktūriniai pertvarkymai gali pakeisti stipriklių architektūrą. Pavyzdžiui, genominiai persigrupavimai 5p regione nulemia super-stipriklio pozicionavimą šalia *TERT* (telomerazės atvirkštinės transkriptazės) geno, ir tampa *TERT* perraiškos priežastimi (Otte et al., 2021; Qiu ir Matthay, 2022). Įdomu tai, kad spontaninė NB regresija yra stebima galimai dėl nevykstančio telomerų palaikymo (George et al., 2020).

MYCN geno amplifikavimas, vienas iš stipriausių NB prognozinių žymenų, stebimas 20-30 % pacientų ir jų išgyvenamumas yra mažiau nei 50 % (Otte et al., 2021). Tačiau yra ir kitų reikšmingų amplifikacijų: 5p regiono,

kuriame yra *TERT* genas, 12q regiono, lemiančio protoonkogenų *CDK4* (nuo ciklinų priklausomos kinazės) ir *MDM2* (ubikvitino ligazės) perraishką ir siejamo su ypač prasta kliniskine baigtimi (Depuydt et al., 2018; Qiu ir Matthay, 2022).

Tačiau nevisų chromosominių aberacijų molekuliniai mechanizmai, lemiantys NB vystymąsi, yra tiksliai žinomi. Pavyzdžiui, nėra aišku dėl dažnai aptinkamos 11q delecijos, nors manoma, kad poveikis galėtų būti stebimas dėl histonų varianto H2AX geno delecijos, lemiančios chromosomų nestabilumą, arba *SDHD* (sukcinato dehidrogenazės subvieneto D), kurio delecija sutrikdo Krebso ciklą (Fieuw et al., 2012).

Pediatriniai vėžiai, priešingai nei suaugusiųjų, išsivysto per trumpą laiką ir turi ženkliai mažiau chromosominių aberacijų bei DNR mutacijų. NB vidutinis mutacijų dažnis yra 0,23 mutacijos per 1 Mb, o suaugusiųjų navikuose – 1,8 (Oh et al., 2019). Tiesa, įvykus NB atkryčiui, stebimas padidėjęs genetinių aberacijų ir mutacijų kiekis (Schramm et al., 2015; Fransson et al., 2020).

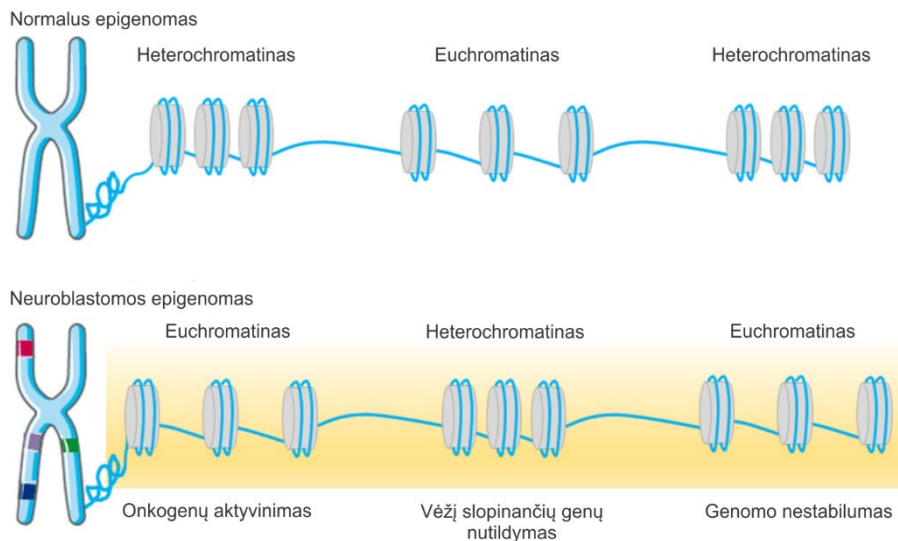
Pirminių NB navikų ląstelėse dažniausiai aptinkamos *ALK* geno mutacijos – kinazę aktyvinančios mutacijos stebimos 6-12 % NB atvejų. *ALK* stimuliuoja ląstelės ciklo progresavimą veikdama MAPK signalinį kelią ir taip skatina NB proliferaciją (Qiu ir Matthay, 2022). Chromatino pertvarkos baltymo ATRX inaktyvinančios mutacijos, nulemiančios telomerų ilgėjimą, yra aptinkamos ~2,5 % visų ir ~10 % aukštos rizikos NB atvejų (Johnsen et al., 2019; Qiu ir Matthay, 2022). Funkcijos praradimą lemiančios *PHOX2B*, transkripcijos veiksnio, reguliuojančio neuronų diferenciaciją, mutacijos randamos 4 % aukštos rizikos NB. Taip pat 1-2 % visų NB atvejų sutinkamos vėžį slopinančio p53 *TP53* geno mutacijos (Johnsen et al., 2019). Tačiau nėra nė vienos DNR mutacijos, kuri galėtų paaiškinti visų NB navikų išsivystymą (Otte et al., 2021), ir tik 40 % NB atvejų yra aptinkama „varančioji“ geno mutacija ar aberacija, todėl manoma, kad likę NB atvejai galėtų būti nulemti epigenetinių mechanizmų (Huang et al., 2021).

1.2.3. Neuroblastomos epigenomo pokyčiai

Žmogaus augliuose labai dažnai stebimi įvairūs epigenomo pokyčiai (Baylin ir Jones, 2016), ne išimtis yra ir neuroblastoma. Manoma, kad NB vėžio vystymasis ir fenotipas didele dalimi yra nulemiami epigenetiniu perprogramavimu (Durinck ir Speleman, 2018).

Vėžio epigenomo pokyčiai paprastai siejami su lokaliu DNR hipermetiliniu, lemiančiu vėžį slopinančių genų nutildymą, ir globaliu hipometiliniu, aktyvinančiu onkogenus ir sukeliančiu genomo nestabilumą

(žr. 1.17 pav.) (Fetahu ir Taschner-Mandl, 2021). Pavyzdžiui, *CHD5* promotoriaus hipermetilinimas lemia šio NB slopinančio geno raiškos sumažėjimą, o onkogenų ciklino *CCND1* ir helikazės *DDX43* raiškos padidėjimas yra susietas su DNR hipometilinimu (Gómez et al., 2015; Henrich et al., 2016). Taip pat DNR metilinimo pokyčiai stebimi NB vystymuisi svarbiuose *TERT* ir *ALK* genuose (Gómez et al., 2015; Olsson et al., 2016). Panaudojant NB navikų DNR metilinimo informaciją, galima atlikti pacientų skirstymą į rizikos grupes, kas ateityje gali pasitarnauti veiksnau gydymo skyrimui (Henrich et al., 2016; Zhao et al., 2020a).



1.17 pav. NB ląstelių epigenomas. NB ląstelėse pakinta DNR metilinimas, euchromatino ir heterochromatino išsidėstymas, kas nulemia pakitusią genų raišką ir prisideda prie NB ląstelių proliferacijos (modifikuota pagal Fetahu ir Taschner-Mandl, 2021).

Taip pat NB vėžio reguliacinių baltymų raiška kinta dėl chromatino struktūros pokyčių, nulemtų sutrikusio histonus (de)acetilinančių ir (de)metilinančių fermentų aktyvumo (Durinck ir Speleman, 2018; Fetahu ir Taschner-Mandl, 2021). Be to, genų reguliacijoje dalyvauja mažosios nekoduojančiosios RNR (miRNR), kurių analizė leidžia klasifikuoti NB auglius į rizikos grupes ir nuspėti pacientų išgyvenamumą (Fetahu ir Taschner-Mandl, 2021). NB išsivystymui yra svarbios ir ilgosios nekoduojančiosios RNR (lncRNR), kurios gali atlikti tiek onkogenines (pavyzdžiui, *MALATI*), tiek ir vėžį slopinančias (kaip *NBAT1*) funkcijas (Chi et al., 2019).

Mūsų vykdomų NB ląstelių tyrimų metu pasirodė duomenys, kad mažos klinikinės rizikos NB augliams būdingas didesnis 5hmC kiekis nei didelės rizikos navikams (Applebaum et al., 2019). Taip pat apibūdintas 5hmC prognostinis potencialas – pagal jo profilius NB auglius galima suskirstyti į palankios ir nepalankios klinikinės baigties grupes. Funkcinė genų praturtinimo analizė atskleidė, kad pirmajai grupei būdingi stipriau hidroksimetilinti genai buvo praturtinti neuronų diferenciacijos procesuose, kurie siejami su žema NB rizika, o antrajai grupei – uždegiminio atsako keliuose (Applebaum et al., 2019). Tačiau dar labai trūksta duomenų apie detalesnę 5hmC reikšmę NB patogenezėje, kuri vis dar nėra atskleista.

Šiuo metu NB pacientų klinikinė rizika vertinama pagal auglių fenotipinius ir genetinius bruožus. Tačiau tai pačiai rizikos grupei priskiriami NB atvejai pasižymi skirtingomis baigtimis, kas rodo, kad esami kriterijai yra nepakankami (Zhao et al., 2020a). Besikaupiantys duomenys rodo, kad NB patogenezei būdingi epigenomo pokyčiai, ir būtent jie galėtų tapti jautriais NB diagnostiniais ir prognostiniais biožymenimis (Durinck ir Speleman, 2018; Zhao et al., 2020a).

1.2.4. Neuroblastomos gydymas

Neuroblastomos gydymo strategija tiesiogiai priklauso nuo to, kokiai rizikos grupei yra priskiriamas navikas. Mažos rizikos NB atveju gali būti paskirtas tik paciento stebėjimas, nestipri chemoterapija arba tik operacinis gydymas (Johnsen et al., 2019; Qiu ir Matthay, 2022). Vidutinės ir aukštos rizikos NB pacientams skiriama chemoterapija, po kurios atliekamas operacinis likusio naviko pašalinimas (Johnsen et al., 2019). Aukštos rizikos pacientams papildomai taikoma radioterapija, imunoterapija ir gydymas 13-cis-retinoine rūgštimi (RA) (Johnsen et al., 2019). Nors NB terapijai tiktų ir 13-cis-retinoinė, ir trans-retinoinė rūgštys, tačiau klinikoje naudojama tik 13-cis RA dėl mažesnio lipofiliškumo ir ilgesnės gyvavimo trukmės *in vivo* (Halakos et al., 2019).

RA yra gerai žinomas diferenciacijos agentas, mažinantis ląstelių kamieniškumą (Halakos et al., 2019; Campos Cogo et al., 2020). RA stabdo NB ląstelių proliferaciją ir sukelia neuritų susiformavimą ir augimą, kas laikoma labai svarbiu neuroninės diferenciacijos požymiu (Bayeva et al., 2021; Zimmerman et al., 2021). RA poveikyje stebima įvairių genų promotorių metilinimo ir jų raiškos pokyčiai (Durinck ir Speleman, 2018). RA lemia NB proliferacijos *MYCN*, *GATA3*, *PHOX2B* genų slopinimą ir diferenciacijos žymenų *MEIS1*, *SOX4*, *ACHE* (acetilcholinesterazės), *RAR* (RA receptoriaus) raiškos padidėjimą (Bayeva et al., 2021; Zimmerman et al.,

2021). Taip pat RA slopina HDAC veikimą (Bahmad et al., 2019) ir padidina CHD5 raišką (Higashi et al., 2015), kas prisideda prie NB diferenciacijos. Be to, RA poveikyje padaugėja baltymų, susijusių su ląsteliniu senėjimu, o sumažėja dalyvaujančių kolageno metabolizme, kuris yra susietas su vėžio vystymusi (Halakos et al., 2019).

Tyrimai su NB ląstelių linijomis parodė, kad DNR metilinimo sumažėjimas dėl poveikio DNMT slopikliais, pavyzdžiui, 5-aza-dC, slopina ląstelių proliferaciją ir padidina chemoterapinių bei retinoidinių vaistų poveikį (Fetahu ir Taschner-Mandl, 2021; Hattori et al., 2021). Analogiški rezultatai gauti slopinant histonų deacetilazių (HDAC) aktyvumą, todėl šiuo metu yra vykdomi DNMT ir HDAC slopiklių klinikiniai tyrimai (Fetahu ir Taschner-Mandl, 2021). Taip pat NB klinikiniai tyrimai vykdomi su ALK, MDM2, netiesioginiais MYC ir N-MYC reguliacinių kelių slopikliais (Qiu ir Matthey, 2022).

Tačiau dėl didelės NB genetinės ir ląstelinės įvairovės standartinis gydymas gali būti neefektyvus, todėl labai svarbu suprasti neuroblastomos heterogeniškumą ir įvairius atsparumo mechanizmus, lemiančius gydymo nesėkmes (Campos Cogo et al., 2020).

1.2.5. NB ląstelių įvairovė

Neuroblastomos heterogeniškumas pradėtas tyrinėti prieš 4 dešimtmečius, pastebėjus, kad iš pacientų NB išvestos ląstelių linijos sudarytos iš fenotipiškai skirtingų ląstelių *in vitro*. Tuomet buvo išskirti trys ląstelių tipai: N-tipas (pagal angl. neuroblast), S-tipas (pagal angl. substrate-adherent) (žr. 1.18 A pav.) ir I-tipas (angl. intermediate) (Ross et al., 1983, 1995). N-tipo ląstelės yra mažos ir apvalios, turi ilgą ploną ataugą, auga silpnai prikibusios prie paviršiaus ir yra apibūdinamos kaip nesubrendusios nervinės ląstelės. S-tipo ląstelės yra didelės ir plokščios, auga stipriai prikibusios prie paviršiaus, nesuformuoja auglių imunodeficitinėse pelėse (Ross et al., 1995, 2003; Spengler et al., 1997) ir apibūdinamos kaip panašios į melanocitus, Švano, glijos, smegenų dangalų, lygiųjų raumenų ar mezenchimines ląsteles (Gautier et al., 2021). I-tipas yra agresyviausios tarpinių charakteristikų ląstelės, galinčios virsti į N- ir S-tipus ir atspindinčios tarpinę ląstelių būseną tarpląsteliniuose virsmuose, arba tai galėtų būti NB kamieninės ląstelės (žr. 1.18 B pav.) (Ciccarone et al., 1989; Ross et al., 2003; Walton et al., 2004).

N-tipo ląstelėms būdinga neuroninių filamentų raiška ir aktyvūs neurosiuntiklių fermentai dopamino β -hidroksilazė (DBH) ir tirozino hidroksilazė (TH). S-tipas pasižymi mezenchiminių ląstelių citoskeleto baltymo, svarbaus migracijai, vimentino (VIM), glikobaltymo CD44 ir

fibronektino, atsakingų už ląstelių adheziją ir sąveiką su tarpląstelinio užpildu, raiška (Campos Cogo et al., 2020; Gautier et al., 2021). Taip pat N- ir S-tipo ląstelės skiriasi įvairių miRNR raiška, kurios galimai nulemia ląstelių identitetus ir reguliuoja jų vėžiškumą (Samaraweera et al., 2014).



1.18 pav. NB ląstelių tipai. A) N-tipo ląstelėms būdingi neuritai, jos yra mažos ir apvalios; S-tipo ląstelės yra didelės ir plokščios, panašios į mezenchiminės ląstelės, mastelis – 10 μm (pagal Foley et al., 1991). B) I-tipo ląstelėms būdingos N- ir S-tipo savybės. Manoma, kad jos gali virsti į kitus tipus ir yra tarpląstelinio virsmų tarpininkės. Kita vertus, jos gali būti kamieninės ląstelės, iš kurių kyla N- ir S-tipai (modifikuota pagal Ciccarone et al., 1989).

I-tipo ląstelėms būdingi kamieninių ląstelių žymenys CD133, c-KIT, NOTCH1, ir pažengusios stadijos aukštos rizikos bei atkryčio NB navikuose randama daugiau ląstelių, atitinkančių I-tipo charakteristikas, nei žemos rizikos augliuose (Walton et al., 2004; Ross et al., 2015; Veschi et al., 2019). Įdomu tai, kad I-tipo ląstelės veikiant su RA pasiekama terminalinė neuroninė diferenciacija, o veikiant su bromodeoksiuridinu (BrdU) – indukuojamas S-tipo fenotipas (Ross et al., 1995; Walton et al., 2004), kas parodo I-tipo ląstelių multipotentiškumą, būdingą kamieninėms ląstelėms (Farina et al., 2021).

Naujausi transkriptominiai ir epigenetiniai super-stipriklių tyrimai išskiria tik du pagrindinius NB ląstelių tipus – noradrenerginį/adrenerginį (ADRN) ir į nervinės kėtos ląstelės panašų mezenchiminį (MES) tipus (Boeva et al., 2017; van Groningen et al., 2017). Ląstelių fenotipinės ir genų raiškos informacijos analizė, kartu su mūsų turimais transkriptominiais ir 5hmC duomenimis, rodo, kad N- ir I-tipai atitinka ADRN, o S-tipas – MES ląstelės (Yu et al., 2021).

Įdomu tai, kad NB ląstelėms yra būdingas plastiškumas: N-/ADRN ir S-/MES tipų ląstelės gali spontaniškai transdiferencijuoti ir virsti vienos kitomis *in vitro* ar net *in vivo*, kai pelėms suleidus atrūšiuotas vieno tipo ląstelės, po kiek laiko susiformavusiame NB auglyje stebimas abiejų ląstelių

tipų mišinys (Ross et al., 1983; van Groningen et al., 2017; Thirant et al., 2021). Tokiai NB ląstelių transdiferenciacijai yra svarbi hipoksijos veiksnių, NOTCH signalinių kelių, transkripcijos veiksnių, pavyzdžiui, GATA3, telomerazių ar chromatino pertvarkos baltymų, pavyzdžiui, ARID1A, genų aktyvacija, užląstelinių veiksnių, TNF- α ir EGF, poveikis (Cimmino et al., 2015; van Groningen et al., 2019; Shi et al., 2020; Huang et al., 2021; Thirant et al., 2021; Yu et al., 2021).

MES tipo ląstelės yra mažiau agresyvios, bet labiau atsparios chemoterapiniams vaistams *in vitro* nei ADRN tipas (Boeva et al., 2017; van Groningen et al., 2017). Gydomo metu NB naviko ląstelėse mažėja ADRN žymenų informacinės RNR (iRNR) kiekis, o MES iRNR kiekis didėja ir siejasi su vėlesniais atkryčio atvejais (van Wezel et al., 2019). Taip pat po chemoterapijos recidyviniuose augliuose aptinkama daugiau MES tipo ląstelių (van Groningen et al., 2017; Gartlgruber et al., 2021). Tai galimai rodo, kad ADRN ir MES neuroblastomos ląstelės skirtingai reaguoja į terapiją, kuri sukelia selektyvią atranką, ir atsparios MES ląstelės išgyvena gydymą (van Wezel et al., 2019; Gautier et al., 2021).

Žmogaus NB augliuose *in vivo* yra aptinkami iškart kelių ląstelių tipai, kas rodo, kad yra intranavikinis heterogeniškumas (Boeva et al., 2017; van Groningen et al., 2017; Gartlgruber et al., 2021). Taip pat NB naviko nevienalytiškumas atskleistas gavus paciento ksenograftus iš skirtingų vieno auglio biopsijų – būdami genetiškai vienodi, ksenograftai skyrėsi savo transkriptomika ir proteomika, ypač neurogenezės ir EMT procesuose (Braekeveldt et al., 2018). Dėl šio heterogeniškumo nesėkmingas NB gydymas galėtų būti efektyvesnis nusitaikius į konkrečius skirtingiems NB subtipams būdingus metabolinius procesus (Kimura et al., 2021).

1.2.6. Hipoksija ir NB

Hipoksija yra per žemas ir nepakankamas prieinamo deguonies lygis (McKeown, 2014). Ši būseną būdinga daugeliui vėžinių navikų dėl prastai išsivysčiusių vėžio indukuotų kraujagyslių, kurios neužtikrina reikiamos kraujo cirkuliacijos, ir sparčiai besidalinančių vėžinių ląstelių didelio deguonies poreikio (Jögi et al., 2004; Bhaskara et al., 2012). Daugelyje auglių deguonies lygis siekia tik 0,3-4,2 %, ir dažniausiai nukrenta žemiau 2 % (McKeown, 2014).

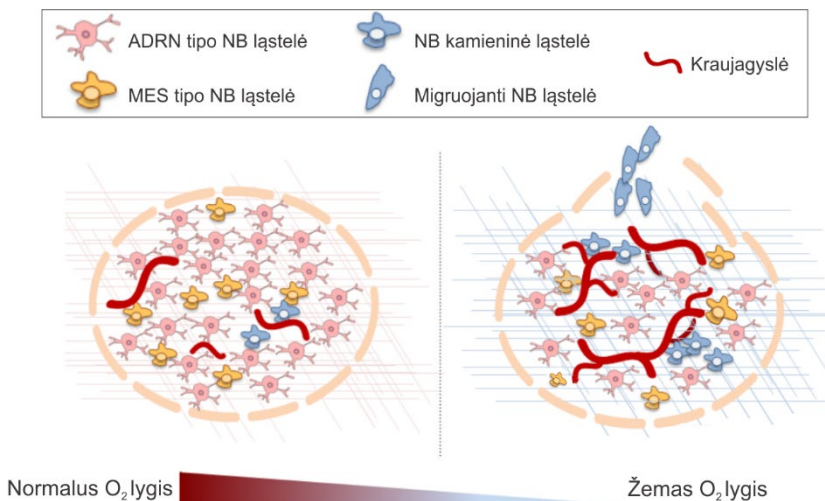
Normaliose ląstelėse hipoksija sukelia ląstelių žūtį, tačiau vėžinės ląstelės taip prisitaiko prie hipoksijos, kad ji stimuliuoja auglio augimą (Al Tameemi et al., 2019). Tai reguliuojama hipoksijos indukuojamais veiksniais HIF (angl. hypoxia-inducible factor), kurie inicijuoja raišką genų, padedančių išgyventi

hipoksijos sąlygomis, pavyzdžiui, gliukozės nešiklio GLUT3 ir glikolizės fermentų, reikalingų aprūpinimui energija, kraujagyslių endotelio augimo veiksnio VEGF, sukeliančio neovaskuliarizaciją (Jögi et al., 2004; Al Tameemi et al., 2019).

Dabar jau daug žinoma apie tai, kad ląstelių atsakas į hipoksiją yra susijęs ir su epigenomo pertvarkymu. Hipoksijos metu kinta histonus ir DNR modifikuojančių fermentų, KDM (histonų lizino demetilazės), HDAC, DNMT, TET, aktyvumas (Matuleviciute et al., 2021). Parodyta, kad hipoksijoje pakitusi genų raiška yra susijusi su DNR metilinimo pokyčiais. Pavyzdžiui, *HIF1A* promotoriaus demetilinimas lemia HIF1 veiksnio ir HIF taikinių-genų aktyvinimą vėžio metu (Matuleviciute et al., 2021). Įdomu tai, kad 5mC tiesiogiai trukdo HIF transkripcijos veiksnių prisijungimui prie jų atpažįstamų DNR sekų ir audiniui/ląstelių tipui specifiniai DNR metilinimo profiliai nulemia skirtingą tų ląstelių atsaką į hipoksiją (D'Anna et al., 2020).

NB ląstelėse hipoksijos metu padidėja globalus 5hmC lygis ląstelių DNR dėl HIF1 indukuojamos *TET1* raiškos. Tuo tarpu lokalus 5hmC padaugėjimas HIF jungimosi vietose arba šalia jų buvo susietas su HIF taikinių genų indukcija hipoksijos sąlygomis taip parodant 5hmC svarbą NB ląstelių atsake į hipoksiją (Mariani et al., 2014). Nors TET fermentams reikalingas deguonis, tačiau jie išlieka katalitiškai aktyvūs net ir hipoksijos sąlygomis dėl mažos deguonies Km (30 μM) (Laukka et al., 2016). *In vitro* tyrimai rodo, kad esant 0,5 % O₂ TET aktyvumas sumažėja tik dalinai – apie 50 % (Thienpont et al., 2016).

Hipoksija yra glaudžiai susijusi su NB progresavimu (žr. 1.19 pav.). NB ląstelėse, auginamose hipoksijos sąlygomis, padidėja jų proliferacija ir metastazinis potencialas (Chen et al., 2015; Herrmann et al., 2015). Hipoksija lemia agresyvesnę, mažiau subrendusių ir diferencijuotų NB ląstelių fenotipą – indukuojama c-KIT, NOTCH1 raiška, sumažėja neuroninių žymenų, pavyzdžiui, neurofilamentų, ir genų, dalyvaujančių neuroninėje diferenciacijoje, raiška (Jögi et al., 2002, 2004), padidėja į kamienines ląsteles panašių NB ląstelių populiacija (Bhaskara et al., 2012; Veschi et al., 2019). Cisplatina yra pagrindinis NB terapinis junginys, tačiau hipoksijos metu padaugėja metalotioneinų, kurie gali surišti platinos junginius ir taip gali padidėti hipoksinių NB ląstelių atsparumas chemoterapijai (Jögi et al., 2004; Applebaum et al., 2016). Hipoksija yra prastos klinikinės baigties prognostinis veiksnys – hipoksijos atsako genų aktyvinimas yra susietas su neigiamomis NB pacientų išgyvenamumo prognozėmis (Fardin et al., 2010; Applebaum et al., 2016; Cangelosi et al., 2020).



1.19 pav. Hipoksijos reikšmė neuroblastomai. Hipoksija skatina NB auglių piktybėjimą – aktyvinama angiogenezė, pakinta ląstelių diferenciacija ir daugėja NB kamieninių ląstelių, didėja metastazavimas (modifikuota pagal Huertas-Castaño et al., 2020).

1.3. Neląstelinė laisvai cirkuliuojanti DNR, jos reikšmė ir pritaikymas vaisiaus neinvaziniam prenataliniam tyrimui

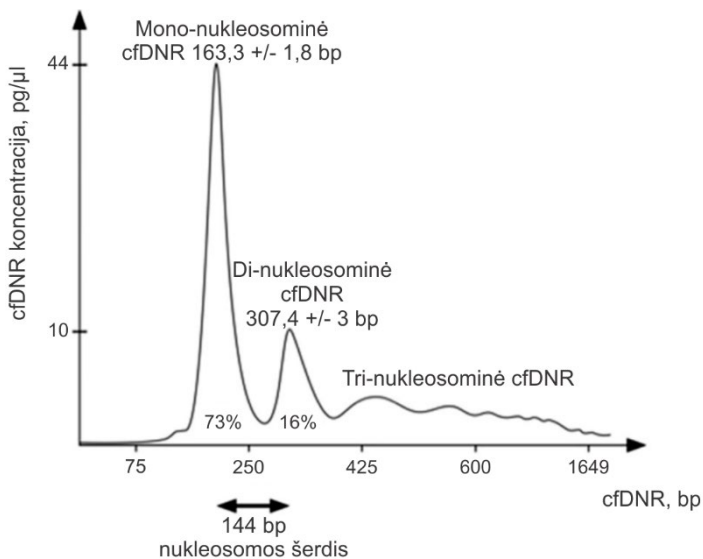
1.3.1. Neląstelinė DNR kraujo plazmoje

Neląstelinė laisvai cirkuliuojanti dvigrandinė DNR (cfDNR, angl. cell-free) kraujo plazmoje buvo aptikta dar 1948 metais (Jiang ir Lo, 2016). cfDNR būdingi įvairūs DNR fragmentai nuo ~143 bp su dominuojančia ~166 bp ilgio DNR fragmentų frakcija. Manoma, kad 166 bp fragmentų frakcija atspindi DNR, apsvyniojusią aplink nukleosomos šerdį (apytiksliai 146 bp) su jungtuko DNR seka (apie 20 bp). Taip pat mažesniais kiekiais randama ir ilgesnių DNR fragmentų – nukleosominių kartotinių (žr. 1.20 pav.). Tai rodo, kad cfDNR susidaro ląstelių apoptozės metu, o nukleosominis DNR supakavimas lemia DNR degradavimo profilius (Jiang ir Lo, 2016).

Kadangi skirtingiems audiniams būdingi skirtingi DNR metilinio profiliai (Fernandez et al., 2012), pagal juos galima nustatyti cfDNR kilmę. Pagrindinis cfDNR šaltinis yra hematopoetinės (kraujodaros) ląstelės, iš kitų audinių – kraujagyslių endotelio ląstelės (10 %) ir kepenų hepatocitai (~1,3 %), o likusių kūno audinių indėlis labai menkas – jų ląstelių DNR sudaro labai nedidelę dalį cfDNR, po <1 % (Moss et al., 2018; Liu et al., 2019a).

cfDNR kiekis varijuoja tarp sveikų individų, bet jis retai būna didesnis nei 30 ng/ml, o dažniausiai būna iki 10 ng/ml kraujo plazmos. Padidėjusį cfDNR

kiekį gali lemti tokie faktoriai kaip įvairios ligos, traumos, uždegimas, net sportavimas (Johansson et al., 2019). Todėl cfDNR kiekio tyrimai gali būti pritaikomi medicinoje. Donoro DNR kiekis kraujyje gali būti naudojamas kaip transplanto atmetimo žymuo – kuo daugiau organo DNR, tuo didesnė tikimybė, kad vyksta uždegimas ir organo atmetimas (Snyder et al., 2011). Taip pat cfDNR gali būti taikoma vėžinių susirgimų diagnostikoje ir prognozėms – vėžiu sergančių pacientų kraujyje yra aptinkamas padidėjęs bendras cfDNR kiekis, teigiamai koreliuojantis su metastazėmis, bet sumažėjantis po sėkmingos terapijos (Yan et al., 2021). Pasinaudojant cfDNR epigenetiniais 5mC (Guo et al., 2017; Moss et al., 2018) ir 5hmC (Li et al., 2017; Song et al., 2017) profiliais galima nustatyti vėžinio susirgimo kilmės audinį.

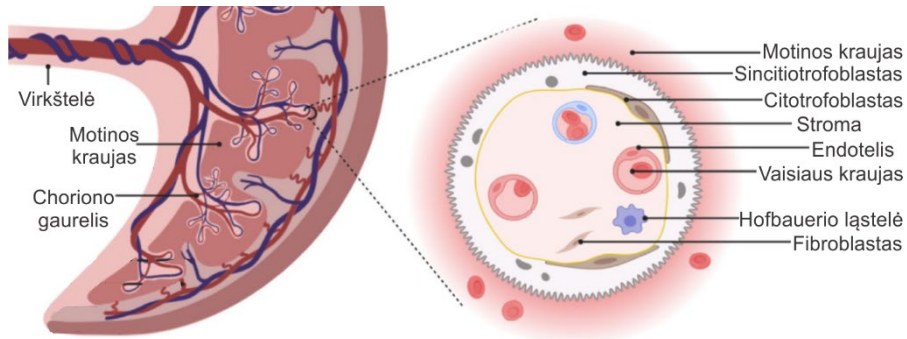


1.20 pav. cfDNR dydžių profilis. Grafike nurodyti pagrindiniai cfDNR fragmentų pikai ir jų dydžiai, stebimi DNR elektroforegramoje, bei įvertinti DNR kiekiai (modifikuota pagal Pedini et al., 2021).

1.3.2. Vaisiaus cfDNR motinos kraujo plazmoje

Žmogaus kraujo plazmoje randama laisvai cirkuliuojančios ne tik įvairių jo paties organų neląstelinės DNR, bet ir vaisiaus DNR nėštumo atveju. Besilaukiančių moterų kraujo plazmoje vaisiaus cfDNR pirmą kartą buvo nustatyta pagal Y chromosomos DNR fragmentus, kai buvo laukiamasi berniukų (Dennis Lo et al., 1997). Vaisiaus cfDNR į motinos kraują patenka iš placentos choriono gaurelių (žr. 1.21 pav.). Vaisiaus cfDNR kilmė įrodyta tiriant nėštumus, kuriems būdingas placentos mozaikizmas – būsena, kai

placentos ir vaisiaus genotipai yra skirtingi. Tokiu atveju motinos plazmos cfDNR aptiktos chromosomų anomalijos koreliavo su placentos, o ne paties vaisiaus kariotipu (Masuzaki et al., 2004). Papildomas įrodymas, kad vaisiaus cfDNR susidaro iš placentos, yra jos aptikimas plazmoje anembrioninio nėštumo metu, kai yra tik amniono maišelis, bet nėra embriono (Alberry et al., 2007). Taip pat buvo parodyta, kad vaisiaus cfDNR į motinos kraują patenka iš placentos choriono gaurelių trofoblastų, kai esant skirtingam trofoblastų ir mezenchiminių ląstelių genotipui plazmos cfDNR aptiktas tik trofoblastų DNR genotipas (Faas et al., 2012).



1.21 pav. Placentos ir choriono gaurelių sandara. Vaisius per virkštelę jungiasi prie placentos, sudarytos iš vaisiaus choriono gaurelių, tarp kurių yra motinos krauju užpildyta erdvė. Dešinėje pusėje pavaizduotas choriono gaurelio skerspjūvis. Choriono gaurelio išorinį sluoksnį sudaro sincitiotrofoblastas, susiformavęs iš susiliejusių citotrofoblastų. Po citotrofoblastų sluoksniu yra choriono gaurelio stroma, turinti vaisiaus makrofagų – Hofbauerio ląstelių, fibroblastų, vaisiaus kraujagyslių (modifikuota pagal Bongaerts et al., 2021).

Vaisiaus cfDNR kiekio dalis motinos plazmos visuminėje cfDNR yra vadinama vaisiaus frakcija:

vaisiaus frakcija = vaisiaus cfDNR / (vaisiaus cfDNR + motinos cfDNR).

10-21 nėštumo savaitėmis vaisiaus cfDNR kiekis sudaro vidutiniškai 10-20 % visuminės motinos plazmos cfDNR (Taglauer et al., 2014) ir tik 1-3 % nėštumų atvejais vaisiaus frakcija yra mažesnė nei 4 % (Drury et al., 2016).

Vaisiaus cfDNR frakcija priklauso nuo tokių biologinių veiksnių kaip vaisiaus gestacinis amžius ir aneuploidija (chromosomų skaičiaus pokytis), motinos kūno masė. Vaisiaus cfDNR gausėja plazmoje su nėštumo trukme – 10-21 nėštumo savaitėmis vaisiaus frakcija padidėja po 0,1 % per savaitę, o po 21 savaitės – net po 1 % (Wang et al., 2013a). Tačiau įdomu tai, kad vaisiaus cfDNR labai greitai pašalinama iš moters kraujo po gimdymo – praėjus vos 1 parai vaisiaus cfDNR nebeaptinkama, o nustatyta vidutinė

pusėjimo trukmė yra 16 min (Dennis Lo et al., 1999). Vaisiaus aneuploidijos tyrimai parodė, kad 21-osios chromosomos trisomijos (T21) atveju padidėja vaisiaus frakcija, o 13-osios ir 18-osios chromosomų trisomijos atvejais – sumažėja (Rava et al., 2014; Suzumori et al., 2016). Galimas to paaiškinimas remiasi žiniomis, kad esant T21 yra stebima intensyvesnė trofoblastų apoptozė (Taglauer et al., 2014), o 13-osios ir 18-osios chromosomų trisomijos atvejais yra stebimas sumažėjęs placentos tūris (Drury et al., 2016). Taip pat yra nustatyta, kad motinos kūno masė neigiamai koreliuoja su vaisiaus frakcija (Wang et al., 2013a; Suzumori et al., 2016), manoma, kad dėl cfDNR „atskiedimo efekto“ padidėjusiame moters kraujo tūryje (Wang et al., 2013a).

1.3.3. Vaisiaus cfDNR panaudojimas neinvaziniam prenataliniam tyrimui

Šiais laikais yra įprasta vykdyti besilaukiančių moterų vaisiaus prenatalinius tyrimus įvairių galimų apsigimimų įvertinimui. Plačiausiai vaisiaus prenatalinė diagnostika taikoma dėl chromosomų aneuploidijos, kuri sudaro 80-90 % visų chromosominių defektų ir yra dažniausia apsigimimų priežastis (Qi et al., 2021). 21-osios chromosomos trisomija (T21) – Dauno sindromas – yra dažniausiai tarp naujagimių pasitaikanti chromosomų mutacija, kurios dažnis yra 1 iš 700 gimdymų (Mai et al., 2019). Pagrindinis T21 rizikos veiksnys yra motinos amžius – nuo 40 metų rizika pagimdyti kūdikį su Dauno sindromu siekia 1 % (Hui ir Bianchi, 2017). Klinikose rutiniškai atliekamo neinvazinio vaisiaus ultragarsinio ir motinos kraujo plazmos biožymenų testavimo T21 detekcijos dažnis yra 90-95 %, tačiau klaidingai teigiamos detekcijos dažnis siekia net 2,5-5 %, todėl per dažnai nereikalingai paskiriamas invazinis testas diagnozės patvirtinimui (Bedei et al., 2021).

Ankstyvas prenatalinis lyties nustatymas yra būtinas esant nėštumui su genetinės ligos, paveikiančios tik tam tikrą lytį, rizika. Pavyzdžiui, tikslus vaisiaus lyties žinojimas reikalingas esant su X chromosoma susijusių ligų rizikai, kai būtų paveiktas tik berniuko vaisius. Taip pat tai reikalinga vaisiui įtariant įgimtą antinksčių hiperplaziją, nes medikamentinis gydymas nuo 9 nėštumo savaitės reikalingas tik laukiantis mergaitės, siekiant sumažinti jos išorinių lytinių organų virilizaciją (panašumą į berniukų). Vaisiaus lytį galima nustatyti ultragarsinės patikros metu, kuri paprastai atliekama tik nuo 18 nėštumo savaitės, arba anksčiau invaziniais tyrimo metodais (Drury et al., 2016).

Vaisiaus invazinė prenatalinė diagnostika atliekama paimant choriono gaurelių mėginį, vykdant amniocentezę (amniotinio skysčio ląstelių tyrimą)

ar kordocentezę (virkštelės kraujo tyrimą) (Tsaliki et al., 2012). Tačiau invaziniai metodai turi iki 1-2 % persileidimo, kaip tyrimo komplikacijos, tikimybę (Mujezinovic ir Alfirevic, 2007). Todėl pageidautina atlikti tikslius ir saugius neinvazinius prenatalinius tyrimus (NIPT), kuriems buvo pasiūlyta panaudoti cfDNR analizę.

Plataus cfDNR pritaikymo NIPT galimybę atvėrė įrodymas, kad motinos plazmoje yra aptinkamas visas vaisiaus genomas (Lo et al., 2010). NIPT pasižymi keliais svarbiais privalumais. Pirmiausia, tai yra motinai ir vaisiui saugus, vaisiui neinvazinis tyrimas. NIPT galima vykdyti ankstyvu gestaciniu periodu, pavyzdžiui, vaisiaus lytį galima nustatyti jau nuo 7 nėštumo savaitės – ženkliai anksčiau nei ultragarsiniu tyrimu (Drury et al., 2016). Be to, cfDNR pritaikymas NIPT pagerina tradicinio neinvazinio T21 tyrimo pagal kraujo baltymus ir ultragarsu rodiklius. Duomenys rodo, kad pagal vaisiaus cfDNR motinos kraujyje Dauno sindromas nustatomas >99 % dažniu tik su <0,5 % klaidingai teigiamų rezultatų (Taylor-Phillips et al., 2016; Qi et al., 2021).

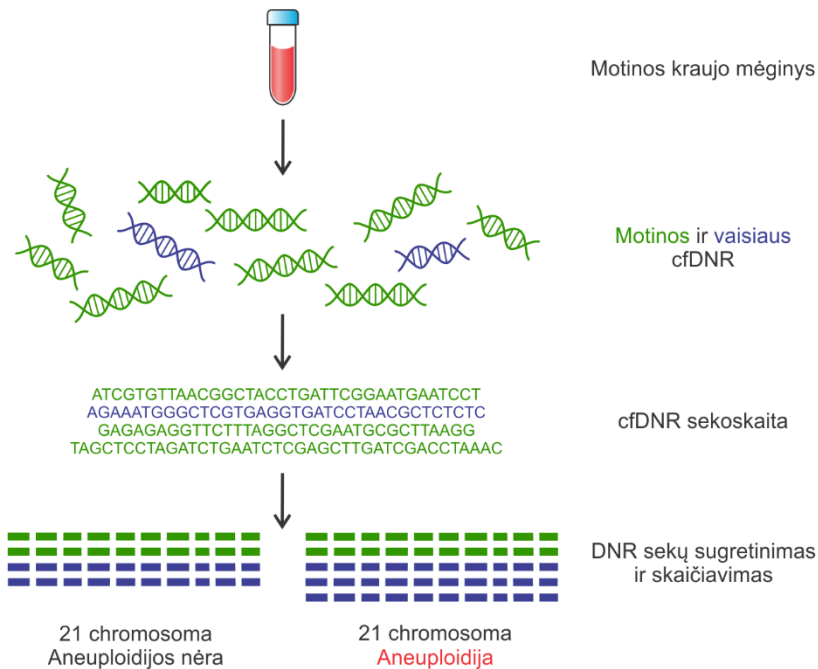
Vaisiaus kariotipo, pavyzdžiui, 21-osios chromosomos trisomijos, NIPT tyrimai atliekami trimis pagrindiniais genetiniais metodais: atliekant cfDNR visuminę sekoskaitą, taikininę ar chromosomai specifinę sekoskaitą arba sekoskaitą, parentą vieno nukleotido polimorfizmais (VNP):

- Visuminės sekoskaitos metodu yra įvertinamos kiekvienos chromosomos DNR sekų proporcijos. Nesilaukiančių moterų su normaliu kariotipu maždaug 1,3 % cfDNR fragmentų yra iš 21-osios chromosomos (t. y. 21-oji chromosoma sudaro ~1,3 % žmogaus genomo) (Samura, 2020). Nėštumo metu, jeigu vaisiaus kariotipas yra nepakitęs, chromosomos DNR fragmentų proporcija išlieka tokia pati. Tačiau jeigu vaisius turi T21, tada šios chromosomos DNR fragmentų kiekis padidėja (žr. 1.22 pav.). Statistiškai kiekvienai chromosomai suskaičiuojamas nuskaitymų kiekio standartinis nuokrypis nuo teorinio dydžio ir priskiriamas z-įvertis. Jeigu 21-osios chromosomos DNR fragmentų skaičius yra daugiau nei trimis standartiniais nuokrypiais didesnis nei tikimasi, t. y. z-įvertis > 3, tai laikoma didele trisomijos rizika (Skrzypek ir Hui, 2017).

- Selektivos sekoskaitos metodu yra praturtinami tik konkrečių chromosomų DNR fragmentai iš visų plazmos cfDNR fragmentų, PGR metu padauginant specifinius unikalios DNR taikinius. Chromosomos trisomijos rizika įvertinama atsižvelgiant į konkrečių chromosomų DNR sekų nuskaitymų kiekį ir vaisiaus cfDNR frakciją. Kadangi galutinė sekoskaitos biblioteka yra praturtinta tiriamųjų chromosomų fragmentais, tai leidžia sumažinti sekoskaitos kainą ir tyrimo trukmę (Skrzypek ir Hui, 2017). Tačiau visuminės ir selektivos sekoskaitos metodai, dar vadinami „skaičiavimo“ metodais, yra labai jautrūs vaisiaus cfDNR frakcijai. Pastarajai esant mažai,

negalima patikimai nustatyti chromosomų trisomijos, todėl NIPT paprastai atliekamas ne anksčiau nei 10 nėštumo savaitę (Goldwaser ir Klugman, 2018) ir vaisiaus cfDNR frakcijai esant ne mažesnei nei 4 % (Skrzypek ir Hui, 2017).

- VNP paremtame NIPT analizuojamos dominančių chromosomų tam tikrų DNR sekų vienos bazių poros variacijos, kurios pasireiškia >1 % populiacijos. Šiuo atveju tiriama ne tik iš motinos plazmos išskirta cfDNR, turinti motinos ir vaisiaus DNR mišinį, bet ir leukocitų DNR – gryna motinos DNR. Vaisiaus genotipas nustatomas lyginant VNP lokusus plazmos ir leukocitų DNR, ir lyginant stebimų VNP pasiskirstymus (Skrzypek ir Hui, 2017; Samura, 2020). Tyrimo, paremto VNP, išskirtinumas tas, kad jame yra atskiriamos motinos ir vaisiaus DNR (Skrzypek ir Hui, 2017). Tačiau šio metodo trūkumas, kad jis negali būti taikomas kai moters plazmoje galima aptikti trečio genotipo DNR, pavyzdžiui, atlikus pagalbinį apvaisinimą naudojant donoro kiaušialąstes arba po organo transplantacijos (Goldwaser ir Klugman, 2018).



1.22 pav. Vaisiaus 21-osios chromosomos trisomijos detekcija cfDNR visuminės sekoskaitos būdu. Vaisiaus aneuploidija nustatoma pagal padidėjusį tiriamosios chromosomos DNR fragmentų kiekį (pagal Drury et al., 2016).

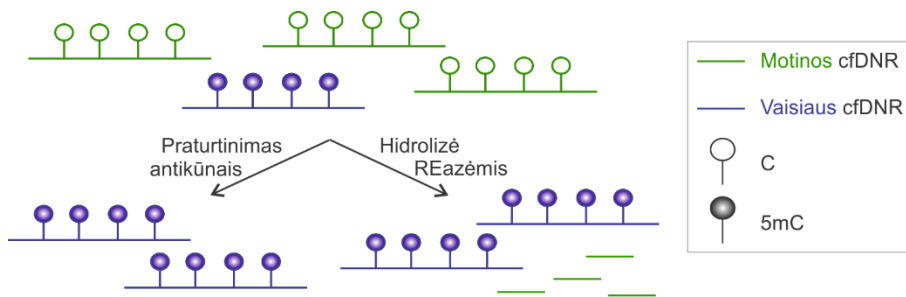
1.3.4. Vaisiaus T21 neinvazinis prenatalinis tyrimas pagal epigenetinius biožymenis

Kadangi visuminėje motinos plazmos cfDNR tik maža dalis yra vaisiaus DNR, tai kad ją būtų lengviau atskirti nuo motinos DNR ir patikimai atlikti NIPT, vaisiaus cfDNR gali būti praturtinama. Vienas tokių būdų – skirtingai metilintų DNR regionų tarp vaisiaus ir motinos cfDNR tyrimas (Papageorgiou et al., 2011). Tokie genominiai regionai paprastai nustatomi lyginant motinos kraujo ląstelių ir placentos genominės DNR (gDNR) metilinimo genolapius. Tačiau placentos biopsijos metu gali būti paimamos heterogeniškos ląstelių populiacijos, nes choriono gaureliai yra sudaryti iš sincitiotrofoblastų, citotrofoblastų, mezenchiminių ir endotelinių ląstelių (žr. 1.21 pav.) (Hatt et al., 2015), o tuo tarpu į motinos kraują DNR patenka tik iš trofoblastų (Faas et al., 2012). Taip pat placentai specifiniai skirtingai metilinti regionai paprastai identifikuojami lyginant sveiko vaisiaus ir motinos gDNR, tačiau Dauno sindromo atveju yra stebimas pakitęs 21-osios chromosomos metilinimas (Lee et al., 2016; Yu et al., 2020).

Nepaisant galimų iššūkių, vaisiaus T21 detekcijai tiriant skirtingai metilintus DNR taikinius jau yra pasiūlytos dvi 5mC analizės metodų grupės, leidžiančios vaisiaus cfDNR praturtinimą: imunoišsodinimas ir DNR analizė restrikcijos endonukleazėmis (žr. 1.23 pav.):

- Panaudojant 5mC specifinius antikūnus pagaunami metilinti cfDNR fragmentai ir praturtinami vaisiaus specifiniai metilinti DNR lokusai. T21 atveju yra stebimas padidėjęs tiriamųjų vaisiaus specifinių metilintų 21-osios chromosomos DNR regionų kiekis (Papageorgiou et al., 2011; Tsaliki et al., 2012). Imunoišsodinimas yra ekonomišką T21 tyrimo variantas, nes yra nuskaitomos ne visos cfDNR sekos, tačiau šio metodo efektyvumas ir tikslumas labai priklauso nuo naudojamų antikūnų specifiškumo ir tikslaus jų kiekio parinkimo (Papageorgiou et al., 2014).

- Metilinimui jautrios restrikcijos endonukleazės hidrolizuoja tik nemetilintas taikinio DNR sekas. Tai leidžia metilintų vaisiui specifinių cfDNR sekų praturtinimą, nes motinos nemetilinta cfDNR yra hidrolizuojama (Zhang et al., 2019). Tačiau metilinimui jautrių REazių panaudojimui reikia, kad tiriamasis DNR lokusas turėtų fermentų atpažįstamą seką, o tai mažina testavimui pritaikomų skirtingai metilintų DNR regionų skaičių (Papageorgiou et al., 2011) (pavyzdžiui, su R.HpaII taikiniais žmogaus DNR persidengia tik apie 8,6 % genomo CG sekų (Schumacher et al., 2006)).



1.23 pav. Vaisiaus metilinti cfDNR fragmentai iš motinos kraujo visuminės cfDNR gali būti praturtinti panaudojant 5mC specifinius antikūnus ar metilinimui jautrias restrikcijos endonukleazes, jomis hidrolizuojant nemetilintus motinos cfDNR fragmentus.

Tiesa, vaisiaus T21 detekcija taip pat galima 21-osios chromosomos metilinimo skirtumų tarp vaisiaus ir motinos cfDNR analizei naudojant bisulfitinės konversijos sekoskaitą (Lun et al., 2013; Jensen et al., 2015). Tačiau šiuo metodu yra nuskaitoma visuminė kraujo plazmos cfDNR ir norint padidinti T21 detekcijos jautrumą, vaisiaus cfDNR praturtinimui reikalingas kitų technologijų pritaikymas (Jensen et al., 2015). Be to, DNR veikimas natrio bisulfitu sukelia jos degradaciją iki 96-99 %, todėl tai yra sunkiai pritaikomas metodas tirti mažiems vaisiaus cfDNR kiekiams motinos plazmoje (Zeng et al., 2019; Zhang et al., 2019).

Apibendrinant, epigenetinių DNR metilinimo skirtumų tarp vaisiaus ir motinos DNR analizė gali būti pritaikoma vaisiaus NIPT 21-osios chromosomos trisomijos detekcijai ir tai turi kelis labai svarbius privalumus. Visų pirma, tai yra nuo DNR polimorfizmų nepriklausomas tyrimas. Tuo tarpu genetiniu VNP pagrindu testavimu galima analizuoti tik iš tėvo paveldėtus vaisiaus polimorfinius alelius ir tyrimas yra netikslus, kai motina yra heterozigota pagal tiriamuosius alelius (Poon et al., 2002; Papageorgiou et al., 2014). Be to, epigenetiniai tyrimai leidžia negausios vaisiaus cfDNR praturtinimą iš motinos kraujo plazmos visuminės cfDNR mišinio, taip padidinant „efektyviają“ vaisiaus frakciją ir todėl pakeliant T21 detekcijos jautrumą (Jensen et al., 2015).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

„Carl Roth“: CH₃COOH, CH₃COONa, EDTA, fenolis:chloroformas:izoamilo alkoholis (25:24:1), HCl, izopropanolis, NaHCO₃, natrio dodecilsulfatas (NDS), Tris, Tween 20, Zn(OAc)₂.

„Corning Life Sciences“: fosfatinis buferinis tirpalas (PBS).

„Glen Research“: DBCO-sulfo-NHS esteris.

„Honeywell“: etanolis.

„Jena Bioscience“: UDP-6-N₃-Glc.

„Molecular Research Center“: RNR skyrimo tirpalas „RNAzol RT“.

„Sigma-Aldrich“: chloroformas, CuBr, DMSO, NaCl, SYBR Green I dažas, THPTA (tris-hidroksipropiltriazolilmetilaminas).

„Thermo Fisher Scientific“: dATP (100 mM), dNTP mišinys (10 mM), „Dynabeads MyOne Streptavidin C1“ magnetinės dalelės (10 mg/ml), MgSO₄ (25 mM), „TopVision“ agarozė, „DNA Gel Loading Dye“ (6x) DNR užnešimo į agarozės gelį dažas, „MassRuler Low Range DNA Ladder“ DNR ilgio standartai, atsitiktiniai heksameriniai pradmenys (100 μM), „RiboLock“ RNazės slopiklis (40 U/μl), MEM auginimo terpė su nebūtinosiomis aminorūgštimis, Ham's F12 auginimo terpė, jaučio embrioninis serumas (FBS), antibiotikų penicilino (10 000 U/ml) ir streptomicino (10 000 μg/ml) tirpalas, GlutaMAX (200 mM L-alanil-L-glutamino) tirpalas, 0,4 % tripano mėlio tirpalas.

„TriLink Biotechnologies“: 5mdC, 5hmdC ir dG nukleozidų standartai.

VU GMC BTI DNR modifikacijos tyrimų skyrius: Ado-6-N₃ kofaktorius.

2.1.2. Fermentai ir molekulinės biologijos rinkiniai

„Agilent Technologies“: „Agilent High Sensitivity DNA Kit“.

„Lexogen“: „RiboCop rRNA Depletion Kit“.

„Sigma-Aldrich“: nukleazė P1.

„Thermo Fisher Scientific“: restrikcijos endonukleazės Hin6I (10 U/μl) ir MspI (10 U/μl) su rekomenduojamu Tango buferiniu tirpalu, T4 DNR ligazė (5 U/μl) ir Klenow exo- DNR polimerazės fragmentas (5 U/μl) su rekomenduojamais buferiniais tirpalais, DreamTaq DNR polimerazė (5 U/μl) ir rekomenduojamas buferinis tirpalas, tikro laiko PGR mišinys „Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix“ (2x), DNR metiltransferazė eM.SssI (11,3 μM), Proteinazė K (20 mg/ml), A/T1 RNazių mišinys, šarminė fosfatazė FastAP (1 U/μl), T4 β-gliukoziltransferazė (BGT) (5 U/μl), „Fast DNA End Repair Kit“, Pfu DNR polimerazė (2,5 U/μl), „Platinum SuperFi PCR Master Mix“ (2x) PGR mišinys, „Qubit dsDNA HS Assay Kit“, dsDNazė, „RevertAid“ atvirkštinė transkriptazė (200 U/μl), „Dynabeads mRNA Purification Kit“, „Ion Total RNA-Seq Kit v2“, „MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit“, „GeneJET Gel Extraction Kit“, „GeneJET PCR Purification Kit“, „GeneJET NGS Cleanup kit“, „MagJET NGS Cleanup and Size-selection kit“.

„ZYMO Research“: „DNA Clean & Concentrator-5“, „Oligo Clean & Concentrator“.

2.1.3. Buferiniai ir kiti tirpalai

Azidinimo: 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 0,5 mM EDTA

CH₃COONa tirpalas: 3 M CH₃COONa, pH 5,2

EB: 10 mM Tris-HCl (pH 8,5)

Lizės: 200 mM Tris-HCl (pH 8,5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % NDS

NaHCO₃: 0,3 M NaHCO₃ (pH 9,0)

Nukleazės P1: 100 mM NaOAc (pH 5,5), 10 mM Zn(OAc)₂

Praplovimo Nr. 1: 15 mM Tris-HCl (pH 7,4), 3 M NaCl, 1,5 mM EDTA, 0,05 % Tween 20

Praplovimo Nr. 2: 5 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 M NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,05 % Tween 20

2.1.4. DNR oligonukleotidai

Modelinių DNR fragmentų ruošimui nuo žmogaus ir pelės genomines DNR:

155-dir	5'-TGTGTTACTGTGTGGAAAAGACC
155-rev	5'-CCACTCCTTATAGTTTGGCTGA
188-dir	5'-GTGTTGGGGTGACTATTATG

188-rev 5'-GCATCCTGGAGATTGTGGGCAACATCXGG, kur X =
5hmC

Adapterių sulydymui:

A1 5'-P-GATTGGAAGAGTGGTTCAGCAGGAATGCTGAG
A2 5'-ACACTCTTCCCTACATGACACTCTTCCAATCT

ODN prijungimui prie azido grupėmis žymėtos DNR „click“ reakcijoje:

MOD 5'-CXTTATATATTTATTGGAGACTGACTACTACCA
GATGTAACA, kur X = T-C2-NH₂
Alk-biotin 5'-TXTTTTGTGTGGTTTGGAGACTGACTACCAGATG
TAACA-biotinas, kur X = C8-alkin-T
Alk 5'-TXTTTTGTGTGGTTTGGAGACTGACTACCAGATG
TAACA, kur X = C8-alkin-T

TOP-seq naujos DNR grandinės sintezei nuo prijungto ODN:

A35 5'-TGTTACATCTGGTAGTCAGTCTCCAAACCACA*C*
A*A, kur * = fosforotioatinės jungtys

TOP-seq bibliotekų amplifikavimui:

Ad-A2 5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCACTCTTCCCT
ACATGAC*A*C*T, kur * = fosforotioatinės jungtys
Ad-ODN 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGNNNN
NNNNNTGTTTCATCTGGTAGTCAGT*C*T*C,
kur * = fosforotioatinės jungtys, N – žinomos skirtingos
barkodų sekos įvairiuose oligonukleotiduose (tai leidžia
analizuoti kelis mėginius vienoje „Ion Proton“ sekoskaitos
gardelėje)

Žmogaus genų raiškos vertinimui:

B2M-dir 5'-CTCACGTCATCCAGCAGAGAATG
B2M-rev 5'-TCTTTTTCAGTGGGGGTGAATTCAG
HIF1A-dir 5'-ATCCATGTGACCATGAGGAAATGAGAG
HIF1A-rev 5'-TCGGCTAGTTAGGGTACACTTCATTC
HIF2A-dir 5'-CACTGCTTCAGTGCCATGACA
HIF2A-rev 5'-TGTCCAGGAGGAAGGGACTGT
VEGFA-dir 5'-AGGAGGAGGGCAGAATCATCA
VEGFA-rev 5'-CTCGATTGGATGGCAGTAGCT
RAB3D-dir 5'-GATACGCGGACGACTCCTTC
RAB3D-rev 5'-GGATTCCTGATTGGCGATGTC
CTC-510F12.4-dir 5'-GGTCTGTCAAGGCAACACAC
CTC-510F12.4-rev 5'-GACGCGATGTGTCTCCAAAC

UBR4-dir	5'-TTCCGCTTACCGTTCTTCCC
UBR4-rev	5'-CCAGCCTCCCTCTGTGTTAC
RP5-1126H10.2-dir	5'-TGACATTGCCAAGCACCCAG
RP5-1126H10.2-rev	5'-GCACAAACCTGACAACCTCCAC
SOX11-dir	5'-CGCCGACGACCTGATGTTT
SOX11-rev	5'-CGAATCCAAATCCTTATCCACCA
AC010729.1-dir	5'-GCTCTAACCTGTGAGGACGG
AC010729.1-rev	5'-CTCCTTCATCCGAAGCACCT

Regioninei uTOP-PGR:

chr2-CG-dir	5'-GAACTCTGGATGGAGGCTGGGCC
chr2-CG-1-rev	5'-TGTTACATCTGGTAGTCAGTCTCCAAAC CACACAAAAAAGATGGA
chr2-CG-2-rev	5'-TGTTACATCTGGTAGTCAGTCTCCAAAC CACACAAAAAAGCCTCC
chrX:31090306-dir	5'-GGGACAGAGTTGCGGGGCAAGG
chrX:31090306-rev	5'-TGTTACATCTGGTAGTCAGTCTCCAAAC CACACAAAAAAGGAAGT
chrX:47580815-dir	5'-GATATTGGGCACAGGTAGGAGTAC
chrX:47580815-rev	5'-TGTTACATCTGGTAGTCAGTCTCCAAAC CACACAAAAAAGGCCCT
chrX:53283877-dir	5'-CCACCACAGGAGCCTCCATATG
chrX:53283877-rev	5'-TGTTACATCTGGTAGTCAGTCTCCAAAC CACACAAAAAAGCTGGA
chrX:133646863-dir	5'-CATACCATAACCAGCTTGTCAGGG
chrX:133646863-rev	5'-TGTTACATCTGGTAGTCAGTCTCCAAA CCACACAAAAAAGATCTT

„rev“ pradmenys yra komplementarūs prie CG sekų prijungtam ODN Alk ir genominei DNR sekai, esančiai šalia pažymėtojo CG (ši dalis pabraukta).

Žmogaus vaisiaus 21-osios chromosomos neinvazinei detekcijai:

29732020-1-dir	5'-CAACTCCCTACAGCCCCTTG
29732020-1-rev	5'-AAATTGCATGATTCCCCTGACA
29732020-2-dir	5'-ATGACTGGCTTATTTCACTTAGCATC
29732020-2-rev	5'-AGTCCTGCTATATGCAACACCTT
33462648-dir	5'-GGTATTTACAAAAGTCTGCACCTTAGTC
33462648-rev	5'-CTGCCAACTTCACCCAGAGT
34672959-dir	5'-TAGAAATCTTTAGGAGGTGGTGAATG
34672959-rev	5'-CATGGTGGAAGAGATGGGC
30341466-dir	5'-GCAGAGGTTGCAGTGAGCTG
30341466-rev	5'-GTCTGGATGCAAAAATCCCTTT
46964859-dir	5'-GCTGTCCCTGTGGTTAAGGTC
46964859-rev	5'-GCCACCACAACAGCACCA
44084933-dir	5'-CCCCATCACCAACTTCACTC

2.1.5. Ląstelių linijos

Neuroblastomos ląstelių linijos:

SK-N-BE(2) (ECACC 95011815), BE(2)-C (ECACC 95011817), BE(2)-M17 (ECACC 95011816), LA-N-1 (ECACC 06041201), LA1-5s (ECACC 06041204) ir LA1-55n (ECACC 06041203).

SK-N-BE(2) ir iš jų išvestų BE(2)-C ląstelių modalinis chromosomų skaičius 44, LA-N-1 ląstelių chromosomų skaičius 47-87 (pagal „ECACC“ ląstelių banko duomenis). SK-N-BE(2) turi *MYCN* amplifikaciją, p53 C135F mutaciją; LA-N-1 turi *MYCN* amplifikaciją, ALK F1174L mutaciją, p53 C182stop mutaciją (Goldschneider et al., 2006; George et al., 2008; Huang et al., 2011).

2.1.6. Išgrynintos DNR mėginiai

VU GMC BTI DNR modifikacijos tyrimų skyrius: pelės embrioninių kamieninių ląstelių gDNR (J. Ličytė).

Tartu universitetinė ligozinė, Estija: besilaukiančių (12-20 nėštumo savaičių) ir nenėščių moterų kraujo plazmos cfDNR; pirmo trimestro savanoriškų abortų choriono gaurelių gDNR; nesilaukiančių moterų kraujo leukocitų gDNR.

2.2. Metodai

2.2.1. Modelinių DNR fragmentų ruošimas PGR metodu

PGR buvo naudojami specifiniai modelinių DNR fragmentų pradmenys (0,5 μ M), 0,2 mM dNTP, 2,5 U DreamTaq DNR polimerazės, rekomenduojamas buferinis tirpalas su 2 mM MgCl₂ ir pelės arba žmogaus genomine DNR kaip matrica. Nuo pelės gDNR paruoštas 188 bp DNR fragmentas su 188-dir ir 188-rev pradmenimis. Nuo žmogaus gDNR 155 bp DNR fragmentas gautas naudojant 155-dir ir 155-rev pradmenis. Reakcija vykdyta „Labcyler“ („SensoQuest“) termocikleryje, programa sudaryta iš 95 °C 2 min pradinės denatūracijos, 30 ciklų 95 °C 1 min, 53-55 °C 1 min ir 72 °C 30 s, 72 °C 2 min galutinio ilginimo etapo. DNR fragmentai buvo gryninami su „GeneJET PCR Purification Kit“ arba iš agarozės gelio naudojant „GeneJET Gel Extraction Kit“ pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.2. Modelinių DNR fragmentų 5hmC glikozilinimas

30-500 ng DNR fragmentų buvo inkubuojama 20-50 µl reakcijos mišinyje gamintojo rekomenduojamame Epi buferiniame tirpale su 1x UDP-Glc arba 50 µM UDP-6-N₃-Glc kofaktoriumi ir 2,5-5 U T4 BGT 1 val. 37 °C temperatūroje, paskui fermentas inaktyvintas pakaitinus 20 min 65 °C temp. DNR fragmentai iš reakcijos mišinio išgryninti su „DNA Clean & Concentrator-5“ rinkiniu.

2.2.3. Modelinių DNR fragmentų hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

Paruoštas 15 µl reakcijos mišinys su 5-15 ng DNR fragmentų ir 5 U restrikcijos endonukleazės Hin6I arba MspI gamintojo rekomenduojamame Tango buferiniame tirpale. Reakcija vykdyta 1 val. 37 °C temperatūroje, fermentas inaktyvintas temperatūrą pakėlus iki 65 °C (Hin6I) ar 80 °C (MspI) 20 min.

2.2.4. ODN jungimas prie modelinių DNR fragmentų

ODN prijungimo 20 µl reakcijose buvo naudojama 100-500 ng glikozilintų modelinių DNR fragmentų.

Cu(I) katalizuojamos „click“ reakcijos mišinį sudarė 20 µM Alk, 8 mM CuBr, 24 mM THPTA mišinys, 50 % DMSO. Po 20 min inkubacijos 45 °C temperatūroje, DMSO, esantis reakcijos mišinyje, buvo skiedžiamas iki <1,5 % ir DNR gryninta „GeneJET NGS Cleanup kit“ rinkiniu pagal gamintojo nurodytą A protokolą.

Bevarinėje „click“ reakcijoje buvo naudotas DBCO grupę turintis ODN – DBCO-MOD. Jis gautas 10 µM MOD oligonukleotido inkubuojant 2 val. kambario temperatūroje 20 µl reakcijos mišinyje su 150 mM NaHCO₃ ir 1 mM DBCO-sulfo-NHS esterio. DBCO-MOD išgrynintas naudojant „Oligo Clean & Concentrator“ rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. Bevarinės „click“ reakcijos mišinį sudarė 10 µM DBCO-MOD, 25 % DMSO. Atlikus inkubaciją 2 val. arba per naktį 42 °C temperatūroje, DMSO, esantis reakcijos mišinyje, buvo skiedžiamas iki < 1,5 % ir DNR gryninama „GeneJET NGS Cleanup kit“ rinkiniu pagal gamintojo nurodytą A protokolą.

2.2.5. Adapterių sulydymas

Į reakcijos mišinį su azidavimo buferiniu tirpalu lygiais moliniais kiekiais iki 45 µM koncentracijos buvo įdedami viengrandiniai DNR oligonukleotidai A1 ir A2. Mėginys pakaitintas 3 min 85 °C temperatūroje, toliau temperatūra buvo laipsniškai mažinama po 0,01 °C/s iki 16 °C „Labcycler“ termocikleryje.

2.2.6. Pelės ESC gDNR hmTOP-seq bibliotekų ruošimas

Pelės ESC gDNR buvo suardyta ultragarsu „M220 Focused-ultrasonicator“ („Covaris“) aparatu EB buferiniame tirpale iki ~200 bp ilgio fragmentų pagal gamintojo rekomendacijas. Su fragmentuota gDNR buvo atlikti hmTOP-seq metodikos etapai:

1) 5, 50 ir 500 ng fragmentuotos gDNR 5hmC glikozilimas buvo vykdomas 50 μ l reakcijos mišinyje su 50 μ M UDP-6-N₃-Glc kofaktoriumi ir 5 U BGT 2 val. 37 °C temperatūroje. Paskui fermentas inaktyvintas pakaitinus 20 min 65 °C temp. ir DNR išgryninta naudojant „GeneJET PCR Purification kit“ rinkinį.

2) DNR fragmentų galai buvo paverčiami bukais naudojant „DNA End Repair Kit“ rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas, o po reakcijos DNR gryninama su „GeneJET PCR Purification kit“. Toliau DNR fragmentų 3' galai buvo adeniliniami 60 μ l reakcijos mišinyje su 10 U Klenow exo- DNR polimerazės ir 0,5 mM dATP 37 °C temperatūroje 45 min, fermentą inaktyvinant pakaitinus 75 °C temp. 15 min, DNR išgryninta „DNA Clean & Concentrator-5“ rinkiniu. Dalinai komplementarūs adapteriai A1/A2 prijungti 30 μ l reakcijos mišinyje naudojant 4,5 μ M A1/A2 ir 15 U T4 DNR ligazės, inkubuojama 22 °C temp. per naktį. Kitą dieną buvo atliekamas fermento inaktyvinimas 65 °C temp. 10 min ir DNR gryninta su „DNA Clean & Concentrator-5“ rinkiniu.

3) Toliau buvo vykdoma „click“ reakcija ODN su biotinu prijungimui. 20 μ l reakcijos mišinį sudarė 20 μ M Alk-biotin, 8 mM CuBr, 24 mM THPTA mišinys, 50 % DMSO. Po 20 min inkubacijos 45 °C temperatūroje, DMSO, esantis reakcijos mišinyje, buvo skiedžiamas iki < 1,5 % ir DNR gryninta „GeneJET NGS Cleanup kit“ rinkiniu pagal gamintojo nurodytą A protokolą.

4) Biotinilinta DNR praturtinta su 0,1 mg „Dynabeads MyOne C1 Streptavidin“ magnetinėmis dalelėmis 40 μ l EB buferiniame tirpale su 1 M NaCl, inkubuojant ant „Biosan“ purtyklėlės 3 val. kambario temperatūroje. Toliau magnetinės dalelės buvo plaunamos po du kartus su praplovimo buferiu Nr. 1 ir Nr. 2, vieną kartą su 100 mM NaCl ir galiausiai suspenduotos vandenyje ir pakaitintos 5 min 95 °C temperatūroje streptavidino denatūracijai. Po kaitinimo buvo pasiliekomas supernatantas su jame esančia praturtinta DNR.

5) Praturtinta biotinilinta DNR naudota naujos DNR grandinės sintezės 30 μ l reakcijoje, papildytoje 0,2 mM dNTP, 0,5 μ M A35 pradmens, komplementaraus prijungtam ODN, 1,5 U Pfu DNR polimerazės rekomenduojamame buferyje ir papildomai įpilant 1 mM MgSO₄. DNR

sintezės programa sudaryta iš 95 °C 2 min pradinės denatūracijos, 5 ciklų 95 °C 1 min, 65 °C 10 min, 72 °C 10 min.

6) Patikrinus DNR amplifikacijos efektyvumą (žr. 2.2.7. skyrelį), DNR pagausinimas 100 µl tūryje vykdytas su 22 µl ankstesnės reakcijos (5 etapo) mišinio, „Platinum SuperFi PCR Master Mix“ PGR mišiniu, 0,5 µM Ad-ODN ir Ad-A2 pradmenų „ProFlex“ („Thermo Fisher Scientific“) aparate. Amplifikavimo programa sudaryta iš 94 °C 4 min pradinės denatūracijos, 12 (naudojant 50 ir 500 ng pradinės gDNR) ar 15 (naudojant 5 ng pradinės gDNR) ciklų 95 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min. Po amplifikavimo buvo atrenkami ~300 bp ilgio DNR fragmentai su „MagJET NGS Cleanup and Size-selection kit“ rinkiniu. Galutinių DNR bibliotekų kiekis ir kokybė buvo įvertinami su „Agilent 2100 Bioanalyzer“ („Agilent Technologies“) ir tikro laiko PGR. Bibliotekos buvo nuskaitytos su „Ion Proton“ („Thermo Fisher Scientific“) sekoskaitos sistema.

2.2.7. TOP-seq bibliotekų amplifikavimo efektyvumo vertinimas

TOP-seq bibliotekų amplifikavimą stebėjome tikro laiko PGR sistema. Tai leido tarpusavyje palyginti kontrolinius (be DNR žymėjimo) ir tikslius mėginius bei pasirinkti tokį DNR pagausinimo ciklų skaičių, kad DNR amplifikavimas vyktų eksponentinėje fazėje. 5,5 µl naujos DNR grandinės sintezės reakcijos mišinio (žr. 2.2.6. skyrelį, 5 etapą) naudoti 50 µl reakcijos tūryje, sudarytame iš „Platinum SuperFi PCR Master Mix“ PGR mišinio, 0,5 µM Ad-ODN ir Ad-A2 pradmenų bei 0,08x SYBR Green I dažo. DNR amplifikavimas vykdytas „Rotor-Gene Q“ („Qiagen“) aparate, programa sudaryta iš 95 °C 5 min pradinės denatūracijos, 25 ciklų 95 °C 60 s, 60 °C 60 s, 72 °C 60 s. Rezultatai apdoroti programine įranga „Rotor-Gene 6000 Series 1.7“ („Corbett Life Science“).

2.2.8. Neuroblastomos ląstelių kultivavimas

NB ląstelių linijos buvo auginamos MEM su nebūtinosiomis aminorūgštimis ir Ham's F12 terpių 1:1 mišinyje, papildytame 1x GlutaMAX, penicilinu (100 U/ml), streptomycinu (100 µg/ml) ir 15 % jaučio embrioniniu serumu (FBS) (SK-N-BE(2)), 15 % karščiu inaktyvintu FBS (BE(2)-C ir BE(2)-M17) arba 10 % FBS (LA-N-1, LA1-5s ir LA1-55n) 37 °C temperatūroje, atmosferoje palaikant 5 % CO₂ „NuAire“ inkubatoriuje. Hipoksinėmis sąlygomis ląstelės buvo auginamos atmosferoje palaikant 1 % O₂ ir 5 % CO₂ (naudotas „Binder“ inkubatorius, dr. A. Kanopkos grupėje, VU GMC BTI Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje). Rutiniam auginimui persėjant ląsteles, jos buvo praplaunamos su PBS, užpilamos 0,25-0,5 %

tripsino tirpalu, kelias minutes palaikomos 37 °C temperatūroje, vėliau tripsino inaktyvinimui užpilamos auginimo terpe su FBS, nusodinamos centrifuguojant 1000 rpm greičiu. Ląstelės buvo skaičiuojamos su hemacitometru, negyvos ląstelės stebėtos nudažius su tripano mėliu.

2.2.9. NB genominės DNR skyrimas

NB ląstelės, augintos 25 cm² indelyje, užpiltos 5 ml lizės buferio su 0,2 mg/ml Proteinazės K ir inkubuotos 55 °C temperatūroje 2-4 val. Baltymai pašalinti užpilant lygų tūrį fenolio:chloroformo:izoamilo alkoholio mišinio, nucentrifuguota 16 000 g, viršutinė vandeninė fazė perkelta į naują mėgintuvėlį. Tai kartota 2-3 kartus, toliau praplauta 2 kartus su chloroformu. Nukleorūgštys buvo išsodinamos įpylus 1/10 tūrio 3 M CH₃COONa ir lygų tūrį izopropanolio, šaldoma skystame azote 5 min arba -20 °C temperatūroje per naktį, centrifuguojama 20 000 g 4 °C temperatūroje. Nuosėdos buvo praplautos su 75 % EtOH, išdžiovintos ir ištirpintos EB buferiniame tirpale. RNR pašalinimui buvo įpilama 1/100 tūrio A/T1 RNazių mišinio, inkubuojama 50 °C temperatūroje 1-2 val. RNazė pašalinta pakartojus plovimus su fenoliu, chloroformu. Išgrynintos DNR kokybė įvertinta elektroforetiškai agarozės gelyje. DNR koncentracija nustatyta spektrofotometriškai su „NanoDrop 2000“ („Thermo Fisher Scientific“) arba fluorescenciniu būdu su „Qubit fluorometer“ („Thermo Fisher Scientific“) aparatu.

2.2.10. gDNR kiekybinė analizė didelio našumo skysčių chromatografijos-tandeminės masių spektrometrijos (HPLC-MS/MS) metodu

1 μg NB gDNR, 500 ng kraujo leukocitų gDNR arba 100-500 ng choriono gaurelių gDNR buvo hidrolizuojama su 0,5 U nukleazės P1 42 μl reakcijos mišinyje 2 val. 55 °C temperatūroje. Tada nukleotidų defosforilinimui reakcijos mišinys buvo papildomas 1 U FastAP fosfatazės ir inkubuojamas 37 °C temperatūroje per naktį. Mėginiai HPLC-MS/MS sistema buvo praleisti A. Rukšėnaitės (VU GMC BTI DNR modifikacijos tyrimų skyrius). Mėginių kalibravimui naudoti 5mdC, 5hmdC, dG nukleozidų standartai. Duomenų analizė atlikta „MassHunter“ („Agilent Technologies“) programine įranga.

2.2.11. NB ląstelių gDNR hmTOP-seq bibliotekų ruošimas

800-1000 ng ardytos NB ląstelių gDNR 5hmC glikozilinimas buvo atliktas 100 μl reakcijos mišinyje su 50 μM UDP-6-N₃-Glc kofaktoriumi ir 10 U BGT. DNR bibliotekos buvo amplifikuotos 12 ciklų. Visos kitos bibliotekų ruošimo reakcijos atliktos taip kaip aprašyta 2.2.6. skyrelyje.

2.2.12. NB ląstelių gDNR uTOP-seq bibliotekų ruošimas

500 ng ardytos NB ląstelių gDNR buvo inkubuota 30 μ l azidinio buferiniame tirpale su 200 μ M Ado-6-N₃ kofaktoriaus ir 0,5 μ M eM.SssI 1 val. 30 °C temperatūroje. Paskui fermentas inaktyvintas pakaitinus 20 min 65 °C temp., hidrolizuotas su 0,2 mg/ml Proteinazės K 30 min 55 °C temperatūroje ir DNR išgryninta naudojant „DNA Clean & Concentrator-5“ rinkinį. DNR bibliotekos buvo amplifikuotos 11 ciklų. Visi kiti bibliotekų ruošimo etapai atlikti taip kaip aprašyta 2.2.6. skyrelyje.

2.2.13. Visuminės RNR skyrimas

Visuminės RNR skyrimui NB ląstelės po 72 val. auginimo normoksijos arba hipoksijos sąlygomis buvo užpilamos „RNAzol RT“ tirpalu tiesiai auginimo indeliuose ir RNR skiriama pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.14. Kopijinės DNR (kDNR) sintezė

Siekiant išvengti DNR taršos, 1,5-2 μ g visuminės RNR buvo paveikiama su dsDNaze pagal gamintojo rekomendacijas. Toliau kDNR sintezė buvo atliekama 20 μ l reakcijos mišinyje su 1 mM dNTP, 5 μ M atsitiktinių heksamerinių pradmenų, 20 U „RiboLock“ RNazės slopiklio ir 200 U „RevertAid“ atvirkštinės transkriptazės, inkubuota 10 min 25 °C, 60 min 42 °C, galiausiai inaktyvinta pakaitinus 70 °C temperatūroje 10 min.

2.2.15. DNR kiekių vertinimai tikro laiko PGR

Modelinių DNR fragmentų ir kDNR kiekio nustatymas. Tikro laiko PGR mišiniai paruošti naudojant „Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix“, įdedant modeliniams DNR fragmentams ar kDNR specifinių pradmenų iki 0,3 μ M koncentracijos. DNR fragmentų hidrolizės reakcijos mišiniai buvo skiedžiami vandeniu 25 kartų, kDNR – 10 kartų, atlikta po du kiekvieno mėginio pakartojimus. PGR vykdyta „Rotor-Gene Q“ aparate. Modelinių DNR fragmentų analizės programa buvo sudaryta iš 95 °C 10 min pradinės denatūracijos, 40 ciklų 95 °C 15 s, 60 °C 60 s. kDNR analizės programa sudaryta iš 95 °C 10 min pradinės denatūracijos, 40 ciklų 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s. Rezultatai apdoroti programine įranga „Rotor-Gene 6000 Series 1.7“. Santykinė tiriamųjų iRNR ir 3'nkRNR raiška buvo nustatoma Δ Ct metodu, lyginant su kontrolinio *B2M* geno raiška (Ct – ciklo numeris, kai pasiekama slenkstinė fluorescencijos vertė).

TOP-seq bibliotekų kiekybinis vertinimas. Galutinės paruoštos TOP-seq bibliotekos buvo skiedžiamos 5-50 kartų ir įpilamos į reakcijos mišinį su „Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix“ ir 0,3 μ M koncentracijos

A35 ir Ad-A2 DNR oligonukleotidais. DNR analizės programa sudaryta iš 95 °C 10 min pradinės denatūracijos, 40 ciklų 95 °C 15 s, 60 °C 60 s. DNR kiekis nustatytas pagal kalibracinę, supilstomą iš anksčiau sėkmingai sekoskaitos būdu išanalizuotos TOP-seq DNR bibliotekos.

2.2.16. RNR sekoskaitos bibliotekų ruošimas

iRNR (turinti poli-A uodegą) buvo skiriama iš 5 µg visuminės NB ląstelių RNR naudojant „Dynabeads mRNA Purification Kit“ magnetines daleles, turinčias oligo-(dT)₂₅ nukleotidus. Toliau RNR papildomai buvo valoma nuo rRNR taršos su „RiboCop rRNA Depletion Kit“ rinkiniu. Išgryninta RNR buvo naudojama RNR bibliotekų ruošimui su „Ion Total RNA-Seq Kit v2“ rinkiniu, bibliotekos nuskaitytos su „Ion Proton“ sekoskaitos sistema. Visi paminėti rinkiniai buvo naudojami pagal pateiktas gamintojo rekomendacijas.

2.2.17. Žaizdos gijimo testas

NB ląstelės buvo auginamos 24 šulinėlių plokšteleje. Susiformavus ląstelių monosluoksniui, jame buvo padaromas įbrėžimas (žaizda) su steriliu 200 µl plastikiniu pipetės antgaliu, ląstelės atsargiai praplaunamos ir užpilamos auginimo terpe su 1 % FBS. Ląstelės buvo fotografuojamos su „Primovert“ („Zeiss“) mikroskopu iš karto po žaizdos padarymo (0 val.) ir praėjus 24 bei 48 valandoms. Žaizdos plotas buvo pamatuotas naudojantis „ImageJ“ (NIH) programa.

2.2.18. cfDNR uTOP-seq ir hmTOP-seq bibliotekų ruošimas

cfDNR bibliotekos ruoštos taip, kaip aprašyta 2.2.6. ir 2.2.12. skyreliuose, esant šiems pakeitimams:

- 1) uTOP-seq: 4-10 ng cfDNR buvo inkubuota su 0,11 µM eM.SssI.
hmTOP-seq: 5-10 ng cfDNR 5hmC glikozilinimas buvo atliktas reakcijos mišinyje su 2,5-5 U T4 BGT.
- 2) Adapterių prijungimo reakcijose naudota 5 U Klenow exo- DNR polimerazės ir 5 U T4 DNR ligazės.
- 3-4) uTOP-seq atveju buvo naudotas nebiotinilintas ODN Alk ir DNR praturtinimo žingsnis nebuvo vykdomas.
- 5) Naujos DNR grandinės sintezė vykdyta 20 µl reakcijos mišinyje su 1 U Pfu DNR polimerazės.
- 6) DNR pagausinimas buvo vykdomas su visu ankstesnės reakcijos mišiniu. DNR bibliotekos buvo amplifikuotos 15 ciklų (uTOP-seq atveju) arba 17 ciklų (hmTOP-seq atveju). Po amplifikavimo buvo atrenkami ~270 bp ilgio DNR fragmentai su „MagJET NGS Cleanup and Size-selection kit“ rinkiniu.

2.2.19. Regioninė uTOP-PGR

1) Pirmiausiai tiriamoji DNR buvo kovalentiškai pažymima azido grupėmis nemodifikuotose uCG sekose.

100-300 ng NB ląstelių, kraujo leukocitų gDNR ar placentos choriono gaurelių gDNR buvo inkubuota azidinio buferiniame tirpale su 200 μ M Ado-6-N₃ kofaktoriaus ir eM.SssI dukartiniu pertekliumi prieš genomo CG sekas ([CG]:[eM.SssI] = [1]:[2]) 1 val. 30 °C temperatūroje. Paskui fermentas inaktyvintas pakaitinus 20 min 65 °C temp., hidrolizuotas su 0,2 mg/ml Proteinazės K 30 min 55 °C temperatūroje ir DNR išgryninta naudojant „DNA Clean & Concentrator-5“ arba „GeneJET PCR purification kit“ rinkinį.

6-30 ng kraujo plazmos cfDNR buvo inkubuota azidinio buferiniame tirpale su 200 μ M Ado-6-N₃ kofaktoriaus ir 0,11 μ M eM.SssI. Po reakcijos cfDNR buvo išgryninta su „Oligo Clean & Concentrator“ rinkiniu.

2) Visa azidinta DNR buvo naudota „click“ reakcijoje ODN Alk prijungimui kaip tai aprašyta 2.2.6. skyrelyje, 3 etape. Po reakcijos gDNR gryninta „GeneJET NGS Cleanup kit“ rinkiniu, o cfDNR – „MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit“ rinkiniu pagal gamintojo rekomendacijas.

3) 1-3 ng gDNR ir cfDNR (ar jų mišinių) po ODN prijungimo buvo pagausinama 20 μ l reakcijos mišinyje su „Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix“ ir 0,5 μ M pradmenų, specifinių pasirinktiems gDNR regionams ir prijungtam ODN. PGR vykdyta „Rotor-Gene Q“ aparate, programa buvo sudaryta iš 95 °C 10 min pradinės denatūracijos, 40 ciklų 95 °C 15 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s. Programine įranga „Rotor-Gene 6000 Series 1.7“ įvertintas kiekvieno mėginio Ct.

2.2.20. Vaisiaus kariotipo nustatymas kiekybinės PGR analize, panaudojant TOP-seq bibliotekas

0,5 ng galutinės cfDNR TOP-seq bibliotekos, paruoštos pagal 2.2.18. skyrelį, buvo naudojama 20 μ l reakcijos mišinyje su „Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix“ ir 0,5 μ M koncentracijos pradmenų, specifinių pasirinktiems gDNR regionams, esantiems šalia tiriamųjų uCG ir 5hmCG sekų. PGR vykdyta „Rotor-Gene Q“ aparate, programa sudaryta iš 95 °C 10 min pradinės denatūracijos, 40 ciklų 95 °C 15 s, 60 °C 60 s. Programine įranga „Rotor-Gene 6000 Series 1.7“ įvertintas kiekvieno mėginio Ct. Į 3.40 pav. įtraukti tik tie mėginiai, kurių PGR slenkstinė ciklo vertė buvo ≤ 34 .

2.2.21. Bioinformatinė analizė

Pelės ESC ir NB ląstelių gDNR TOP-seq bei NB RNR sekoskaitos bibliotekų bioinformatinę analizę atliko dr. J. Gordevičius ir dr. P. Gibas. Choriono gaurelių gDNR ir kraujo plazmos cfDNR TOP-seq bibliotekų analizę atliko dr. J. Gordevičius, dr. P. Gibas ir K. Kvederavičiūtė.

Aukštos kokybės ir pakankamo ilgio TOP-seq sekoskaitos nuskaitymai buvo prilyginti pelės mm10 arba žmogaus hg19 genomams ir atrinkti tik aukštus sugretinimo įverčius turintys DNR fragmentai (pagal Staševskij et al., 2017). Prieš tolimesnę duomenų analizę buvo atliktas PGR dublikatų šalinimas: iš prilygintų DNR fragmentų, turinčių tokią pačią pradžios koordinatę ir esančių tokio paties ilgio, palikta tik viena jų kopija. 5hmCG padengimas paskaičiuotas naudojant nuskaitymus, kurie prasidėjo iki 3/4 nt atstumu nuo CG, o 5hmCH – tiksliai nuo CH sekos. NB skirtingo hidroksimetilinimo genai surasti tikrinant t-testu pagal geno CG sekų h-density įverčius, kai $q < 0,05$ (q – tai pagal FDR (angl. false discovery rate) koreguota p vertė).

Neapdoroti NB RNR sekoskaitos duomenys buvo prilyginti žmogaus hg19 genomui ir kvantifikuoti, naudojant „STAR“ programą. Analizei atrinkti genai, turintys bent 5 nuskaitymus, duomenys normalizuoti viršutinio kvartilio metodu, paskaičiuoti log₂ transformuoti RPKM (angl. reads per kilobase per million reads mapped) įverčiai. Skirtingos raiškos genai surasti pagal log₂ transformuotos raiškos pokytį $> 0,5$, kai $q < 0,05$.

Genomų sekos, CG salų ir replikacijos laiko regionų (SK-N-SH) duomenys atsiųsti iš „UCSC“ geno naršyklės. Referentinių genų rinkiniai atsiųsti iš „GENCODE“ duomenų bazės (Frankish et al., 2019). CG salų krantai apibūdinti kaip 2 kb ilgio regionai aplink CG salas, tarpgeniniai regionai – regionai, esantys 50 kb atstumu nuo baltymus koduojančių genų. Pelės ESC histonų modifikacijų ir pelės ESC RNR sekoskaitos duomenys naudoti iš „ENCODE“ duomenų bazės (Davis et al., 2018). HIF1, HIF2 jungimosi regionų duomenys naudoti iš Schodel et al., 2011. NB ląstelėms (SK-N-SH) specifiniai stiprikliai paimti iš Gao et al., 2016, ADRN ir MES tipams specifiniai super-stiprikliai – iš van Groningen et al., 2017.

Autorė atliko funkcinę genų praturtinimo analizę, naudojant GO (angl. gene ontology) genų rinkinius su „GORilla“ įrankiu (Eden et al., 2009) bei „Hallmark“ genų rinkinius iš „MSigDB“ duomenų bazės (Subramanian et al., 2005; Liberzon et al., 2015). NB GO analizėje kaip palyginamasis genų sąrašas buvo naudoti visi žmogaus baltymus koduojantys genai.

3. REZULTATAI

3.1. hmTOP-seq metodo kūrimas, validavimas ir įvertinimas pelės embrioninių kamieninių ląstelių viso genomo 5hmC analizėje

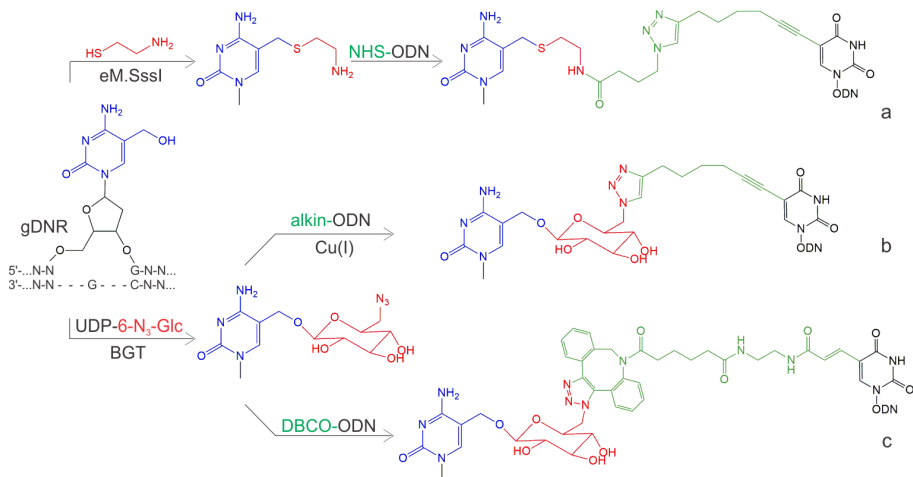
Anksčiau mūsų tyrėjų grupė sėkmingai sukūrė bisulfitinės konversijos nenaudojantį uTOP-seq (angl. unmodified CG-specific tethered oligonucleotide-primed sequencing) metodą, leidžiantį didele skiriamąja geba analizuoti nemodifikuotas CG sekas (Staševskij et al., 2017). Todėl dabar norėjome panaudoti sukauptas žinias ir DNR žymėjimu paremtos sekoskaitos technologiją pritaikyti naujo metodo, skirto 5hmC genolapių sudarymui vienos bazės tikslumu, sukūrimui.

3.1.1. hmTOP-seq metodo kūrimas

Anksčiau sukurtame uTOP-seq metode prie azido grupę pažymėtų nemodifikuotų CG sekų „click“ reakcijos metu yra prijungiamas oligodeoksiribonukleotidas (ODN), kuriam komplementaraus pradmens panaudojimas leidžia vykdyti naujos DNR grandinės sintezę nuo žymėto C (žr. 1.14 pav.). Šią strategiją – DNR sintezę, inicijuojamą nuo prijungto ODN, TOP (angl. tethered oligonucleotide-priming) – norėjome panaudoti ir 5hmC specifiniam analizės metodui hmTOP-seq (angl. 5hmC-specific TOP-seq). Todėl pirmiausiai reikėjo pasirinkti būdą, kaip kovalentiškai pažymėti 5hmC ir prie jo prijungti DNR oligonukleotidą.

3.1.1.1. 5hmC žymėjimas

Kovalentinis 5hmC žymėjimas buvo išbandytas dviem būdais (žr. 3.1 pav.). Pirmasis galimas variantas yra paremtas netipine bakterinės metiltransferazės SssI mutanto su praplėsta kofaktoriaus surišimo kišene reakcija – 5hmC, esančių CG sekose, modifikavimu alifatiniais tioliais (Liutkevičiūtė et al., 2011). Panaudojant cisteaminą (2-merkpto-etilaminą), 5hmC buvo pažymimas aminogrupe, prie kurios buvo jungiamas ODN, turintis N-hidroksisukcinimido (NHS) esterinę grupę (žr. 3.1 pav., a variantas). Tačiau vėlesni detalūs tokio ODN prijungimo tyrimai parodė, kad jis yra mažo efektyvumo – tik ~24 % (Z. Staševskij duomenys). Taip pat atlikus TOP DNR sintezę buvo stebėti nespecifiniai amplifikacijos produktai, susidarantys galimai dėl NHS esterio prisijungimo prie DNR bazių egzociklinių aminogrupių.

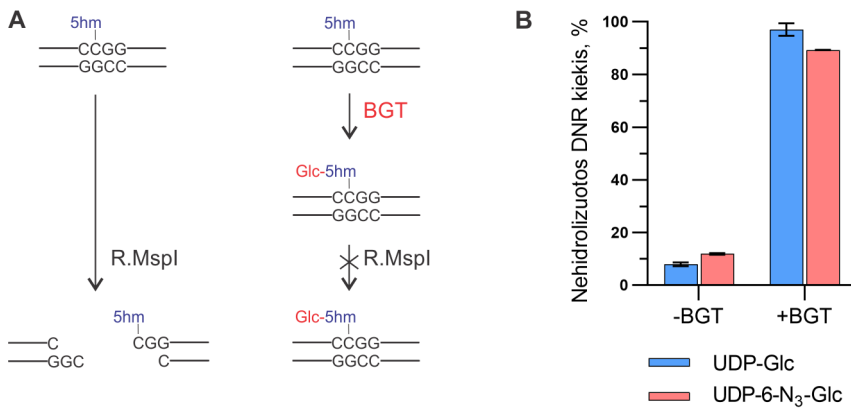


3.1 pav. Galimi kovalentinio 5hmC žymėjimo ir DNR oligonukleotido jungimo prie jo būdai. Mutantinės bakterinės DNR MTazės SssI (eM.SssI) katalizuojamos reakcijos metu prie 5hmC prijungiamas cisteaminas ir vėliau ODN, turintis NHS esterio grupę (NHS-ODN) (a variantas). BGT katalizuoja 5hmC glikozilinimą, po kurio galimas ODN su terminaline alkino grupe (alkin-ODN) (b variantas) arba ODN, turinčio DBCO grupę (DBCO-ODN) (c variantas), prijungimas.

Antrasis 5hmC kovalentinio žymėjimo variantas – T4 bakteriofago β-gliukoziltransferazės (BGT) katalizuojamas 5hmC glikozilinimas, reakcijoje naudojant sintetinį uridino difosfato 6-N₃-gliukozės (UDP-6-N₃-Glc) kofaktorių, leidžiantį 5hmC pažymėti azido grupe. Tuomet toliau ODN gali būti jungiamas prie N₃- grupės Cu(I) katalizuojamos (žr. 3.1 pav., b) arba bevarinės azido-alkino cikloprijungimo („click“) reakcijos metu (žr. 3.1 pav., c).

Naudodami modelinį 188 bp ilgio DNR fragmentą, gautą PGR būdu nuo pelės genomines DNR (gDNR) (žr. 2.2.1. skyrelį), tikrinome BGT glikozilinimo reakcijos efektyvumą su natūraliu UDP-Glc ir funkcionalizuotu UDP-6-N₃-Glc kofaktoriumi (žr. 2.2.2.). 188 bp DNR fragmentas turi tik vieną 5hmC modifikaciją (įvedamą PGR pradžios cheminės sintezės metu) restrikcijos endonukleazės MspI atpažįstamoje CCGG sekoje. R.MspI geba hidrolizuoti DNR, kai jos taikinio sekoje yra 5hmC (C⁵hmCGG), tačiau nehidrolizuoja DNR fragmento, jei 5hmC yra glikozilintas (žr. 3.2 A pav.). Tikro laiko PGR metodu buvo stebėtas nehidrolizuoto, t. y. glikozilinto, 188 bp DNR fragmento kiekis (žr. 2.2.3., 2.2.15.). Tyrimo rezultatai parodė, kad 5hmC yra labai efektyviai glikozilinamas net naudojant sintetinį UDP-6-

N₃-Glc kofaktorių su azidinta gliukoze – po poveikio R.MspI lieka ~89,3 % nehidrolizuotų glikozilintų DNR fragmentų (žr. 3.2 B pav.).

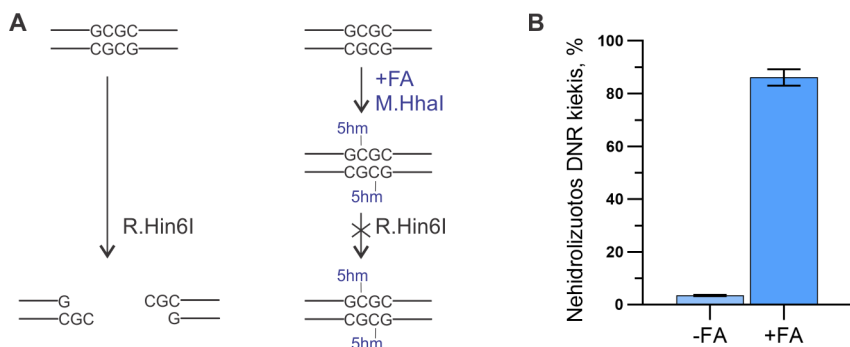


3.2 pav. 5hmC glikozilinio efektyvumo tikrinimas. A) R.MspI pasižymi skirtingu jautrumu 5hmC ir Glc-5hmC atpažįstamoje DNR sekoje. 5hmC glikozilinimą vykdo T4 BGT fermentas. B) 188 bp modelinio DNR fragmento 5hmC glikozilinio vertinimas, stebint R.MspI nehidrolizuotos DNR kiekius tikro laiko PGR sistema. Glikozilinio reakcijoje naudojamas gamtinis UDP-Glc arba funkcionalizuotas UDP-6-N₃-Glc kofaktoriūs.

3.1.1.2. ODN konjugavimas panaudojant azido-alkino cikloprijungimo reakciją

Toliau tikrinome, kuris „click“ reakcijos variantas yra efektyvesnis DNR oligonukleotido jungimui prie azido grupę žymėto 5hmC – Cu(I) katalizuojama reakcija ar tokia, kuriai vario jonų katalizė nėra reikalinga. Tyrimams naudojome 155 bp modelinį DNR fragmentą, gautą PGR būdu nuo žmogaus gDNR, ir turintį vieną bakterinės DNR metiltransferazės HhaI atpažįstamą GCGC seką. Reakcijos mišinyje esant formaldehidui M.HhaI geba hidroksimetilinti vidinius GCGC sekų citozinius abiejose modelinio fragmento DNR grandinėse (paruoštas Z. Staševskij, pagal Liutkevičiūtė et al., 2009). 5hmC susidarymas buvo patikrintas R.Hin6I hidrolizės reakcijos metu – tik nemodifikuota G[^]CGC seka yra hidrolizuojama, o jos hidroksimetilinimas slopina DNR hidrolizę (žr. 3.3 A pav.). Tikro laiko PGR metodu stebint nehidrolizuoto 155 bp DNR fragmento kiekį buvo įvertinta, kad M.HhaI geba hidroksimetilinti ~86,2 % DNR fragmentų (žr. 3.3 B pav.). Svarbu paminėti, kad 155 bp DNR fragmentas buvo netinkamas 5hmC glikozilinio reakcijos efektyvumo vertinimui (tam naudotas 188 bp DNR fragmentas, žr. 3.2 pav.), nes R.Hin6I hidrolizuoja tik visiškai nemodifikuotą

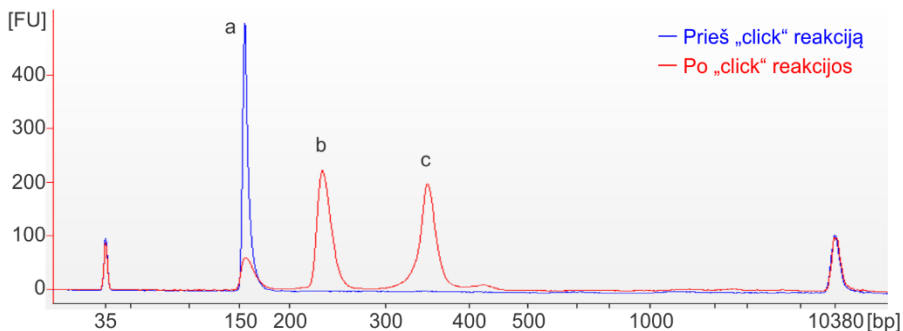
atpažinimo seką ir nėra tokio izoizomero, kuris būtų nejautrus sekos hidroksimetilinimui.



3.3 pav. DNR hidroksimetilinimo efektyvumo tikrinimas. A) R.Hin6I hidrolizuoja nemodifikuotą atpažįstamą DNR seką, tačiau ją hidroksimetilinus su bakterine DNR metiltransferaze HhaI, reakcijos mišinyje esant formaldehido (FA), REazė hidrolizės nebevykdo. B) 155 bp modelinio DNR fragmento hidroksimetilinimo (reakcijoje naudojant FA ir M.HhaI) vertinimas, stebint R.Hin6I nehidrolizuotos DNR kiekius tikro laiko PGR sistema.

Hidroksimetilintą 155 bp DNR fragmentą pažymėjus azidinta gliukoze, toliau buvo vykdomas DNR oligonukleotido, turinčio terminalinę alkino grupę, prijungimas Cu^+ jonų katalizuojamos „click“ reakcijos metu (žr. 3.1 pav., b variantas; 2.2.4.). Prie DNR fragmento prijungus ODN pakinta jo elektroforetinis judrumas, todėl „click“ reakcijos produktus galima stebėti agarozės gelyje arba „Agilent Bioanalyzer“ elektroforezės sistema. Pastaruoju būdu kiekybiškai įvertinome, kad Cu(I) katalizuojamo DNR oligonukleotido, turinčio terminalinę alkino grupę, prijungimo efektyvumas siekia iki 77 % (žr. 3.4 pav.). Tai yra labai aukštas efektyvumas, atsižvelgiant į tai, kad šimtaprocentinio prijungimo stebėti negalime dėl nepilnai vykstančių DNR fragmento hidroksimetilinimo (3.3 B pav.) ir glikozilimo (3.2 B pav.) reakcijų.

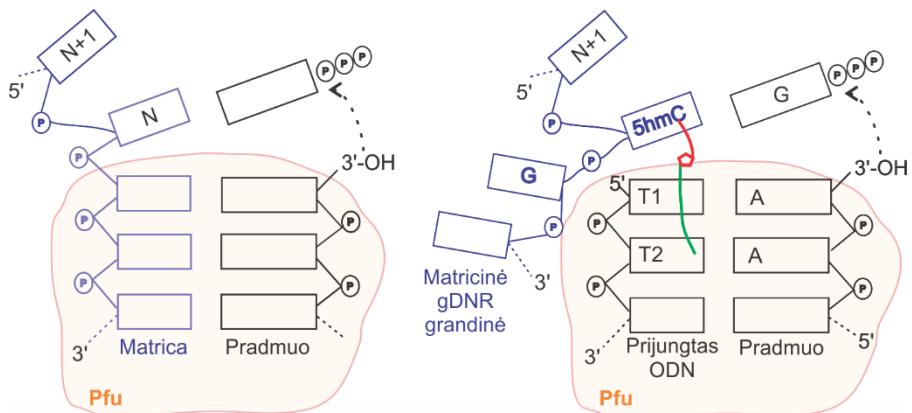
Taip pat prie glikozilinto 155 bp DNR fragmento išbandėme DNR oligonukleotido, turinčio dibenzociklooktino (DBCO) grupę, prijungimą (žr. 3.1 pav., c variantas; 2.2.4.). DBCO įtemptame ciklooktino žiede yra alkino grupė, kuri yra pakankamai reaktyvi ir šiuo atveju azido-alkino cikloprijungimo reakcija vyksta be katalizatoriaus. Tačiau mes stebėjome tik iki 3 % siekiantį DBCO-ODN prijungimą prie azido grupės žymėto hidroksimetilinto DNR fragmento, todėl toliau hmTOP-seq metode pasirinkome naudoti ODN, turintį terminalinę alkino grupę.



3.4 pav. „Click“ reakcijos efektyvumo elektroforetinis vertinimas „Agilent Bioanalyzer“ sistema. Mėlyna – glikozilintas 155 bp DNR fragmentas prieš ODN prijungimą, raudona – po ODN prijungimo. Stebimas pradinis 155 bp DNR fragmentas (a) bei „click“ reakcijos produktai, ODN prisijungus vienoje (b) arba abiejose (c) modelinio DNR fragmento grandinėse. FU – fluorescencijos vienetai, 35 ir 10380 bp DNR fragmentai – DNR ilgio standartai.

3.1.1.3. DNR sintezė, inicijuojama nuo prijungto ODN

Prie azido grupe pažymėtų 5hmC „click“ reakcijos metu prijungus ODN, toliau naudojant jam komplementarų pradmenį galima vykdyti naujos DNR grandinės sintezę nuo žymėto 5hmC. Šiai reakcijai naudojome Pfu DNR polimerazę ir pagal esamą šio fermento kartu su DNR kristalinę struktūrą pasiūlėme DNR kovalentinio žymėjimo paremtos DNR sintezės modelį (žr. 3.5 pav.). DNR polimerazė stipriai suriša dvigrandinę DNR dalį (matricinę gDNR ir jai komplementaraus pradmens dupleksą), o viengrandinė matricinės gDNR 5' dalis yra laisvesnė ir potencialiai gali įgauti įvairias konformacijas (Wynne et al., 2013). Todėl manome, kad prie žymėto 5hmC prijungto ODN ir jam komplementaraus pradmens dupleksas išsidėsto Pfu aktyviajame centre, o gDNR grandinė įgauna tokią konformaciją, kad gali toliau dalyvauti DNR sintezėje kaip matrica (žr. 3.5 pav.). Pfu DNR polimerazės aktyviojo centro kišenė atrodo esanti pakankamai erdvi (žr. P1 pav. prieduose), kad joje galėtų tilpti prie gDNR „click“ reakcijos metu prijungtas ODN ir tai užtikrina naujos DNR grandinės sintezę nuo žymėto 5hmC.



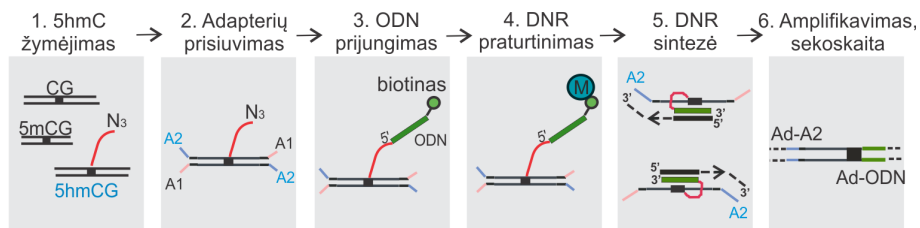
3.5 pav. Pfu DNR polimerazės vykdomo pradmens, komplementaraus gDNR (kairėje), ir pradmens, komplementaraus prie 5hmC kovalentiškai prijungto ODN (dešinėje), pradžios reakcijos schemas.

3.1.1.4. hmTOP-seq metodo schemas pasiūlymas

Kadangi žinduolių ląstelių DNR yra labai maži 5hmC kiekiai (0,03-1,2 % nuo visų C (Globisch et al., 2010; Szwagierczak et al., 2010; Nestor et al., 2012)), siekiant padidinti žymėtų 5hmC turinčių DNR fragmentų kiekį, jie buvo praturtinami. Šiuo tikslu prie N₃-Glc žymėtų DNR fragmentų prijungėme ODN su biotino molekulėmis. Tai leidžia iš bendro DNR mišinio išgryninti biotinilintus DNR fragmentus naudojant streptavidinu dengtas magnetines daleles. Taip pat vengdami per didelio bibliotekų peramplifikavimo, lemiančio PGR dublikatų kiekio augimą ir artefaktų susidarymą, labai kruopščiai parinkome bibliotekų gausinimo ciklus. DNR mėginių amplifikaciją galima stebėti tikro laiko PGR metodu (žr. 2.2.7.) ir pagal tai pasirinkti minimalų, bet pakankamą ciklų skaičių, kad tikslinės bibliotekos DNR fragmentų kiekis būtų užtektinas sekoskaitai. Be to, DNR amplifikavimui parinkome labai tikslią „Platinum SuperFi“ DNR polimerazę, kuri tinkama efektyviam genominių bibliotekų padauginimui PGR.

Taigi, pritaikę visus šiuos patobulinimus bei įvertinę tiek 5hmC žymėjimo azidinta gliukoze efektyvumą, tiek pasirinkę DNR oligonukleotido prijungimo prie žymėto 5hmC būdą, galėjome pasiūlyti galutinę hmTOP-seq schemą (žr. 3.6 pav.; 2.2.6.): 1) sufragmentuotos tiriamosios gDNR tik 5hmC yra specifiskai kovalentiškai pažymimi azido grupėmis BGT katalizuojamos reakcijos metu, 2) prie gDNR fragmentų galų yra prisuviami šakoti adapteriai, reikalingi DNR pagausinimui prieš sekoskaitą (dalinai komplementarios adapterių sekos užtikrina, kad būtų amplifikuojamos tik 5) etape susidarančios DNR grandinės, bet ne pradiniai gDNR fragmentai), 3) prie azido grupėmis

žymėtų 5hmC yra prijungiamas 3' gale biotinizintas DNR oligonukleotidas Cu(I) katalizuojamos „click“ reakcijos metu, 4) žymėti hidroksimetilinti DNR fragmentai praturtinami magnetinėmis streptavidinu dengtomis dalelėmis, 5) pradmuo, komplementarus prijungtam ODN, panaudojamas naujos DNR grandinės sintezei, prasidedančiai nuo žymėto 5hmC, 6) naujai susintetinta DNR yra padauginama ir paruošiama sekoskaitai.

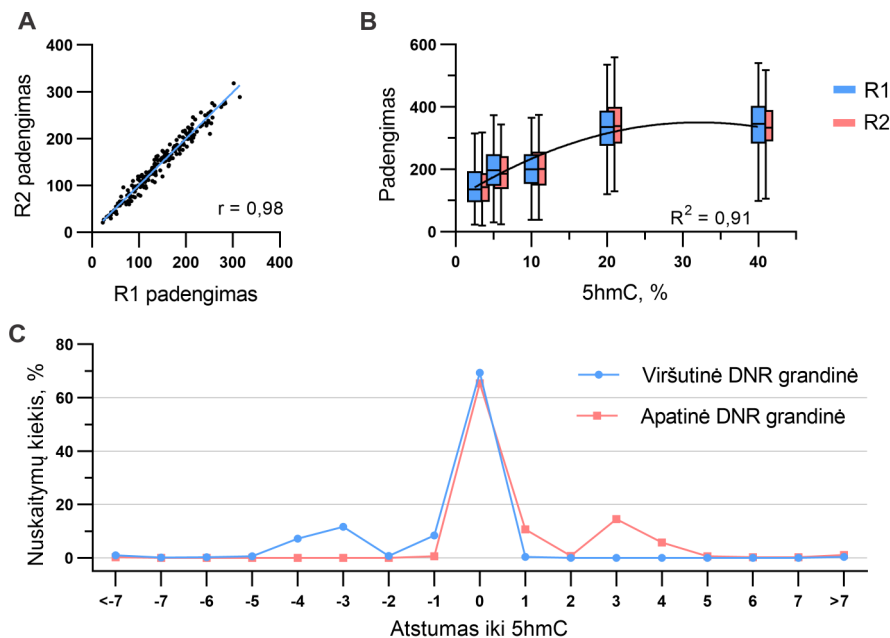


3.6 pav. hmTOP-seq metodo schema. 4-ajame etape „M“ raidė žymi streptavidinu dengtas magnetines daleles. 6-ajame etape DNR amplifikavimui naudojami pradmenys, komplementarus A2 adapteriui (Ad-A2) ir prijungtam ODN (Ad-ODN) bei turintys „Ion Proton“ sekoskaitos platformai specifines sekas.

3.1.2. hmTOP-seq metodo validavimas

Sukurto hmTOP-seq metodo gebėjimas nustatyti skirtingus 5hmC kiekius buvo įvertintas su modeline 48,5 kb bakteriofago lambda DNR, *in vitro* hidroksimetilinta CG sekose, persidengiančiose su M.HhaI GCGC taikiniiais. Buvo paruoštos hmTOP-seq bibliotekos iš λ DNR, turinčios skirtingus kiekius 5hmC – 2,5 %, 5 %, 10 %, 20 % ir 40 % hidroksimetilintų GCGC sekų, gautų atitinkamais kiekiais sumaišius pilnai hidroksimetilintą ir visai nemodifikuotą DNR (paruošė Z. Staševskij, pagal Liutkevičiūtė et al., 2009 metodiką). Sekoskaitos (vidutiniu 240x GCGC padengimu (apdorotų nuskaitymų, priskirtų konkrečioms sekoms, kiekiu)) rezultatai parodė, kad hmTOP-seq metodas leidžia patikimai aptikti 5hmC – bibliotekose buvo identifikuotos visos 215 hidroksimetilintų GCGC sekų su itin aukšta koreliacija (vidutiniškai $r = 0,98$) tarp kiekvienos skirtingos bibliotekos techninių pakartojimų (žr. 3.7 A pav.). Nors hmTOP-seq negalima nustatyti absoliutaus DNR sekų hidroksimetilinimo lygio, tačiau šis metodas leidžia patikimą pusiau kiekybinę (angl. semiquantitative) 5hmC analizę, įvertinant santykinius 5hmC kiekius – didėjant GCGC sekų hidroksimetilinimo lygiui stebėjome didėjantį vidutinį jų padengimą (žr. 3.7 B pav.). Labai svarbu pažymėti, kad hmTOP-seq įgalina didelės skyros 5hmC nustatymą – iš viso net 98 % sekoskaitos nuskaitymų prasidėjo iki 4 nt atstumu nuo 5hmC, ir iš jų didžioji dauguma

(~67 %) nuskaitymų prasidėjo tiksliai nuo 5hmC, esančio GCGC sekose (žr. 3.7 C pav.). Kadangi λ DNR buvo *in vitro* hidroksimetilinta tik GCGC taikiniuose, tai mums leido įsitikinti, kad nuskaitymai, prasidedantys iki 4 nt atstumu nuo šių sekų vidinių citozinų, būtent jiems ir turi būti priskiriami. Taigi, mes parodėme, kad potencialiai hmTOP-seq metodas gali būti pritaikytas tiksliai 5hmC genominių pozicijų nustatymui.

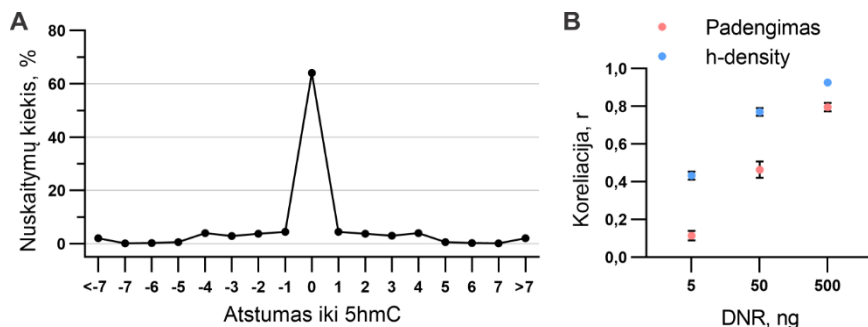


3.7 pav. Hidroksimetilintos bakteriofago λ DNR hmTOP-seq bibliotekų analizė. A) hmTOP-seq bibliotekų techninių pakartojimų 5hmC padengimų koreliacija. Kaip pavyzdys pateikti DNR, turinčios 2,5 % hidroksimetilintų GCGC sekų, bibliotekų duomenys. B) hmTOP-seq 5hmC padengimo priklausomybė nuo jų kiekio GCGC sekose λ DNR. Duomenims buvo priskirtas kvadratinės regresijos modelis. C) λ DNR, turinčios 2,5 % 5hmC, hmTOP-seq nuskaitymų pasiskirstymas pagal jų pradžios atstumą nuo GCGC sekos.

3.1.3. hmTOP-seq metodo įvertinimas pelės embrioninių kamieninių ląstelių viso genomo 5hmC analizėje

Po sėkmingo hmTOP-seq validavimo su modeline λ DNR, toliau metodą norėjome įvertinti sudėtingesnėje žinduolių ląstelių viso genomo 5hmC analizėje. Tam buvo pasirinkta 2,6 Gb dydžio pelės embrioninių kamieninių ląstelių (ESC) gDNR dėl pakankamai didelio literatūrinių duomenų kiekio apie 5hmC pasiskirstymą šių ląstelių genome, gautų kitais metodais, kuriuos

norėjome palyginti su hmTOP-seq duomenimis. Buvo paruoštos ir nuskaitytos pelės ESC hmTOP-seq tikslinės ir kontrolinės (be BGT katalizuojamo 5hmC žymėjimo (3.6 pav., 1 etapo)) bibliotekos, naudojant 5 ng, 50 ng arba 500 ng gDNR, kiekvienos po du techninius pakartojimus (žr. 2.2.6. ir P1 lentelę prieduose). hmTOP-seq metodu identifikavome ~4,8 mln. (500 ng pradinio DNR kiekio bibliotekose, vidutiniškai 5,7x padengimu), 2,0 mln. (50 ng bibliotekose, vidutiniškai 7,0x padengimu) ir 0,26 mln. (5 ng bibliotekose, vidutiniškai 13,7x padengimu) 5hmCG sekų. Sekoskaitos rezultatai parodė, kad 64 % nuskaitymų prasidėjo tiksliai nuo CG sekos ir iš viso net 93 % nuskaitymų prasidėjo labai nedideliu, iki 4 nt, atstumu nuo jos (žr. 3.8 A pav.), kas dar kartą patvirtino labai didelę hmTOP-seq metodo skiriamąją gebą.

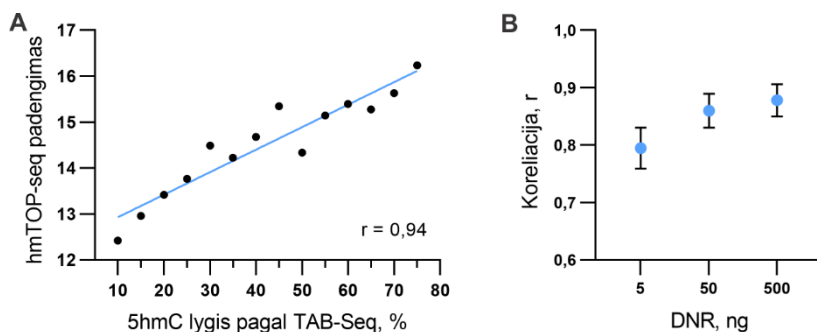


3.8 pav. Pelės ESC gDNR hmTOP-seq bibliotekų analizė. A) hmTOP-seq 500 ng bibliotekų nuskaitymų pasiskirstymas pagal jų pradžios atstumą nuo hidroksimetilintų CG sekų. B) Pelės ESC skirtingų gDNR kiekių hmTOP-seq bibliotekų techninių pakartojimų 5hmCG padengimo ir h-density vidutinės koreliacijos, paskaičiuotos kiekvienai chromosomai.

Analizuojant skirtingo pradinio DNR kiekio bibliotekas pasimatė tendencija, kad su didesniu pradiniu kiekiu techniniai pakartojimai koreliuoja geriau nei su mažu: 500 ng, 50 ng ir 5 ng gDNR bibliotekų replikų koreliacijos koeficientas pagal CG taikinių padengimus atitinkamai buvo 0,80, 0,46 ir 0,11. Tai rodo, kad su mažu gDNR kiekiu didėja hmTOP-seq duomenų variabilumas, analizuojant atskirus CG taikinius, tačiau duomenys yra patikimi, nes, palyginimui, kontrolinių bibliotekų koreliacijos koeficientas buvo tik 0,03. Visų tikslinių mėginių koreliacijos padidėjo paskaičiavus normalizuoto 5hmC tankio įvertį, pavadintą h-density – padengimą, normalizuotą pagal 5hmCG lygį 180 bp regionuose ir CG sekų skaičių (žr. 3.8 B pav.), remiantis anksčiau sukurto uTOP-seq metodo parametrais (Staševskij et al., 2017). h-density sumažina variabilumą tarp techninių replikų mėginių dėl bibliotekų dydžių skirtumų bei variabilaus CG sekų pasiskirstymo genome

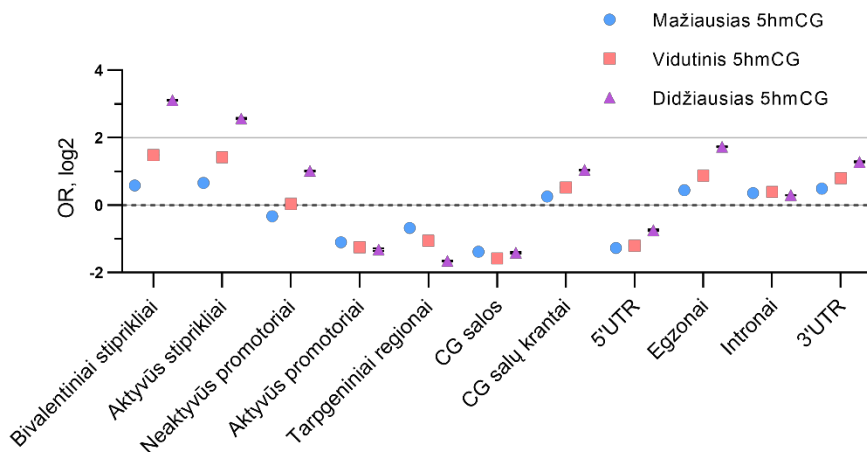
ir gali būti patikimai taikomas regioninių 5hmC kiekių pokyčių stebėjimui, ypač kai analizei yra prieinami tik nedideli DNR kiekiai.

Toliau norėdami įvertinti hmTOP-seq metodo patikimumą, lyginome mūsų gautus pelės ESC gDNR 5hmC duomenis su jau esamais publikuotais rezultatais, gautais kitais metodais. Pirmiausiai palyginimą atlikome su bisulfitinės konversijos sekoskaitos varianto TAB-Seq, gebančio 5hmC nustatyti kiekybiškai vieno nukleotido tikslumu (žr. 1.1.4.2. skyrelį), duomenimis. TAB-Seq metodu buvo aptiktos 1,9 mln. 5hmCG (Yu et al., 2012), iš kurių 50 % CG buvo nustatyti mūsų 500 ng hmTOP-seq bibliotekose. Sutampančių CG analizė parodė, kad hmTOP-seq duomenys labai gerai koreliuoja ($r = 0,94$) su TAB-Seq – didėjant CG sekų hidroksimetilinimo lygiui, nustatytam pagal TAB-Seq, buvo stebimas didėjantis jų hmTOP-seq padengimas (žr. 3.9 A pav.). Taip pat pelės ESC hmTOP-seq sekoskaitos duomenis palyginome su nano-hmC-Seal, hmC-Seal giminingu (žr. 1.1.4.5. skyrelį), DNR fragmentų praturtinimu paremtu mažos skiriamosios gebos metodu (Han et al., 2016). 3.9 B pav. galima matyti, kad visų trijų skirtingų gDNR kiekių hmTOP-seq bibliotekų 5hmC duomenys pakankamai gerai koreliuoja su nano-hmC-Seal signalu. Visa tai įrodo, kad hmTOP-seq metodas yra jautrus bei selektyvus 5hmC ir gali būti pritaikytas patikimai žinduolių ląstelių DNR 5hmC analizei.



3.9 pav. Pelės ESC hmTOP-seq bibliotekų 5hmC duomenų palyginimai su rezultatais, gautais kitais metodais. A) Koreliacija tarp hmTOP-seq 500 ng bibliotekų CG sekų vidutinio padengimo ir TAB-Seq nustatyto hidroksimetilinimo lygio, suskirstyto intervalais. Grafikui panaudoti 97 % tarp metodų sutampančių identifikuotų CG sekų. B) 5hmC signalo koreliacija, paskaičiuota kiekvienai chromosomai, tarp pelės ESC skirtingų gDNR kiekių hmTOP-seq ir nano-hmC-Seal bibliotekų duomenų (vidutinis DNR regiono dydis – 615 bp).

Toliau analizavome 5hmCG genominių pasiskirstymą pelės ESC DNR pagal 500 ng hmTOP-seq bibliotekų duomenis. Siekiant atskleisti subtilius 5hmC išsidėstymo skirtumus, buvo pasirinktos trys 5hmCG duomenų grupės, sudarytos iš 20 % mažiausio, 20 % vidutinio ir 20 % didžiausio padengimo CG sekų, ir įvertintas jų praturtinimas įvairiuose genomo elementuose (žr. 3.10 pav.). 5hmCG buvo praturtintos bivalentiniuose ir aktyviuose stiprikluose, kuriems atitinkamai būdingos H3K4me1 ir H3K4me1 + H3K27ac modifikacijos, baltymus koduojančių genų egzonuose, intronuose ir 3' netransliuojamuose regionuose (UTR), CG salų krantuose. Kita vertus, stebėtas 5hmC trūkumas promotoriuose, išskyrus stipriausiai hidroksimetilintas CG sekas, kurios buvo praturtintos neaktyviuose promotoriuose (neturinčiuose H3K9ac modifikacijos). Taip pat 5hmC trūkumas nustatytas CG salose, baltymus koduojančių genų 5'UTR ir tarpgeniniuose regionuose.

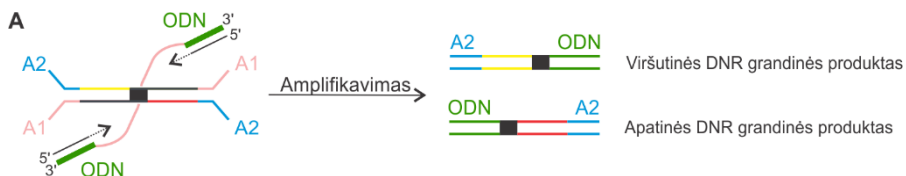


3.10 pav. 5hmCG praturtinimas įvairiuose pelės ESC genominiuose elementuose. Grafike pavaizduotos 20 % mažiausio, 20 % vidutinio ir 20 % didžiausio padengimo 5hmCG duomenų grupės. Promotoriai – 2 kb ilgio regionai, esantys prieš geno transkripcijos pradžios vietas. OR – odds ratio, visų praturtinimų Fišerio testo verčių $p < 0,05$.

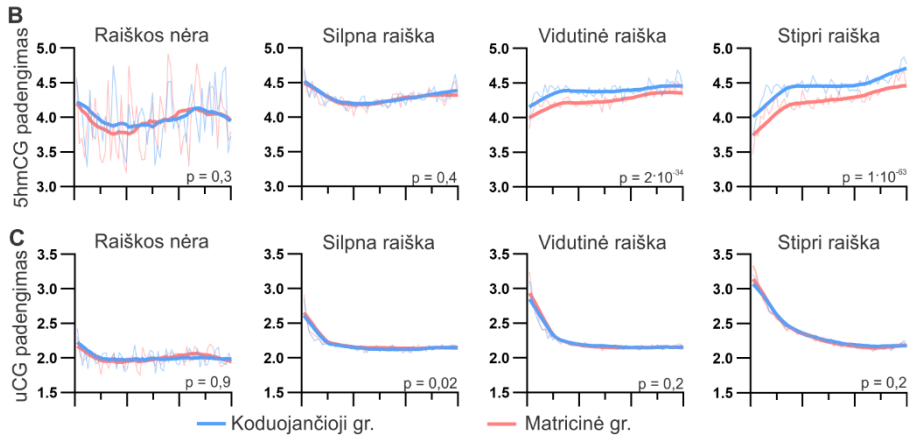
Kadangi hmTOP-seq metode 5hmC žymėjimui naudojama BGT neturi jokio DNR sekos specifiškumo (Josse ir Kornberg, 1962), tai mums leido analizuoti hidroksimetilinimą ne tik CG, bet ir kitokiose (CH, kur H – A, T arba C bazė) pozicijose. Visose kontrolinėse hmTOP-seq bibliotekose bendrai buvo nustatytos 55 025 5hmCH sekos. Iš jų tik 190 buvo surastos bent dviejose nespecifinio signalo kontrolinėse bibliotekose ir tik 284 atsikartojo ir 500 ng tiklinėse bibliotekose, kas rodo, kad tai atsitiktinės foninės sekos,

susidarančios dėl visų metodikų bibliotekose kartais pasitaikančio atsitiktinio pradmenų prisijungimo ir jų pratęsimo, todėl jos buvo pašalintos ir tolimesnėje analizėje nenaudojamos. Tuo tarpu 500 ng pradinio DNR kiekio tikslinėse bibliotekose buvo identifikuotos 76 665 5hmCH pozicijos (vidutiniškai 2,7x padengimu), kurios buvo atsikartojančios abiejose techninėse replikose, su pakankamai aukšta padengimų koreliacija ($r = 0,76$). Įdomu tai, kad daugiausia šių sekų buvo CA kontekste – CA:CT:CC sekos pasiskirstė santykiu 0,50:0,33:0,17, ir net 53 % visų 5hmCH buvo identifikuota baltymus koduojančiuose genuose.

Labai svarbu pabrėžti, kad hmTOP-seq metodas suteikia galimybę analizuoti individualių DNR grandinių hidrosimetilinimą. Prisiminkime, kad pažymėjus 5hmC azido grupe ir prie jos prijungus oligodeoksiribonukleotidą, pastarasis yra panaudojamas naujos DNR grandinės sintezei tiksliai nuo žymėto 5hmC (žr. 3.6 pav., 5 etapas). Simetriškos CG sekos gali būti hidrosimetilintos abiejose DNR grandinėse, todėl žymėjimas ir DNR sintezė, inicijuojama nuo prijungto ODN, gali vykti taip pat abiejose grandinėse. Kadangi DNR sintetinama 5' → 3' kryptimi nuo žymėto 5hmC, tai lemia dviejų skirtingų DNR fragmentų susidarymą nuo hidrosimetilintų viršutinės ir apatinės DNR grandinių (žr. 3.11 A pav.). Todėl atlikus sekoskaitą galima nustatyti, kurioje to paties CG lokuso DNR grandinėje buvo 5hmC. Nagrinėdami pelės ESC hmTOP-seq bibliotekų duomenis pamatėme, kad 5hmCG yra nevienodai pasiskirstę baltymus koduojančių genų kūnų DNR grandinėse – koduojančiosios grandinės turėjo tendenciją būti stipriau hidrosimetilintos nei matricinės DNR grandinės. Taip pat šis netolygumas priklausė nuo genų raiškos lygio ir didžiausias 5hmCG padengimų skirtumas tarp DNR grandinių stebėtas stipriausios raiškos genuose (žr. 3.11 B pav.). Tačiau įdomu tai, kad pelės ESC uTOP-seq bibliotekų (paruošė Z. Staševskij) duomenyse nematėme nemodifikuotų CG (uCG) sekų netolygaus, nuo genų raiškos intensyvumo priklausomo pasiskirstymo tarp individualių DNR grandinių baltymus koduojančiuose genuose (žr. 3.11 C pav.).

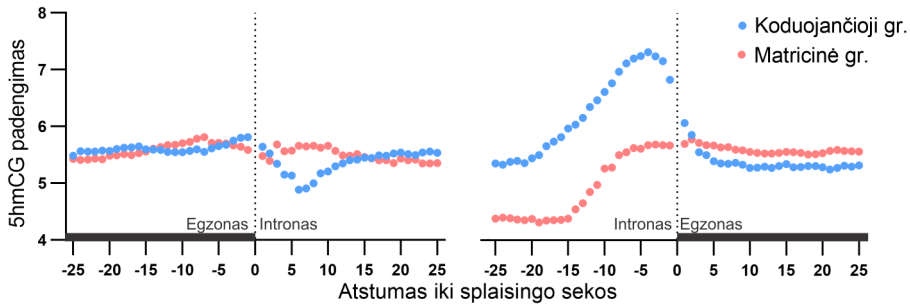


3.11 pav. Individualioms DNR grandinėms specifinio 5hmC analizė. A) Schema, vaizduojanti po DNR sintezės, inicijuotos nuo konjuguoto ODN, ir amplifikavimo susidarančius du skirtingus DNR fragmentus nuo hidrosimetilinto CG taikinio viršutinės ir apatinės DNR grandinių.



3.11 pav. (tęsinys) B) 5hmCG padengimų pasiskirstymas pelės ESC baltymus koduojančių genų, padalintų į 60 lygių regionų, DNR grandinėse (pagal hmTOP-seq 500 ng bibliotekų duomenis). Genai suskirstyti į 4 grupes pagal raiškos lygį: nereiškami – 169, silpnos raiškos – 2710, vidutinės raiškos – 3598, stiprios raiškos – 3300 genų. C) uCG padengimų pasiskirstymas pelės ESC baltymus koduojančių genų DNR grandinėse. Genai suskirstyti į 4 grupes pagal raiškos lygį: nereiškami – 340, silpnos raiškos – 3514, vidutinės raiškos – 4604, stiprios raiškos – 4833 genų. Grafikuose nurodytos Stjudento t-testo p vertės, analizuojant CG sekų modifikavimo skirtumus tarp koduojančiosios ir matricinės DNR grandinių.

Galiausiai analizuodami pelės ESC hmTOP-seq bibliotekų duomenis pamatėme, kad 5hmCG buvo netolygiai pasiskirstęs baltymus koduojančiuose genuose aplink RNR splaisingo sritis. Tyrime buvo naudoti vidiniai genų egzoni, turintys 5hmCG modifikacijas abiejose splaisingo srities pusėse iki 25 nt atstumu nuo jos. 500 ng bibliotekų duomenyse pastebėjome bendrą tendenciją, kad 5' splaisingo srityje (egzono-introno sankirtoje) abiejose DNR grandinėse egzoninė dalis buvo stipriau hidroksimetilinta nei introninė dalis (žr. 3.12 pav.). Tuo tarpu 3' splaisingo srityje (introno-egzono sankirtoje) stebėjome individualių DNR grandinių 5hmC skirtumą: koduojančioji grandinė buvo stipriau hidroksimetilinta introninėje dalyje, o matricinė grandinė – egzoninėje dalyje. Detalesnėje 5hmCG profilių analizėje pasimatė 5' splaisingo srities koduojančiosios DNR grandinės 5hmC kiekio padidėjimas -2, -1 pozicijose ir nuosmukis ties 4-8 pozicijomis bei matricinės DNR grandinės 5hmC padidėjimai -7 ir 3 pozicijose. 3' splaisingo srityje išsiskyrė koduojančiosios DNR grandinės 5hmC kiekio padidėjimas -4 pozicijoje (žr. 3.12 pav.). Toks 5hmC tyrimas splaisingo srityse dar kartą pademonstravo itin didelę hmTOP-seq skiriamąją gebą.



3.12 pav. 5hmCG padengimo pasiskirstymas po 25 nt abipus splaisingo sekos (pagal hmTOP-seq 500 ng bibliotekų duomenis). Pateikti duomenys iš 10 560 5' splaisingo sričių ir 6 169 3' splaisingo sričių. Buvo stebėti patikimi 5hmCG skirtumai tarp egzoninės ir introninės dalies pagal Stjudento t-testą ($p < 0,01$).

Taigi, pirmoje darbo rezultatų dalyje parodėme, kad hmTOP-seq yra specifiskas 5hmC analizės metodas, pasižymintis sekoskaitos ekonomišku dėl 5hmC žymėjimo nulemtu tik informatyvių DNR sekų nuskaitymu. Šiuo metodu galima dideliu atsikartojamumu sudaryti pelės embrioninių kamieninių ląstelių didelės skyros 5hmC genolapius CG ir CH sekose bei stebėti subtilius genomo reguliacinių elementų ir net individualių DNR grandinių hidroksimetilinimo skirtumus.

3.2. TOP-seq metodų taikymas epigenetiniams skirtingų neuroblastomos tipų ląstelių identiteto tyrimuose

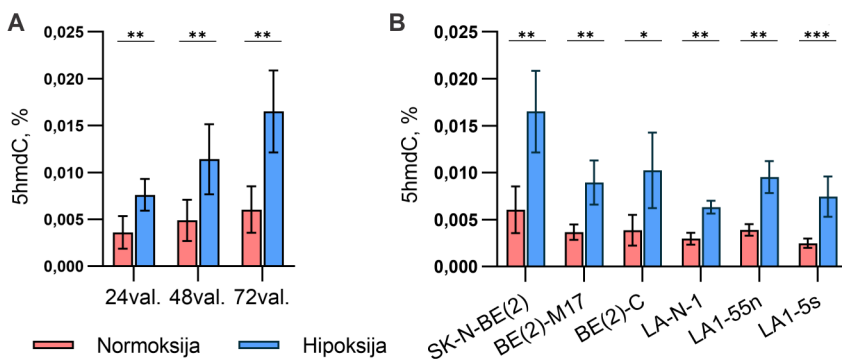
Panaudodami savo sukurtą hmTOP-seq metodą norėjome paanalizuoti, kaip hipoksijos metu NB ląstelių genome pakinta 5hmC žymių pasiskirstymas ir kokia galėtų būti to biologinė reikšmė. Taip pat siekiant geriau suprasti kaip DNR modifikacijos nulemia skirtingų NB ląstelių tipų savybes ir jų genų raišką bei globalią epigenomo struktūrą, atlikome ne tik 5hmC, bet ir uCG (uTOP-seq metodu) analizę skirtinguose NB ląstelių tipuose.

3.2.1. NB ląstelių 5hmC analizė

Norėdami, kad mūsų tyrimai apimtų žinomus neuroblastomos ląstelių tipus, tyrimuose naudojome šešias NB ląstelių linijas: dvi motinines, išskirtas iš pacientų SK-N-BE(2) ir LA-N-1, bei iš jų išvestas po dvi dukterines sublinijas, atitinkamai: BE(2)-C (I-tipas) ir BE(2)-M17 (N-tipas); LA1-55n (N-tipas) ir LA1-5s (S-tipas).

Siekdami įvertinti globalų 5hmC kiekį mūsų tiriamose NB ląstelėse normoksijos ir hipoksijos sąlygomis, pirmiausiai SK-N-BE(2) ląsteles auginome esant įprastam O_2 lygiui arba 1 % O_2 (esant vadinamajai patologinei

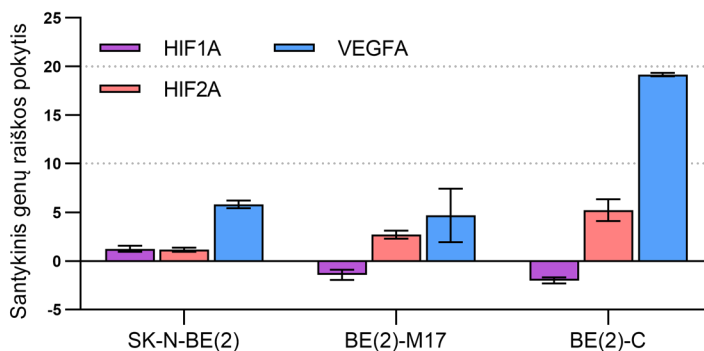
hipoksijai (McKeown, 2014)) 24, 48 arba 72 val. (žr. 2.2.8.). Atlikta NB ląstelių DNR didelio našumo skysčių chromatografijos-tandeminės masių spektrometrijos (HPLC-MS/MS) analizė (žr. 2.2.10.) parodė, kad 5hmC daugėja hipoksijos atveju (žr. 3.13 A pav.). Kadangi stipriausias hipoksijos efektas buvo matomas SK-N-BE(2) ląsteles paauginus 72 val., todėl toliau tokiomis sąlygomis kultivavome visas turimas NB ląstelių linijas. HPLC-MS/MS duomenys parodė, kad normoksijoje NB ląstelių DNR buvo vidutiniškai 0,002-0,006 %, o hipoksijoje – ~0,006-0,017 % 5hmC nuo visų C (žr. 3.13 B pav.). Taigi, mes stebėjome 5hmC pagausėjimą visose tirtose hipoksinėse ląstelėse: SK-N-BE(2) ląstelių DNR 5hmC padaugėjo 2,7 karto, BE(2)-M17 – 2,4, BE(2)-C – 2,6, LA-N-1 – 2,1, LA1-5s – 3,0, LA1-55n – 2,4 karto.



3.13 pav. Globalaus 5hmC kiekio pokyčiai hipoksinėse NB ląstelėse. A) 5hmC kiekiai SK-N-BE(2) ląstelėse, auginuose normoksijos ir hipoksijos sąlygomis 24, 48 ir 72 val. B) 5hmC kiekiai visose tiriamosiose NB ląstelėse, auginuose normoksijos ir hipoksijos sąlygomis 72 val. 5hmC vertintas HPLC-MS/MS pagal G kiekį, kuris atitinka suminį visų modifikavimo būsenų C kiekį. Grafikuose virš stulpelių pateiktos Stjudento t-testo p vertės (* – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$), $n = 4$.

Norėdami įrodyti, kad NB 5hmC pokyčiai stebimi dėl hipoksinų ląstelių auginimo sąlygų, patikrinome gerai žinomų hipoksijos atsako genų – *HIF1A*, *EPAS1* (*HIF2A*), *VEGFA* – raišką. HIF1 ir HIF2 (angl. hypoxia-inducible factor) yra transkripcijos veiksniai, lemiantys ląstelinį atsaką į pakitusią deguonies koncentraciją ir reguliuojantys įvairių genų, pavyzdžiui, kraujagyslių endotelio augimo veiksnio A (*VEGFA*), raišką (Wigerup et al., 2016). SK-N-BE(2), BE(2)-C ir BE(2)-M17 ląstelės buvo auginamos normoksijos ir hipoksijos sąlygomis 72 val., tuomet išskirta jų visuminė RNR, susintetinta kDNR ir atlikta jos kiekybinė PGR analizė (žr. 2.2.13-15.). Iš visų analizuotų genų didžiausias raiškos padidėjimas tirtose NB ląstelėse stebėtas

VEGFA atveju – 4,7-19,2 kartų (žr. 3.14 pav.). *HIF2A* iRNR kiekis hipoksijoje padidėjo 1,2-5,2 kartus lyginant su normoksija, o *HIF1A* iRNR kiekis nežymiai padidėjo (1,3 karto SK-N-BE(2) ląstelėse) arba sumažėjo 1,3-2,0 kartus (BE(2)-C ir BE(2)-M17 ląstelėse) (žr. 3.14 pav.). Tai gerai sutinka su literatūriniais duomenimis, kad ilgos (72 val.) hipoksijos atveju transkripcijos lygmenyje NB ląstelėse *HIF1A* pokyčiai beveik nestebimi, o *HIF2A* stebima indukcija (Jögi et al., 2004; Holmquist-Mengelbier et al., 2006). Įdomu tai, kad *HIF2A*, kuris yra siejamas su NB progresavimu ir prasta pacientų klinicine prognoze (Holmquist-Mengelbier et al., 2006), stipriausiai buvo indukuotas I-tipo BE(2)-C ląstelėse. Tiesa, yra duomenų, rodančių *HIF2A* raiškos sąsajas su mažos rizikos NB (Westerlund et al., 2019), ir tokius kontraversiškus rezultatus galėtų lemti ląstelinis NB heterogeniškumas (Huertas-Castaño et al., 2020).



3.14 pav. Hipoksijos atsako genų – *HIF1A*, *HIF2A* ir *VEGFA* – raiškos pokytis NB ląstelėse, augintose 72 val. hipoksijos sąlygomis, lyginant su augintomis normoksijos sąlygomis (n = 2).

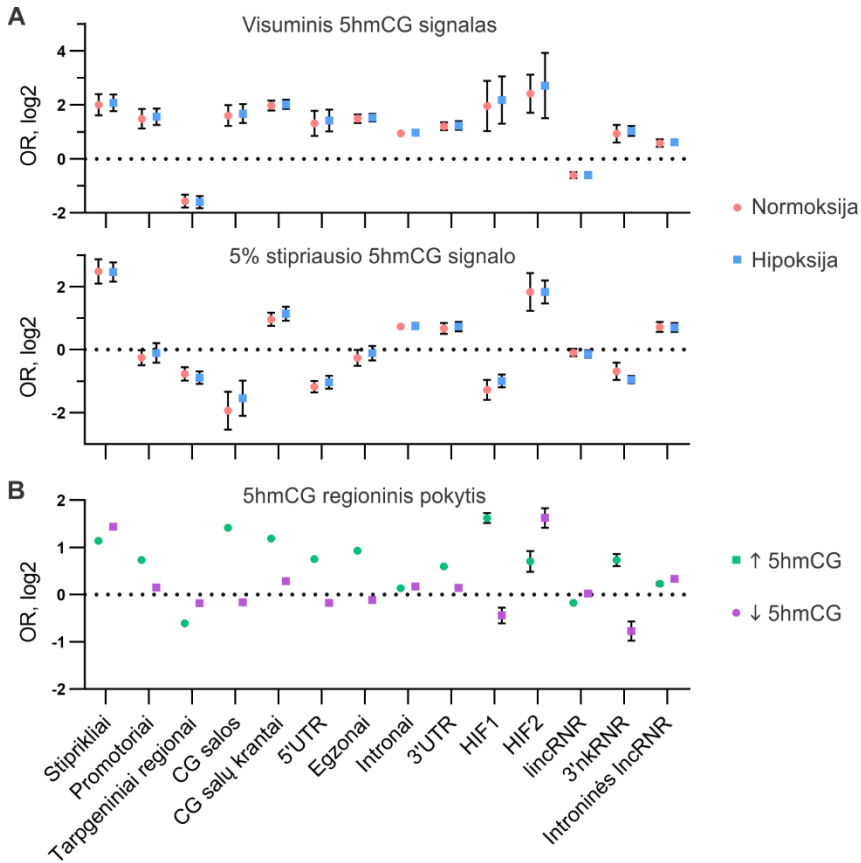
Toliau paruošėme visų turimų NB ląstelių, augintų 72 val. normoksijos ir hipoksijos sąlygomis, hmTOP-seq bibliotekas po du techninius pakartojimus ir atlikome jų sekoskaitą (žr. 2.2.11.; P2 lentelę prieduose). Didžioji dalis (86,6 %) hmTOP-seq nuskaitytų sekų prasidėjo 0-3 nt atstumu nuo CG pozicijų ir tai mums leido sudaryti didelės skiriamosios gebos 5hmCG genolapius. Kiekvienų NB ląstelių bibliotekų replikos labai gerai koreliavo tarpusavyje CG lygyje (vidutinis $r = 0,88$) ir jų genomuose identifikavome vidutiniškai po 1,67 mln. hidroksimetilintų CG sekų ($\geq 5x$ padengimu). Vis tik siekiant dar labiau sumažinti duomenų variabilumą, buvo paskaičiuotas h-density, kuris padidino koreliacijas tarp hmTOP-seq techninių pakartojimų iki $\sim 0,95$ ir todėl buvo naudotas tolesniuose tyrimuose. Taip pat matėme tendenciją, kad hipoksinėse ląstelėse padidėjo identifikuotų 5hmCG skaičius

(žr. 3.1 lentelę), o tai sutinka su nustatytu 5hmC pagausėjimu HPLC-MS/MS tyrimuose (3.13 pav.).

3.1 lentelė. NB ląstelių hmTOP-seq bibliotekose identifikuotų 5hmCG sekų skaičius (su padengimu $\geq 1x$).

Ląstelių linija	Identifikuotų 5hmCG skaičius, mln.	
	Normoksija	Hipoksija
SK-N-BE(2)	4,1	4,3
BE(2)-M17	3,8	4,7
BE(2)-C	3,4	3,8
LA-N-1	2,2	2,8
LA1-55n	2,4	3,1
LA1-5s	2,5	3,0

Sudaryti 5hmCG genolapiai leido nustatyti šios DNR modifikacijos pasiskirstymą NB ląstelių genomuose. Buvo analizuojamas visuminis h-density signalas arba 5% stipriausio signalo CG sekų tiriant jo pasiskirstymą genomo elementuose (žr. 3.15 A pav.). Stipriausiai hidroksimetilintos CG sekos buvo praturtintos stiprikliuose, CG salų krantuose, baltymus koduojančių genų intronuose ir 3'UTR. Taip pat stiprus 5hmCG signalas stebėtas HIF2 jungimosi sekose ir ilgų nekoduojančių RNR genuose, kurie išsidėsto baltymus koduojančių genų intronuose genų kryptimi (tokios RNR angl. vadinamos sense intronic lncRNA). Norėdami genominiuose elementuose įvertinti 5hmC kitimą, vykstantį hipoksijos sąlygomis, analizavome h-density pokyčius, suskirsčius genomą į 1 kb ilgio DNR regionus (žr. 3.15 B pav.). Hipoksijoje DNR regionai, kuriuose padaugėjo 5hmC, labiausiai buvo praturtinti CG salose ir jų krantuose, baltymus koduojančių genų egzonuose ir 3'ncRNR (nekoduojančių RNR, persidengiančių su baltymų genų 3'UTR) genuose. Įdomu tai, kad stiprikliuose buvo stipriai praturtinti abiejų tipų regionai: tokie, kuriuose 5hmCG sumažėjo, ir tie, kuriuose 5hmCG padaugėjo, kas galimai rodo labai aktyvią 5hmC dinamiką hipoksijos atveju. Lyginant HIF1 ir HIF2 prisijungimo sritis matėme, kad būtent HIF1 regionuose buvo stipresnis 5hmC pagausėjimas hipoksijoje, kaip tai buvo parodyta anksčiau (Mariani et al., 2014), o HIF2 prisijungimo srityse buvo praturtinti abiejų tipų regionai, kuriuose buvo stebimas 5hmC sumažėjimas arba pagausėjimas.

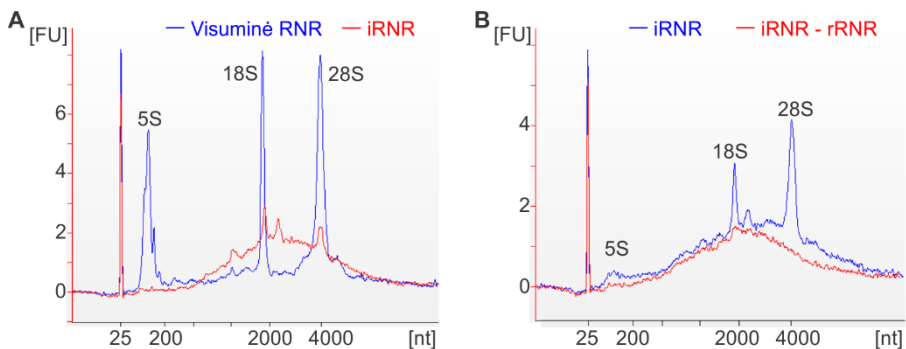


3.15 pav. Genominis 5hmCG pasiskirstymas NB ląstelių gDNR. A) Visuminio arba 5 % stipriausio 5hmCG signalo (h-density) praturtinimas įvairiuose genominiuose elementuose, NB ląsteles auginant normoksijos arba hipoksijos sąlygomis. B) 1 kb ilgio DNR regionų, kuriuose buvo stebimas 5hmCG h-density pokytis hipoksijoje, praturtinimas įvairiuose genominiuose elementuose. Visur vaizduojamas vidutinis visų tiriamųjų NB ląstelių 5hmC signalas. HIF1/2 – hipoksijos atsako elementai, lincRNR – ilgų intergeninių nekoduojančiųjų RNR genai. OR – odds ratio, visų praturtinimų Fišerio testo verčių $p < 0,05$.

3.2.2. Hipoksiniai NB ląstelių genų 5hmCG ir raiškos pokyčiai

Siekiant geriau atskleisti epigenetinę 5hmC funkciją ir jo reikšmę genų raiškos reguliacijai, atlikome NB ląstelių, augintų normoksijos ir hipoksijos sąlygomis, RNR sekoskaitą. Didelis dėmesys buvo skiriamas aukštos kokybės visuminės RNR išskyrimui iš NB ląstelių, informacinės RNR (iRNR) gryninimo ir ribosominės RNR (rRNR) pašalinimo optimizavimui. Pirmiausiai įsitikinome, kad bibliotekų ruošimui būtų naudojama tik

nedegradavusi visuminė RNR, kurios RIN (angl. RNA integrity number) vertės ≥ 9 (pagal „Agilent Bioanalyzer“). Tuomet iš visuminės RNR buvo gryninama iRNR. Kadangi RNR elektroforetinė analizė parodė, kad iRNR išgryninama su rRNR priemaišomis (žr. 3.16 A pav.), buvo atliktas papildomas rRNR šalinimo žingsnis, leidžiantis gauti žymiai grynesnę iRNR (žr. 3.16 B pav.). Panaudojant tokią keliais etapais grynintą iRNR buvo paruoštos 4 dukterinių NB ląstelių linijų: BE(2)-C, BE(2)-M17, LA1-55n ir LA1-5s, augintų 72 val. normoksijos ir hipoksijos sąlygomis, RNR sekoskaitos bibliotekos (žr. 2.2.16.).



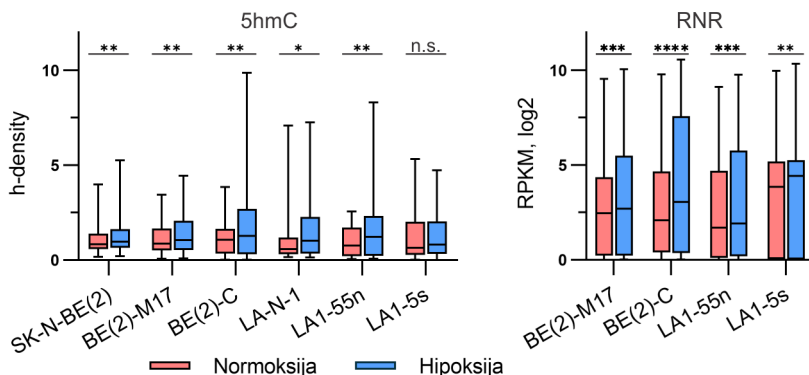
3.16 pav. NB ląstelių RNR elektroforetinė analizė „Agilent Bioanalyzer“ sistema. A) Visuminės RNR (mėlyna) ir iš jos išgrynintos iRNR (raudona) profiliai. B) iRNR prieš (mėlyna) ir po (raudona) rRNR pašalinimo profiliai. Paveiksluose pažymėtos tikėtinos 5S (kartu ir 5,8S), 18S ir 28S rRNR. FU – fluorescencijos vienetai, 25 nt fragmentas – RNR ilgio standartas.

Hipoksinius genų CG hidroksimetilinimo (h-density) ir raiškos pokyčius pirmiausiai parodėme analizuodami gerai žinomus 30 hipoksijos atsako genų, tarp kurių yra *VEGFA*, glikolizės fermentų genai *ENO1* (enolazė 1), *PGK1* (fosfoglicerato kinazė 1) ir kt. (Schofield ir Ratcliffe, 2004). 3.17 pav. matyti, kad daugumai šių genų buvo būdingas statistiškai reikšmingas h-density ir raiškos padidėjimas hipoksijoje visose tirtose NB ląstelėse (išskyrus LA1-5s, h-density atveju). Tai įrodo galimą 5hmC epigenetinę sąsają su genų raiškos reguliacija.

Norėdami detaliau paanalizuoti NB ląstelių hipoksinius pokyčius, išskyrėme tris genų grupes:

- genai, kuriuose hipoksijos sąlygomis padaugėjo 5hmCG (up-DHG, angl. differentially hydroxymethylated genes) arba sumažėjo (down-DHG),
- genai su hipoksijoje sustiprėjusia arba susilpnėjusia raiška, atitinkamai up-DEG (angl. differentially expressed genes) ir down-DEG,

- genai, kuriuose stebimas hipoksinis 5hmCG ir raiškos padidėjimas (up-DEHG, angl. differentially expressed and hydroxymethylated genes) arba sumažėjimas (down-DEHG).

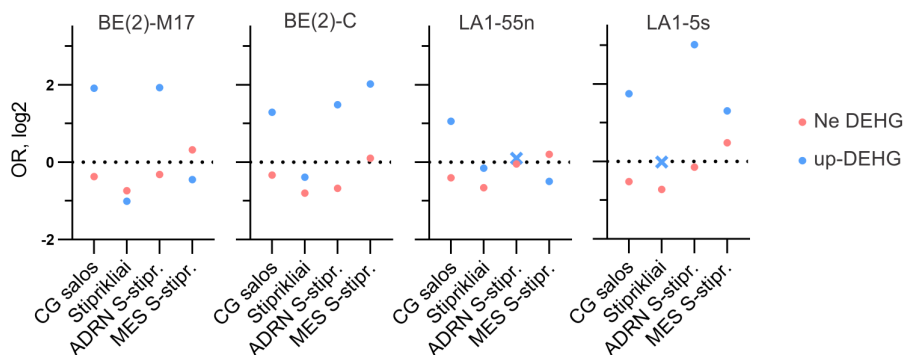


3.17 pav. 30 hipoksijos atsako genų 5hmC (h-density) ir raiškos lygiai NB ląstelėse, auginuose normoksijos ir hipoksijos sąlygomis. Skirtumai vertinti Stjudento t-testu (n.s. – nepatikimas skirtumas ($p > 0,05$), * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$, **** – $p \leq 0,0001$).

Su visais šiais genais buvo atlikta funkcinė genų praturtinimo GO (angl. gene ontology) analizė. Visų grupių genai, kuriems buvo būdingas 5hmC ar/ir raiškos sumažėjimas hipoksijoje (down-DHG/DEG/DEHG), reikšmingiausiai buvo praturtinti procesuose, susijusiuose su DNR pažaidų taisymu, ląstelės ciklu ir DNR replikacija (žr. P2 pav. prieduose), todėl galimai šie procesai yra susilpnėję hipoksijos sąlygomis. Įdomu tai, kad Up-DHG genai buvo praturtinti vystymosi, ląstelių ir neuronų diferenciacijos procesuose, o up-DEG siejosi pagrindė tik su bazinėmis (angl. housekeeping) ir metabolizmo funkcijomis: baltymų pernaša, iRNR transkripcija, glikolizė, atsaku į hipoksiją. Tuo tarpu up-DEHG grupės genams buvo būdingas tarsi up-DHG ir up-DEG apimantis praturtinimas diferenciacijos ir vystymosi bei atsaku į hipoksiją ir glikolizės procesuose (žr. P2 pav. prieduose). Be to, būtent DEHG grupės genuose buvo stebėtas didžiausias 5hmCG signalo ir raiškos lygio pokytis, todėl tolimesnėse analizėse dažniausiai naudojome DEHG kaip informatyviausius genus. Svarbu pabrėžti, kad up-DEHG ir up-DHG praturtinimą stebėjome tokiuose GO genų rinkiniuose kaip „neigiama vystymosi proceso reguliacija“ ar „neigiama neuronų/ląstelių diferenciacijos reguliacija“. Tai susisieja su hipoksijoje slopinama NB ląstelių diferenciacija (Bhaskara et al., 2012).

Baltymus koduojančių genų 3' netransliuojamuose regionuose stebėjome stipriausio 5hmCG signalo praturtinimą (žr. 3.15 A pav.), todėl norėjome

patikrinti, ar tai galėtų būti susiję su genomo reguliaciniais elementais. Buvo analizuotas hipoksinų up-DEHG 3'UTR persidengimas su CG salomis, NB specifiniais stiprikliais, ADRN ir MES tipams specifiniais super-stiprikliais (van Groningen et al., 2017). Įdomu tai, kad tik BE(2)-C (I-tipo) ir LA1-5s (S-tipo) ląstelėse stebėtas persidengimas su MES tipo super-stiprikliais (žr. 3.18 pav.), nors visų tipų ląstelėse buvo persidengimas su ADRN super-stiprikliais, kas galimai rodo tam tikrus identiteto panašumus tarp I- ir S-tipo ląstelių. Taip pat svarbu, kad visose mūsų tirtose NB ląstelėse buvo stebėtas up-DEHG 3'UTR praturtinimas CG salose (žr. 3.18 pav.), o pastarosiose fiksavome stiprų 5hmC pagausėjimą hipoksijoje (žr. 3.15 B pav.), kas galimai rodo, kad 3'UTR esančioms CG saloms būdinga specifinė reguliacinė funkcija hipoksijoje. Atlikus visų ląstelių up-DHG ir up-DEHG genų, su kuriais persidengiančiose 3'UTR CG salose hipoksijos sąlygomis taip pat stebėtas 5hmCG pagausėjimas, GO analizę, buvo nustatytas genų praturtinimas WNT signalinio kelio, transkripcijos bei vystymosi ir neurogenezės reguliacijos procesuose (žr. P3 pav. prieduose). Visa tai rodo hipoksinius 5hmCG pokyčius reguliaciniuose genomo elementuose ir galimą jų įtaką vystymosi genų raiškai. Visų NB tipų ląstelėms buvo būdingas 5hmCG padidėjimas reguliacinių baltymų p75, ASCL2, SOCS1 ir WNT signalinio kelio genuose (*FZD2*, *LRP5*, *WNT1/4*), kurie yra svarbūs įvairių (tame tarpe ir neuroninių) kamieninių ląstelių proliferacijai ir palaikymui bei yra atsakingi už kamieninių ląstelių diferenciacijos slopinimą (Schuijers et al., 2015; Becker ir Wilting, 2019; Nemajerova ir Moll, 2019; Zhang et al., 2022). Tai galimai rodo hipoksijos sąlygomis vykstančią NB ląstelių dediferenciaciją ir kamieniškumo padidėjimą, siejamą su agresyvesniu NB vėžio fenotipu (Huertas-Castaño et al., 2020).

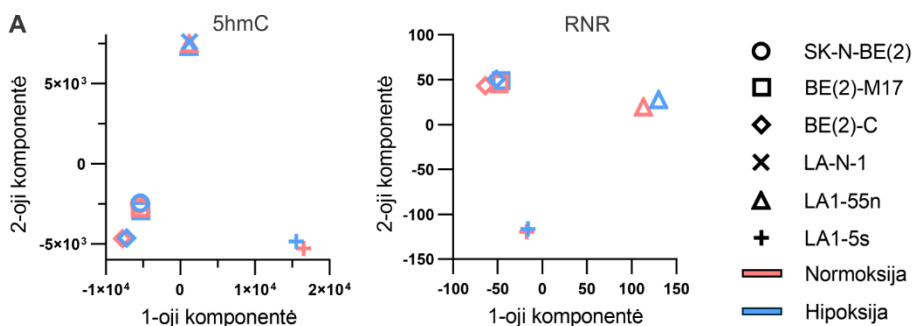


3.18 pav. NB ląstelių hipoksinų up-DEHG ir genų, kuriuose nebuvo stebėti pokyčiai – ne DEHG, 3'UTR praturtinimas reguliaciniuose genomo

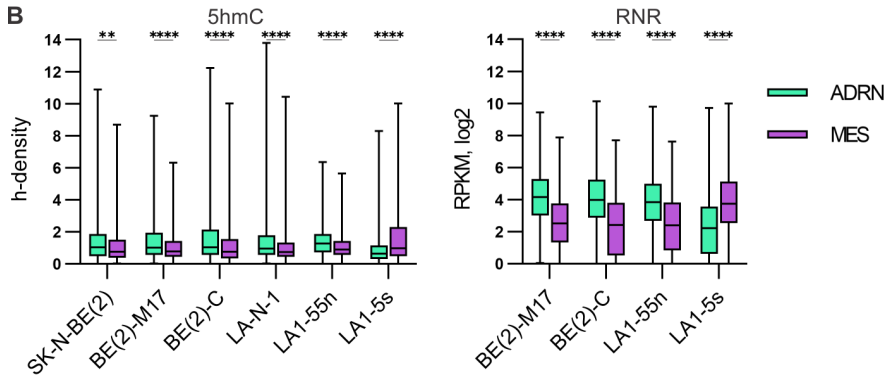
elementuose. S-stipr. – super-stiprikliai. OR – odds ratio, kryželiu pažymėti nepatikimi praturtinimai, kai $p \geq 0,05$.

3.2.3. NB tarpląstelinių skirtumų analizė

Pradiniam NB tarpląstelinių skirtumų įvertinimui, iš NB ląstelių 5hmC ir RNR sekoskaitos bibliotekų duomenų buvo atlikta principinių komponentių analizė (PKA). Pamatėme, kad abu duomenų rinkiniai atskleidė panašias tendencijas – BE(2)-C ir, ypač, LA1-5s ląstelės atsiskyrė tiek nuo motininių, tiek nuo kitų giminingų sublinijų ląstelių nepriklausomai nuo auginimo sąlygų (žr. 3.19 A pav.). BE(2)-C (I-tipo) ir BE(2)-M17 (N-tipo) ląstelės nestipriai atsiskyrė vienos nuo kitų PKA ir šį jų dalinį panašumą galima paaiškinti tuo, kad abi ląstelių linijas priskyrėme adrenerginiam ląstelių tipui pagal didesnę genų raišką ir jų 5hmC signalą van Groningen ir kitų tyrėjų (van Groningen et al., 2017) sudarytame ADRN genų rinkinyje nei MES rinkinyje (žr. 3.19 B pav.). PKA buvo stebimas didelis LA1-5s ir LA1-55n ląstelių atsiskyrimas galimai dėl to, kad šios ląstelės yra stipriai morfologiškai skirtingos ir priskiriamos skirtingiems S- ir N- tipams. Be to, pagal didesnę 5hmC signalą ir genų raišką MES genų rinkinyje LA1-5s mes priskyrėme mezenchiminiam tipui, o LA1-55n – ADRN tipui (žr. 3.19 B pav.). Tuo tarpu motininės SK-N-BE(2) ir LA-N-1 ląstelės PKA užėmė panašią poziciją kaip iš jų išvestos dukterinės N-tipo sublinijos galimai dėl to, kad NB augliai paprastai būna sudaryti daugiausiai iš N-tipo ląstelių (Ross et al., 1995; Walton et al., 2004).



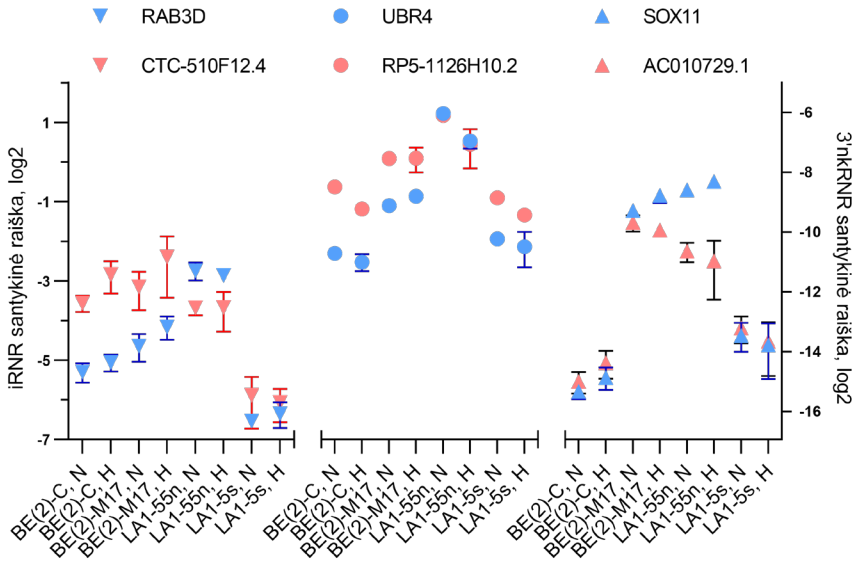
3.19 pav. NB tarpląstelinių skirtumų analizė. A) NB ląstelių principinių komponentių analizė pagal 5hmC signalą (h-density) arba genų raišką, normoksijos ir hipoksijos sąlygomis.



3.19 pav. (tęsinys) B) ADRN ir MES tipams būdingų genų 5hmC signalo ir jų raiškos įvertinimas tiriamosiose NB ląstelėse normoksijos sąlygomis. Grafike pateiktos Stjudento t-testo p vertės (** – $p \leq 0,01$, **** – $p \leq 0,0001$).

Baltymų genų 3'UTR svarba potranskripcinėje iRNR reguliacijoje žinoma jau seniai, o naujausi tyrimai rodo šio regiono reikšmę ir DNR lygmenyje – 3'UTR metilinimas susietas su genų raiška (McGuire et al., 2019). Taip pat mes NB ląstelių baltymus koduojančių genų 3' netransliuojamuose regionuose stebėjome stipriausio 5hmCG signalo praturtinimą (žr. 3.15 A pav.) ir parodėme galimas 3'UTR sąsajas su genomo reguliaciniais elementais (žr. 3.18 pav.). Be to, su baltymų genų 3'UTR persidengia nekoduojančiųjų RNR, 3'нкRNR, genai, kurie NB ląstelėse išsiskyrė iš kitų нкRNR pagal reikšmingiausią 5hmCG padidėjimą hipoksijos sąlygomis (žr. 3.15 B pav.). Todėl norėjome šias нкRNR paanalizuoti detaliau. Iš 21 anotuoto 3'нкRNR geno, RNR sekoskaitos duomenyse aptikome septynių raišką: *RP11-571M6.8*, *AC012442.5*, *AC064852.4*, *CTC-510F12.4*, *AC010729.1*, *AC092620.2* ir *RP5-1126H10.2*. Tolimesnei tikro laiko PGR analizei pasirinkome tris stipriausiai reiškiamus 3'нкRNR genus, kurie rodė galimą specifiskumą ląstelių tipui, *AC010729.1*, *RP5-1126H10.2*, *CTC-510F12.4*, bei su jais persidengiančius baltymus koduojančius genus, kurių raišką galimai reguliuoja, atitinkamai *SOX11*, *UBR4* ir *RAB3D*. 3.20 pav. matyti, kad stipresne *CTC-510F12.4* ir *RAB3D* raiška pasižymėjo visos ADRN ląstelės, lyginant su MES LA1-5s ląstelėmis. Tuo tarpu didesniu *RP5-1126H10.2* ir *UBR4* bei *AC010729.1* ir *SOX11* RNR kiekiu išsiskyrė abi N-tipo ląstelės, o BE(2)-C ir LA1-5s ląstelėms buvo būdingas mažesnis, tarpusavyje panašus jų raiškos lygis. Tai galimai atspindi I- ir S-tipo ląstelių genų raiškos panašumus. Svarbu paminėti, kad prie *SOX11* (*AC010729.1*) 274 kb atstumu buvo rastas ADRN super-stipriklis, kas galėtų nurodyti jo vaidmenį savitos genų raiškos reguliacijoje. Apibendrinant, ši analizė atskleidė NB ląstelių tipams būdingą

specifinę 3'нкRNR ir su jais persidengiančių baltymus koduojančių genų raišką.



3.20 pav. 3'нкRNR (*CTC-510F12.4*, *RP5-1126H10.2*, *AC010729.1*) ir persidengiančio baltymo (RAB3D, UBR4, SOX11) geno iRNR santykinė raiška NB ląstelėse, augintose 72 val. normoksijos (N) arba hipoksijos (H) sąlygomis, n = 2.

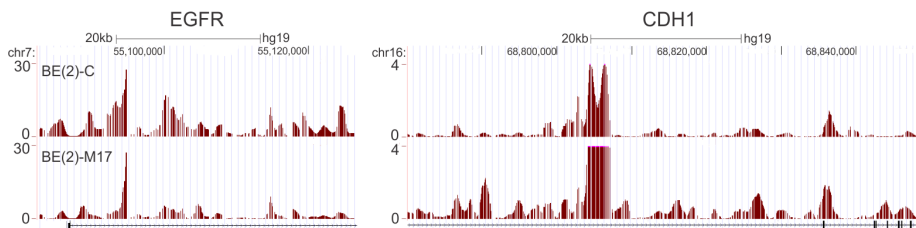
Siekiant geriau suprasti tarpląstelinius NB skirtumus, buvo sudaryti ląstelėms specifinių genų, kuriuose stebėtas skirtingas hidroksimetilinimas (DHG) arba skirtingas 5hmCG ir raiškos lygis (DEHG), sąrašai ir su jais atlikta GO bei „Hallmark“ genų rinkinių (iš „MSigDB“ duomenų bazės) praturtinimo analizė. Palyginimai buvo atlikti tarp visų apjungtų potencialiai panašių ADRN (BE(2)-C + BE(2)-M17 + LA1-55n) ląstelių ir MES (LA1-5s) ląstelių genų; arba poriniai palyginimai tarp MES (LA1-5s) ir atskirai kiekvienos iš ADRN ląstelių genų. Visuose palyginimuose ADRN ląstelių genų praturtinimas vyravo nervų sistemos vystymosi, neuronų diferenciacijos ir sinapsių procesuose (žr. P4 pav. prieduose). Tuo tarpu S-tipo LA1-5s specifiniai genai buvo susiję su epiteline-mezenchimine tranzicija (EMT), ląstelių judrumu ir adhezija. Taip pat šių ląstelių genai buvo praturtinti įvairiuose signaliniuose keliuose, pavyzdžiui, NOTCH, KRAS, TNF α , NF- κ B, WNT (žr. P4 ir P5 pav. prieduose). Visa tai galimai nurodo į nervinės kėtos ląstelių, iš kurių yra kilusi NB (Johnsen et al., 2019), migraciją. Yra žinoma, kad TNF α , NF- κ B ir WNT signaliniai keliai yra svarbūs EMT reguliacijoje (Wu ir Zhou, 2010), kuri kartu su NOTCH aktyvinimu dalyvauja

nervinės keteros vystymesi ir jo metu vykstančioje ląstelių migracijoje (Mead ir Yutzey, 2012; Ji et al., 2019). O būtent S-tipo LA1-5s ląstelės buvo priskirtos prie MES, į nervinę keterą panašių ląstelių tipo (žr. 3.19 B pav.) (Boeva et al., 2017; van Groningen et al., 2017).

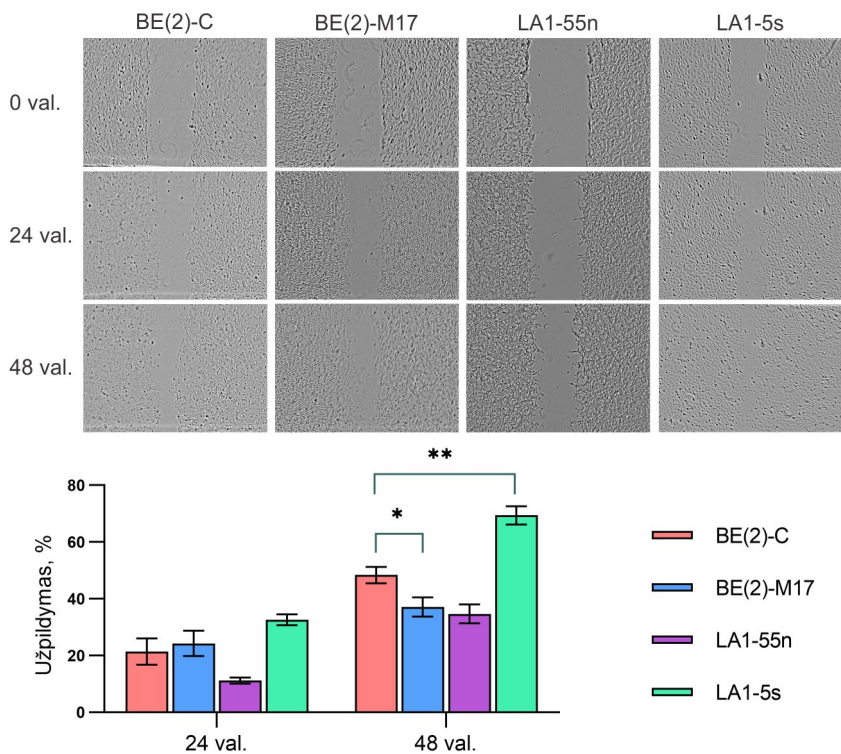
Taip pat pagal ląstelėms specifinius DHG ir DEHG norėjome palyginti iš to paties auglio išvestas, ADRN tipui priskirtas BE(2)-C (I-tipo) ir BE(2)-M17 (N-tipo) ląsteles. BE(2)-C specifiniai genai buvo praturtinti E2F (E2 transkripcijos veiksnių) taikinių, G2M ląstelės ciklo patikros taško ir mitotinės verpstės genų rinkiniuose (žr. P6 pav. prieduose), kas galimai siejasi su šių ląstelių aktyvesne proliferacija – BE(2)-C greičiausiai dalijosi iš visų mūsų turimų NB ląstelių linijų (pagal „ATCC“ duomenis ir mūsų pastebėjimus). Svarbu pažymėti, kad nors BE(2)-M17 genai buvo truputį stipriau praturtinti EMT rinkinyje, bet BE(2)-C I-tipo ląstelėms buvo būdingas didesnis 5hmC ir raiškos lygis EMT reguliacijoje svarbių onkogenų *EGFR* (epidermio augimo veiksnio receptoriaus) ir *SNAIL* (Snail šeimos transkripcijos slopiklio 1), o mažesnis vėžį slopinančio E-kadherino geno *CDHI* (žr. 3.21 pav.), galimai atspindintis didesnę šių ląstelių judrumą ir agresyvumą. EGFR ir EMT reguliatoriaus SNAIL lemiamas E-kadherino slopinimas yra žinomas kaip vienas iš svarbiausių vėžio invazyvumo bruožų (Wang et al., 2013b; Ramírez Moreno ir Bulgakova, 2022). Be to, BE(2)-C ląstelėse stebėtas mažesnis genų, pavyzdžiui, *ASCL1*, *BDNF*, *MYTIL*, dalyvaujančių neuroninių kamieninių ląstelių diferenciacijoje, hidroksimetilinimas. Taip pat šių ląstelių genai buvo praturtinti NOTCH, Hedgehog, PI3K/AKT/mTOR ir mTORC1 (mTOR komplekso 1) signaliniuose keliuose (žr. P6 pav. prieduose), svarbiuose vėžinių kamieninių ląstelių proliferacijoje (Atashzar et al., 2020). Tuo tarpu BE(2)-M17 ląstelių genai buvo stipriau praturtinti KRAS ir TNF α signaliniuose keliuose, kas galimai rodo skirtingą NB I- ir N-tipo ląstelių vėžiškumo reguliaciją. Apibendrinant, BE(2)-C ląstelių specifinių genų analizė patvirtino anksčiau aprašytą polinkį joms būti agresyvesnėmis ir turinčiomis vėžinių kamieninių ląstelių savybių (Ross et al., 2003; Walton et al., 2004).

Kadangi NB ląstelėms specifinių, skirtingo 5hmC ir raiškos lygio, genų analizėje pastebėjome jų sąsajas su ląstelių judrumo procesais, norėjome patikrinti ląstelių migracijos skirtumus, galinčius lemti ląstelių skirtingą piktybiškumą, žaizdos gijimo testu. Ląstelių monoslouksnyje buvo padarytas įbrėžimas, kurio užsitraukimas stebėtas po 24 ir 48 valandų (žr. 2.2.17.). Kaip matyti 3.22 pav., iš visų tirtų NB ląstelių judriausios buvo LA1-5s ir jos užpildė didžiausią įbrėžimo plotą, taip pat BE(2)-C ląstelės buvo judresnės už BE(2)-M17, o visa tai susisieja su aukščiau aprašytais ląstelėms specifinių

genų GO praturtinimo analizių rezultatais bei EMT procesui svarbių genų hidroksimetilinimo skirtumais.



3.21 pav. 5hmC h-density signalo profiliai *EGFR* ir *CDH1* genų regionuose BE(2)-C ir BE(2)-M17 ląstelėse normoksijoje (sudaryta su „UCSC Genome Browser“).

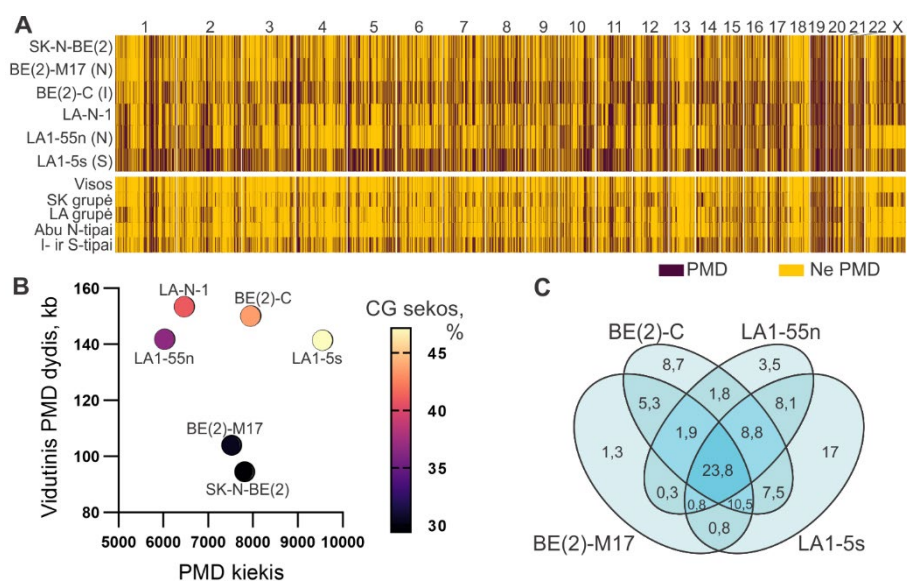


3.22 pav. NB ląstelių judrumo testavimas žaizdos gijimo testu. Ląstelių gebėjimo užpildyti padarytą žaizdą po 48 val. skirtumai buvo vertinti Stjudento t-testu, * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, $n = 3$.

3.2.4. Dalinai metilintų DNR regionų analizė NB ląstelėse

3.2.4.1. NB ląstelių skirtumai pagal dalinai metilintų regionų išsidėstymą jų genomuose

Žinduolių ląstelėms yra būdingi dideli, dalinai metilinti DNR domenai – PMD (angl. partially methylated domains) (žr. 1.1.3.6. ir 1.1.3.7. skyrelius). Tyrimai rodo, kad PMD metilinimo variacijos reikšmingai nulemia stebimą vėžinių ląstelių epigenetinį heterogeniškumą (Brinkman et al., 2019; Gull et al., 2022). Todėl, siekiant dar detaliau ištyrinėti epigenetinius NB ląstelių skirtumus, jose buvo analizuotas PMD išsidėstymas. Buvo paruoštos visų 6 turimų NB ląstelių, augintų normoksijos sąlygomis, uCG sekų uTOP-seq bibliotekos (žr. 2.2.12.; P2 lentelę prieduose), kurių sekoskaitos duomenys (2-3x uCG padengimu) leido sudaryti PMD genolapius (žr. 3.23 A pav.). PMD užėmė vidutiniškai iki 990 Mb visų NB ląstelių genomo ir padengė 30-47 % visų CG sekų. Daugiausiai ir didžiausio dydžio PMD identifikuota BE(2)-C ir LA-N-1 ląstelių grupėje (žr. 3.23 B pav.). Iš visų ląstelių labiausiai išsiskyrė BE(2)-C ir LA1-5s: jose dideli, ≥ 100 kb PMD sudarė apie 20 % tų ląstelių PMD (BE(2)-M17 ir LA1-55n – tik apie 6 %), taip pat jose buvo daugiausiai tarpusavyje persidengiančių PMD regionų – 7,5 % (žr. 3.23 A, C pav.).



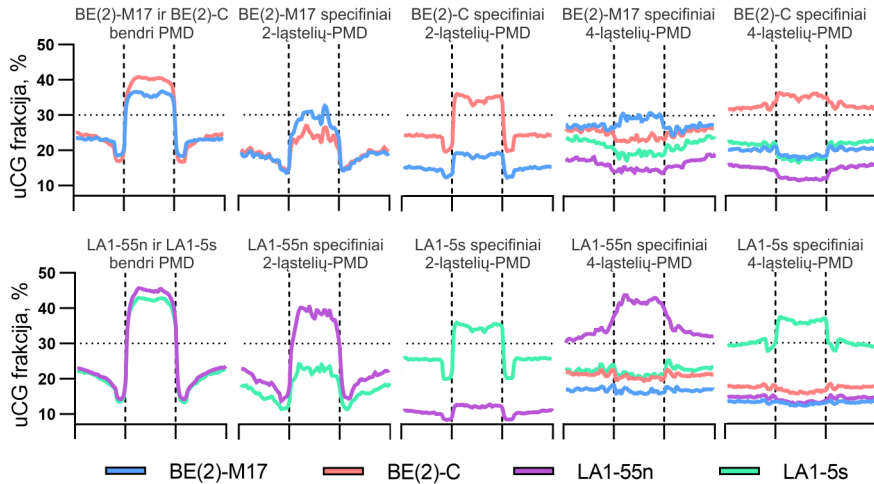
3.23 pav. PMD identifikavimas NB ląstelėse. A) PMD genolapiai, vaizduojantys regionus, būdingus atskiroms NB ląstelių linijoms arba persidengiančius tarp nurodytų ląstelių. Skaičiukai viršuje nurodo chromosomos numerį. SK grupę sudaro SK-N-BE(2), BE(2)-M17 ir BE(2)-C,

o LA grupę – LA-N-1, LA1-55n ir LA1-5s ląstelės. B) NB ląstelėse identifikuotų PMD kiekis, vidutinis jų dydis ir padengiamų CG sekų skaičius. C) NB ląstelėse persidengiančių 10 kb ilgio PMD regionų kiekis (išreikštas procentais).

Toliau buvo nustatyti ląstelėms specifiniai PMD, lyginant tarpusavyje po dvi vieno auglio kilmės dukterines ląstelių linijas (BE(2)-C su BE(2)-M17 ir LA1-55n su LA1-5s, vadinami 2-ląstelių-PMD) arba lyginant visas 4 dukterines ląsteles (vadinami 4-ląstelių-PMD). Kaip ir anksčiau, labiausiai išsiskyrė BE(2)-C ir LA1-5s ląstelės – jose buvo identifikuota daugiau unikalių PMD nei N-tipo (BE(2)-M17 ir LA1-55n) ląstelėse:

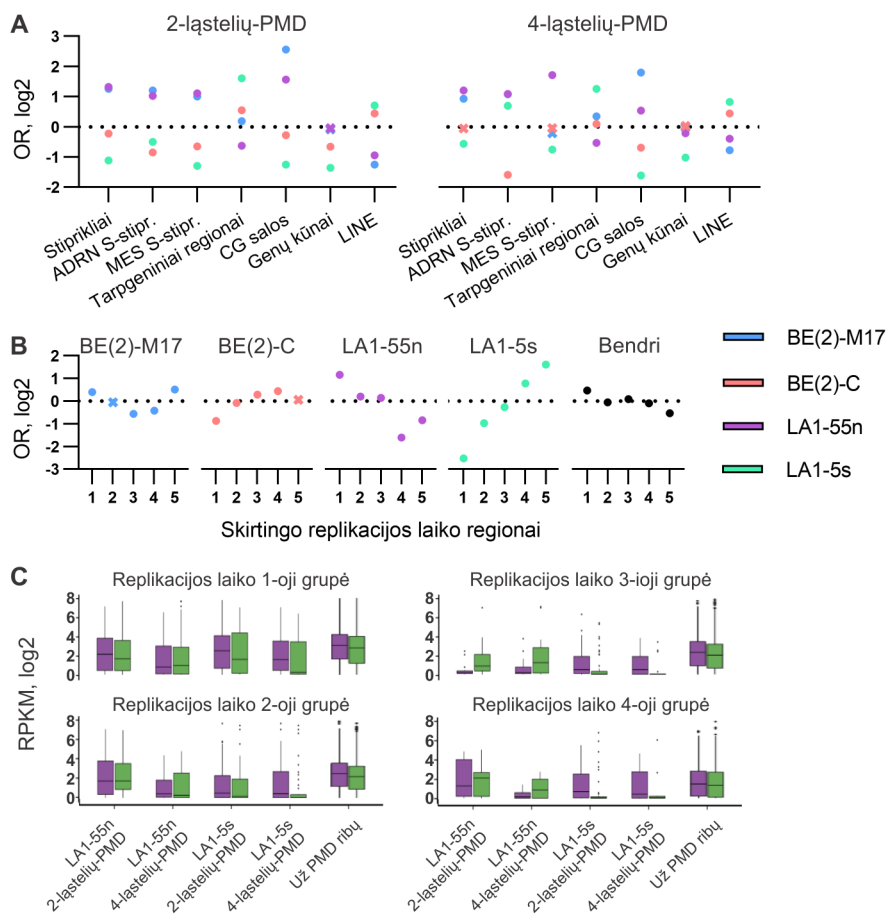
- 2-ląstelių-PMD: BE(2)-C – 2815, BE(2)-M17 – 443, LA1-5s – 4576, LA1-55n – 685;
- 4-ląstelių-PMD: BE(2)-C – 3568, BE(2)-M17 – 898, LA1-5s – 4673, LA1-55n – 1710.

Taip pat stebėjome skirtumus tarp ląstelėms specifinių ir bendrų PMD dydžių: BE(2)-C ir LA1-5s unikalių PMD vidutinis dydis buvo 74 kb, abiejų N-tipo ląstelių – 45 kb, o NB ląstelėms bendri PMD buvo didesni – vidutinis jų dydis buvo net 160 kb. Tiesa, PMD profiliuose matėsi tendencija, kad ląstelėms specifiniai PMD buvo ne taip aiškiai išreikšti kaip bendri PMD – unikaliuose PMD stebėtas mažesnis uCG frakcijos (identifikuotų uCG sekų kiekio, išreikšto procentais nuo visų regione esančių CG sekų) skirtumas nuo aplinkinių regionų, abipus PMD, nei ląstelėms bendrų PMD atveju (žr. 3.24 pav.).



3.24 pav. NB ląstelėms bendrų ir specifinių PMD uCG profiliai. Horizontali linija žymi uCG frakcijos 30 % ribą, naudotą PMD identifikavimui. Vertikalios linijos žymi PMD ribas, abipus kurių yra pavaizduoti 50 kb ilgio regionai. uCG profilių pavaizdavimui PMD ir regionai už jų buvo padalinti į 20 lygių dalių.

Svarbu paminėti, kad skirtumus tarp NB ląstelių matėme ne tik pagal PMD dydžius, bet ir atlikus tolesnes PMD išsidėstymo genome analizes. Ląstelėms specifiniams PMD buvo būdingas savitas pasiskirstymas genominiuose elementuose: nors visų ląstelių PMD buvo stebėtas genų kūnų trūkumas, CG salos ir stiprikliai buvo praturtinti N-tipo ląstelių (BE(2)-M17 ir LA1-55n) specifinių PMD regionuose, o tarpgeninės sritys ir LINE (angl. long interspersed nuclear elements) mobilieji genomo elementai – I- (BE(2)-C) ir S-tipo (LA1-5s) ląstelių PMD (žr. 3.25 A pav.). Be to, pastebėjome PMD sąsajas su genomo regionų replikacijos laiku. N-tipo ląstelių specifiniai PMD rodė praturtinimo tendenciją ankstyvosios replikacijos vietose, o BE(2)-C ir LA1-5s ląstelių – vėlyvosios (žr. 3.25 B pav.). Yra žinoma, kad ankstyvosios replikacijos regionų genams yra būdinga stipresnė raiška nei vėlyvosios (Donley ir Thayer, 2013), ir mūsų rezultatai parodė, kad genai, persidengiantys su ląstelėms specifiniais PMD, išvengė PMD slopinančiojo efekto ankstyvosios replikacijos regionuose (žr. 3.25 C pav.), nors bendra tendencija buvo tokia, kad genai, esantys PMD, pasižymėjo silpnesne raiška nei esantys už PMD ribų.

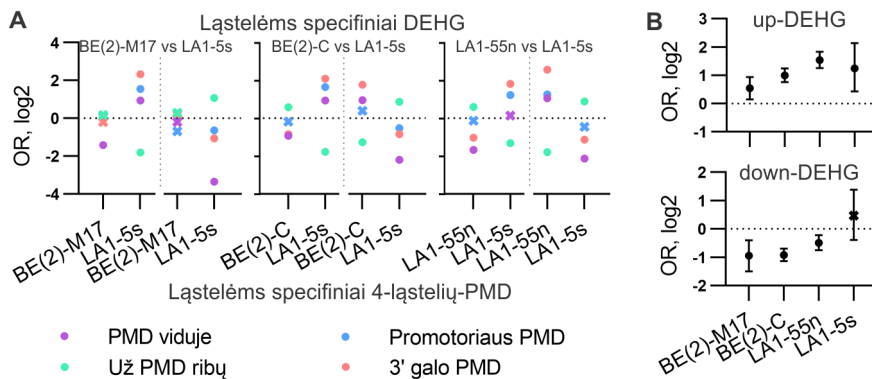


3.25 pav. Genominis PMD išsidėstymas NB ląstelėse. A) Įvairių genominių elementų praturtinimas NB ląstelėms specifiniuose PMD. S-stipr. – superstiprikliai. OR – odds ratio, kryželiu pažymėti nepatikimi praturtinimai, kai $p > 0,05$. B) NB ląstelėms specifinių 2-ląstelių-PMD ir visoms joms bendrų PMD praturtinimas skirtingo replikacijos laiko regionuose, suskirstytuose į 5 grupes (nuo ankstyvosios iki vėlyvosios replikacijos). C) LA1-55n ir LA1-5s ląstelių genų, esančių ląstelėms specifiniuose PMD, raiška, pagal priklausymą skirtingo replikacijos laiko regionams (nuo ankstyvosios iki vėlyvosios replikacijos). Replikacijos laiko 4-oji ir 5-oji grupės, naudotos B dalyje, buvo apjungtos į vieną bendrą grupę dėl mažo genų skaičiaus.

3.2.4.2. PMD reikšmė NB ląstelių genų reguliacijai

Norint geriau suprasti ląstelėms unikalių PMD reguliacines funkcijas, buvo patikrintas NB ląstelėms specifinių DEHG išsidėstymas jų atžvilgiu. Buvo nagrinėjamos skirtingos galimos genų padėtys: genai, esantys už PMD

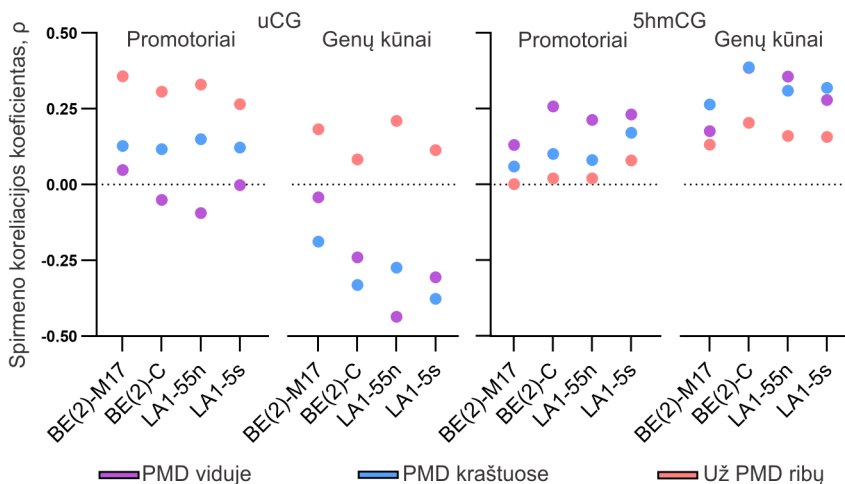
ribų, PMD viduje arba persidengiantys su PMD kraštais. Pastebėta, kad su PMD kraštais dažniausiai dengėsi promotorius ir iki 20 % geno 5' sekos arba 20-40 % geno 3' galo sekos. Todėl siekiant detalesnės analizės buvo išskirtos atitinkamai „promotoriaus PMD“ ir „3' galo PMD“ genų grupės. Rezultatai parodė, kad ląstelėms specifiniai DEHG buvo praturtinti už tų pačių ląstelių specifinių PMD ribų ir kitų ląstelių, su kuriomis yra atliekamas genų 5hmC ir raiškos palyginimas, specifinių PMD viduje arba jų kraštuose, ypač perdengiant genų 3' galus (žr. 3.26 A pav.). Pavyzdžiui, tarpusavyje lyginant LA1-55n ir LA1-5s ląsteles, LA1-55n unikalūs DEHG buvo praturtinti už LA1-55n būdingų 4-ląstelių-PMD ribų ir LA1-5s specifinių 4-ląstelių-PMD viduje. Tai galimai rodo PMD reikšmę ląstelių identiteto reguliacijoje. Įdomu tai, kad kitokie rezultatai gauti analizuojant hipoksinius DEHG – up-DEHG, bet ne down-DEHG, buvo praturtinti tų pačių ląstelių nustatytoose PMD (žr. 3.26 B pav.). Tai potencialiai reiškia, kad hipoksija aktyvina PMD reguliuojamus genus (darant prielaidą, kad ląstelių PMD nekinta hipoksijos sąlygomis).



3.26 pav. NB ląstelėms specifinių genų pasiskirstymas PMD atžvilgiu. A) Ląstelėms specifinių DEHG genų (surastų lyginant ląsteles poromis, nurodytomis grafiko viršuje) praturtinimas ląstelių specifiniuose 4-ląstelių-PMD (nurodytuose grafiko apačioje), atsižvelgiant, ar genas sutinkamas PMD viduje ar už jo ribų, ar su PMD kraštais dengiasi tik 5' ar 3' geno dalis. OR – odds ratio, kryželiu pažymėti nepatikimi praturtinimai, kai $p > 0,05$. (B) NB ląstelių hipoksinių up- ir down-DEHG praturtinimas tų pačių ląstelių nustatytoose PMD.

Siekiant patikrinti DNR modifikacijų įtaką genų raiškai pagal jų išsidėstymą PMD atžvilgiu, genai buvo suskirstyti į tris grupes: esantys PMD viduje, už PMD ribų arba persidengiantys su jų kraštais, ir įvertinta šių grupių genų raiškos koreliacija su DNR modifikavimu. Promotoriuose ir genų

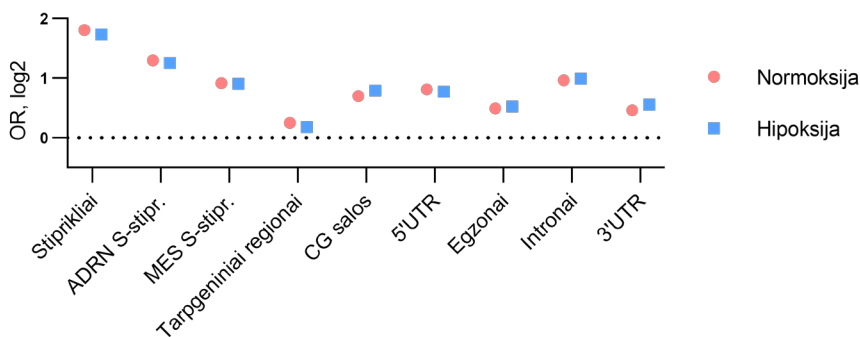
kūnuose 5hmCG stipriausiai koreliavo su raiška genų, esančių PMD viduje arba persidengiančių su jų kraštais (žr. 3.27 pav.), kas potencialiai rodo, kad genų hidroksimetilinimas nulemia PMD slopinimo išvengimą. Tuo tarpu promotorių uCG lygis labiausiai buvo susijęs su už PMD ribų esančių genų raiškos padidėjimu. O PMD viduje ar kraštuose esančių genų kūnų uCG atskleidė neigiamą koreliaciją su jų raiška (žr. 3.27 pav.). Visa tai galimai atskleidžia didelių epigenominių struktūrų sąsają su DNR modifikacijų lygio lemiamą genų raiškos reguliacija.



3.27 pav. DNR modifikacijų sąsaja su NB ląstelių genų, esančių skirtingose padėtyse PMD atžvilgiu, raiška. Koreliacija stebėta tarp uCG ar 5hmCG frakcijų ir genų raiškos.

3.2.5. 5hmCH sąryšis su PMD ir genų raiška

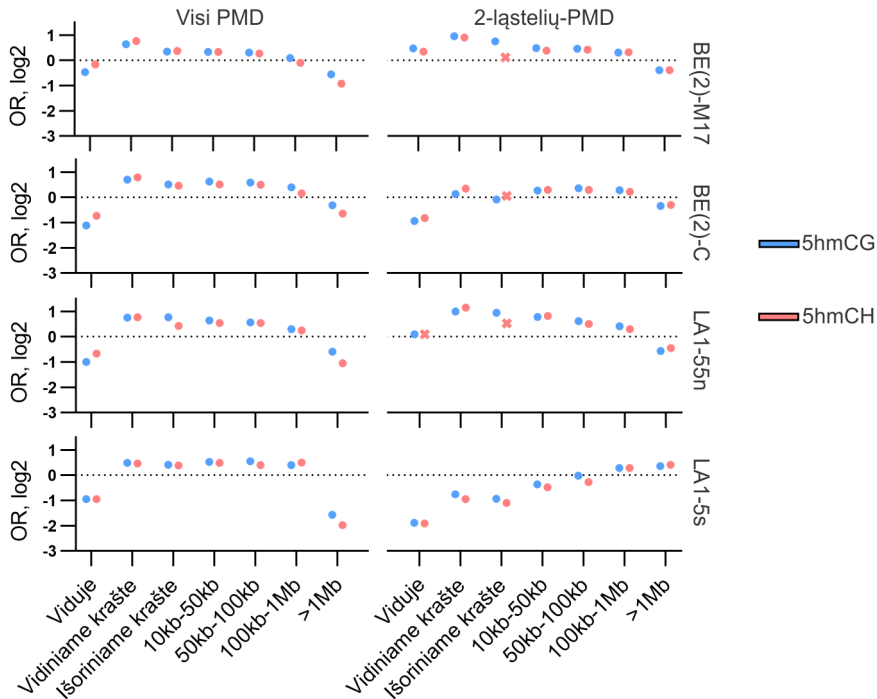
Kaip jau buvo aprašyta anksčiau (žr. 3.1.3. skyrelį), hmTOP-seq metodu mes galime analizuoti ne tik 5hmCG, bet ir 5hmCH sekas. NB ląstelėse identifikavome iki 30 000 hidroksimetilintų CH sekų su pakankamai aukšta koreliacija ($r = 0,85$) tarp techninių hmTOP-seq bibliotekų pakartojimų (vidutiniui 3,4x 5hmCH padengimu). Iš visų galimų CH pozicijų daugiausiai buvo aptikta hidroksimetilintų CA sekų. Įdomu tai, kad 5hmCH sekos labiausiai buvo praturtintos baltymus koduojančių genų intronuose ir stipriklių regionuose (žr. 3.28 pav.).



3.28 pav. 5hmCH sekų praturtinimas įvairiuose genominiuose elementuose, NB ląsteles auginant normoksijos arba hipoksijos sąlygomis. S-stipr. – super-stiprikliai. OR – odds ratio, visų praturtinimų Fišerio testo verčių $p < 0,05$.

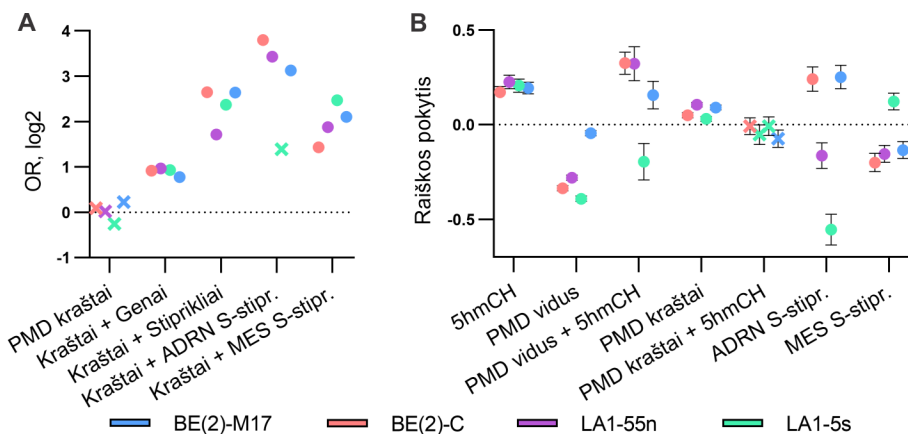
Toliau norėjome patyrinėti galimas 5hmCH reguliacines funkcijas. Pirmiausiai visose NB ląstelėse pastebėjome 5hmCG ir 5hmCH trūkumą PMD viduje ir praturtinimą jų kraštuose, kuris nyko tolstant nuo PMD (žr. 3.29 pav.). Tačiau analizuojant ne visus PMD, o tik NB ląstelėms unikalius (2-ląstelių-PMD), atsiskleidė ląstelių tipui specifinės tendencijos. N-tipo BE(2)-M17 ir LA1-55n ląstelėse 5hmC buvo praturtintas unikaliuose PMD ir jų kraštuose, tačiau ne regionuose esančiuose toli nuo PMD (žr. 3.29 pav.). Priešingai buvo LA1-5s S-tipe – ląstelėms specifiniuose PMD stebėtas 5hmC trūkumas, o jo praturtinimas atsirado tik nutolus > 100 kb nuo PMD. I-tipo BE(2)-C ląstelėse buvo matomos tarsi tarpinės 5hmC praturtinimo tendencijos tarp N- ir S-tipams būdingo praturtinimo (žr. 3.29 pav.). 5hmC yra aktyvinanti žymė ir jos praturtinimas N-tipo BE(2)-M17 ir LA1-55n ląstelių unikaliuose PMD, kuriuose taip pat buvo stebėtas stipriklių praturtinimas (žr. 3.25 A pav.), galimai rodo vykstantį aktyvų reguliacinių regionų DNR demetilinimą, nulemiantį ląstelėms specifinių genų raišką.

Svarbu paminėti, kad 5hmCH buvo praturtinti PMD kraštuose, kurie persidengia su genais, stiprikliais ir super-stiprikliais (žr. 3.30 A pav.). Čia taip pat buvo stebėtas ląstelių tipo specifiškumas: visose ADRN tipo ląstelėse 5hmCH praturtinimas PMD kraštuose, persidengiančiuose su ADRN super-stiprikliais, buvo patikimesnis nei LA1-5s ląstelėse, o pastarosiose buvo stipresnis 5hmCH praturtinimas PMD kraštuose, persidengiančiuose su MES super-stiprikliais (žr. 3.30 A pav.).



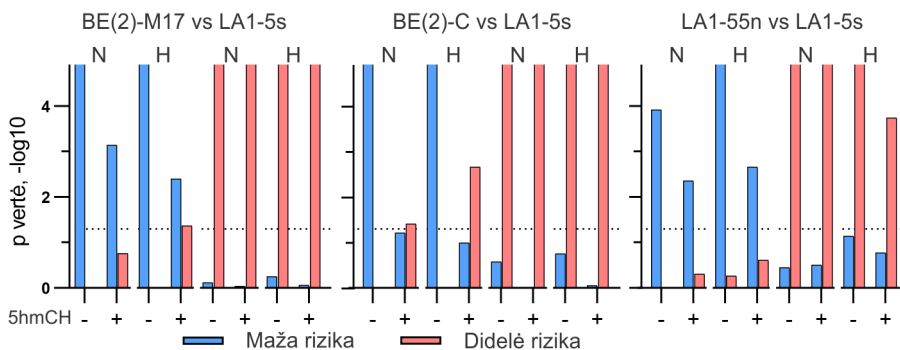
3.29 pav. 5hmCG ir 5hmCH praturtinimas visų identifikuotų NB ląstelių PMD arba specifinių 2-ląstelių-PMD atžvilgiu. Vidinis ir išorinis PMD kraštai buvo apibrėžiami kaip 3 kb regionai abipus PMD ribos. OR – odds ratio, kryželiu pažymėti nepatikimi praturtinimai, kai $p > 0,05$.

Kadangi 5hmCH buvo praturtintas baltymus koduojančiuose genuose (3.28 pav.), toliau buvo tikrinama, kaip 5hmCH siejasi su NB ląstelių genų raiška. Sudarytas statistinis modelis atskleidė, kad genai, kuriuose yra 5hmCH, pasižymėjo stipresne raiška nei genai be hidroksimetilintų CH sekų (žr. 3.30 B pav.). PMD viduje esantys genai buvo mažiau aktyvūs už esančius už PMD ribų, bet CH sekų hidroksimetilinimas aktyvino PMD viduje esančius genus ADRN ląstelėse – buvo stebėtas teigiamas raiškos pokytis. Iš šis aktyvinimo efektas, t. y. raiškos pokytis, buvo panašaus stiprumo kaip veikiant stiprikliais – N- (BE(2)-M17) ir I-tipo (BE(2)-C) ląstelių genų raiškos padidėjimas, reguliuojamas ADRN super-stiprikliais ar S-tipo (LA1-5s) – MES super-stiprikliais (žr. 3.30 B pav.).



3.30 pav. 5hmCH pasiskirstymas PMD srityse ir jo įtaka genų raiškai. A) NB ląstelių 5hmCH praturtinimas paprastuose PMD kraštuose ir persidengiančiuose su baltymus koduojančiais genais, stiprikliais ir superstiprikliais (S-stipr.). OR – odds ratio, kryželiu pažymėti nepatikimi praturtinimai, kai $p > 0,05$. B) NB ląstelių genų raiškos pokytis, nulemtas 5hmCH, PMD ir jų kombinacijų bei superstipriklių.

Galiausiai buvo patikrinta, ar galimas DNR 5hmCH sąryšis su NB pacientų klinikiniu vėžio rizikingumu. Todėl mūsų tiriamoms NB ląstelėms, auginoms normoksijos ir hipoksijos sąlygomis, specifinius DEHG padalinome į dvi grupes pagal 5hmCH signalą juose (buvo praturtinti 5hmCH juose arba ne) ir įvertinome jų persidengimą su publikuotais žemos ir aukštos rizikos NB navikų DEHG, gautais RNR sekoskaitos ir mažos skiriamosios gebos 5hmC analizės nano-hmC-Seal metodais (Applebaum et al., 2019). Abiejų N-tipų ląstelių (BE(2)-M17 ir LA1-55n) visos specifinių DEHG grupės patikimai persidengė tik su mažos NB rizikos genais (žr. 3.31 pav.). Mūsų nuostabai visuose palyginimuose auglio neformuojančioms LA1-5s ląstelėms unikalūs DEHG persidengė su didelės NB rizikos genais. Tuo tarpu 5hmCH įtaka atsiskleidė analizuojant BE(2)-C genus: normoksijoje ($p = 0,04$) ir ypač hipoksijoje ($p = 0,002$) I-tipo DEHG, turintys 5hmCH, patikimai persidengė su aukštos NB rizikos genais, o abiejų auginimo sąlygų DEHG, neturintys hidroksimetilintų CH sekų – su žemos rizikos (žr. 3.31 pav.). Pažymėtina, kad hipoksijos sąlygomis BE(2)-C tipo ląstelėse 5hmCH stebėtas *DOTIL* gene, kuris skatina NB proliferaciją (Wong et al., 2017), kolagenų (*COL5A1*, *COL13A1*, *COL23A1*), citoskeleto baltymų (*MYH9*, *PLEC*), TGFβ ir SHH (angl. Sonic Hedgehog) signalinių kelių baltymų (*TGFB1*, *GLI2*) genuose, kurie yra svarbūs EMT indukcijai, vėžio invaziškumui ir atsparumui gydymui (Piskareva et al., 2015; Shao et al., 2017).



3.31 pav. NB ląstelėms specifinių DEHG genų, padalintų pagal 5hmCH praturtinimą (-/+), persidengimo su publikuotais žemos ir aukštos rizikos NB navikų DEHG (Applebaum et al., 2019) reikšmingumas. Buvo atlikta 100 tūkst. persidengimo permutacijų, punktyrinė linija žymi patikimumo ribą, kur $p = 0,05$. Grafiko viršuje yra nurodyta, kokius normoksijos (N) ar hipoksijos (H) auginimo sąlygų porinius ląstelių palyginimus atlikus buvo analizuojami ląstelėms unikalūs DEHG.

Apibendrinant, parodėme įvairių NB ląstelių multi-ominių tyrimų informatyvumą. Pagal hmTOP-seq bibliotekų 5hmCG ir RNR sekoskaitos genų raiškos duomenis įvertinome hipoksijos sąlygomis vykstančius neuroblastomos ląstelių genų aktyvumo pokyčius ir nustatėme jų sąsajas su ląstelių metabolizmo, vystymosi ir diferenciacijos procesais. Panaudojant 5hmC, transkriptominę ir globalių epigenomo struktūrų PMD informaciją detaliam atskleidėme NB ląstelių skirtingus identitetus ir galimą jų reguliaciją. Taip pat parodėme 5hmCG ir 5hmCH sekų ryšį su PMD slopinamų baltymų koduojančių genų raiškos aktyvinimu bei 5hmCH turinčių genų sąsają su aukšta NB rizika.

3.3. TOP-seq metodų taikymas epigenetiniame neinvaziniame prenataliniame vaisiaus lyties ir 21-osios chromosomos trisomijos nustatymui

Vaisiui specifinių epigenetinių biožymenų analizė iš besilaukiančios moters kraujo plazmoje aptinkamos laisvai cirkuliuojančios neląstelinės DNR ir negausios vaisiaus cfDNR praturtinimas galėtų padidinti NIPT jautrumą, sumažinti tyrimų kainą ir suteikti duomenų apie galimus ankstyvus vaisiaus epigenetinius pokyčius, kurie nenustatomi genetiniais tyrimais. Kadangi ekonomiškais TOP-seq metodais sekoskaitoje analizuojamos tik tiriamąją DNR modifikaciją turinčios DNR sekos, norėjome parodyti šių metodų potencialų pritaikymą vaisiaus NIPT.

3.3.1. TOP-seq metodų optimizavimas darbui su cfDNR

Siekiant įvertinti, ar 5hmC sekoskaitą galėtume pritaikyti NIPT, pirmiausiai masių spektrometrijos metodu buvo palygintas bendras 5hmC kiekis placentos choriono gaurelių audinyje ($n = 2$) ir moters kraujo leukocituose ($n = 3$). Rezultatai parodė, kad 5hmC kiekis placentoje yra didesnis nei leukocituose, atitinkamai $0,021 \pm 0,002 \%$ ir $0,012 \pm 0,002 \%$ nuo visų C, $p = 0,03$. Tai leido tikėtis, kad pritaikius hmTOP-seq metodą pagal skirtingą DNR hidroksimetilinimą būtų galima atskirti vaisiaus cfDNR, į besilaukiančios moters kraują patenkančią iš choriono gaurelių, nuo pačios moters cfDNR, kurios didžiąją dalį sudaro kraujodaros ląstelių DNR. Taip pat vaisiaus cfDNR analizei buvo tikimasi pritaikyti nemodifikuotų CG sekų sekoskaitos metodą uTOP-seq, remiantis žiniomis, kad motinos ir vaisiaus cfDNR yra skirtingai metilintos, DNR kilmę nustatčius pagal vieno nukleotido polimorfizmus (Lun et al., 2013). Itin svarbu, kad placenta ir vaisiaus cfDNR yra hipometilintos moters cfDNR atžvilgiu (Lun et al., 2013; Jensen et al., 2015). Tikėtina, kad hipometilintų DNR regionų analizė uTOP-seq leistų dideliu jautrumu nustatyti vaisiaus cfDNR iš motinos visuminės kraujo cfDNR.

Norint atlikti cfDNR sekoskaitą, reikėjo išbandyti uTOP-seq ir hmTOP-seq metodus su labai mažais DNR kiekiais (5-20 ng), atsižvelgiant į tai, kad galime gauti tik tokius kiekius klinikinių cfDNR mėginių. Naujos DNR grandinės sintezei nuo kovalentiškai prijungto ODN (žr. 1.14 pav., 4a etapas; 3.6 pav. 5 etapas) buvo išbandytos dvi skirtingos DNR polimerazės, Pfu ir Pwo, reakciją atliekant 1 arba 5 ciklais. Efektyviausiai DNR sintezę vykdė Pfu DNR polimerazė, atliekant 5 sintezės ciklus. Be to, optimizavome naujai susintetintų DNR grandinių amplifikavimo ciklų skaičių (žr. 1.14 pav., 4b etapas; 3.6 pav. 6 etapas), siekiant, kad galutinių paruoštų bibliotekų koncentracija būtų pakankama sekoskaitai (> 100 pM). Visa tai mums leido sėkmingai paruošti TOP-seq bibliotekas, naudojant vos 5 ng pradinės cfDNR. Kadangi cfDNR uTOP-seq ir hmTOP-seq bibliotekų ruošime yra naudojamas pakankamai didelis amplifikavimo ciklų skaičius, atitinkamai 15 ir 17 ciklų, norėjome įsitikinti, kad mūsų bibliotekos sudarytos iš tikslinių, o ne atsitiktinių foninių DNR fragmentų, susidarančių dėl visų metodikų bibliotekose pasitaikančio nespecifinio pradmenų jungimosi prie DNR ir jų pratęsimo. Tam buvo paraleliai ruošiamos dvi hmTOP-seq bibliotekos su 10 ng cfDNR: tikslinė biblioteka ir kontrolinė, kurios 1-ajame DNR glikozilino etape (žr. 3.6 pav.) į reakcijos mišinį nebuvo įdėta T4 BGT fermento tam, kad nebūtų atliktas 5hmC kovalentinis žymėjimas. Galutinių hmTOP-seq bibliotekų kiekiai buvo įvertinti tikro laiko PGR: kontrolinės

bibliotekos koncentracija gauta 7,03 pM, o tikslinės net 260 kartų didesnė – 1834,42 pM. Tai rodo, kad mūsų cfDNR TOP-seq bibliotekos yra geros kokybės ir jose atsiktinių foninių DNR fragmentų kiekis yra nereikšmingai mažas.

3.3.2. Vaisiaus cfDNR analizė TOP-seq metodais

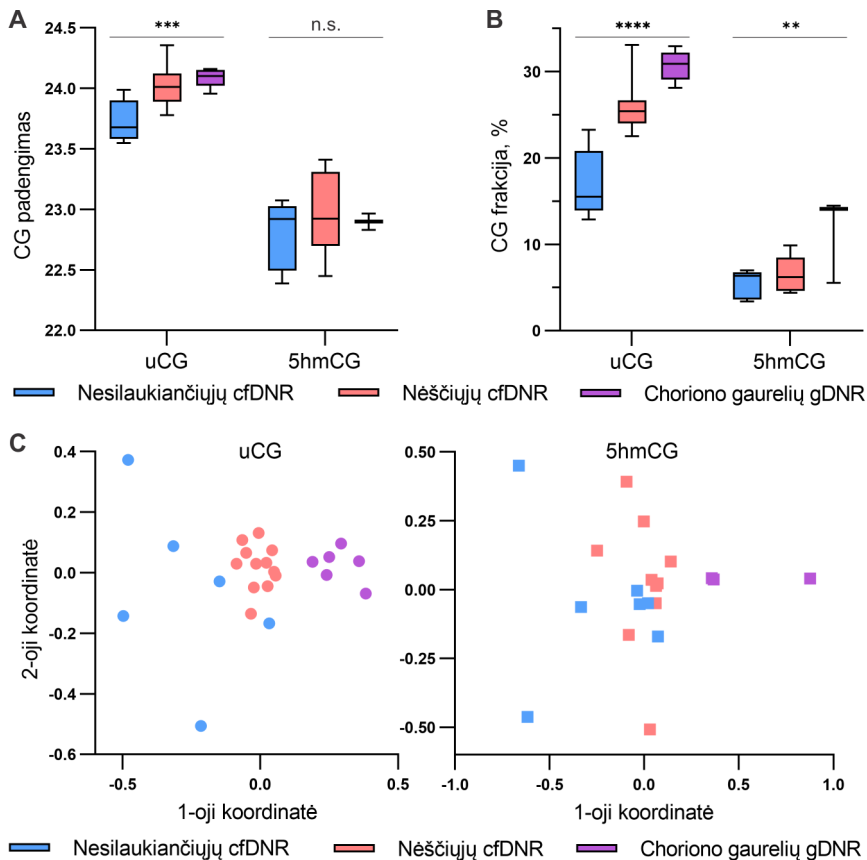
Optimizavus uTOP-seq ir hmTOP-seq metodus darbui su cfDNR, toliau buvo ruošiamos jų bibliotekos sekoskaitai (žr. 2.2.18.). Tikintis ateityje nustatyti epigenetinius vaisiaus biožymenis, tinkamus 21-osios chromosomos trisomijos (T21) detekcijai, buvo analizuojamos trys biologinės mėginių grupės: placentos choriono gaurelių gDNR, nesilaukiančių moterų kraujo plazmos cfDNR ir nėščių moterų kraujo plazmos cfDNR. Iš viso buvo nuskaitytos 38 nesilaukiančių ir nėščiųjų moterų, su sveikais arba T21 turinčiais vaisiais, cfDNR bibliotekos, išlaikant apytiksliai vienodus skirtingų lyčių vaisių mėginių kiekius (žr. 3.2 lentelę). Taip pat buvo paruoštos 10 sveikų nėštumų placentos choriono gaurelių gDNR bibliotekos, iš jų 7 mėginiai uTOP-seq ir 3 – hmTOP-seq (paruošė Z. Staševskij ir dr. K. Daniūnaitė) (žr. P3 lentelę prieduose).

3.2 lentelė. Paruoštų ir sekoskaitos būdu išanalizuotų moterų kraujo plazmos cfDNR uTOP-seq ir hmTOP-seq bibliotekų skaičiai. Skliausteliuose nurodyta vaisiaus lytis.

uTOP-seq			hmTOP-seq		
Sveikas vaisius	T21 vaisius	Nesilaukianti moteris	Sveikas vaisius	T21 vaisius	Nesilaukianti moteris
4 (XX)	3 (XX)	7	3 (XX)	2 (XX)	7
4 (XY)	2 (XY)		4 (XY)	2 (XY)	

Iš visų mėginių uTOP-seq ir hmTOP-seq bibliotekų sekoskaitos duomenų buvo analizuojami nemodifikuotų ir hidroksimetilintų CG sekų padengimai ir bendri identifikuotų sekų kiekiai, išreikšti procentais nuo visų esančių genomo sekų – frakcijos. Tikrinome, ar pagal uCG ir 5hmCG sekų duomenis galime tarpusavyje atskirti tris biologines mėginių grupes: placentos choriono gaurelių gDNR, nesilaukiančių moterų kraujo plazmos cfDNR ir nėščiųjų kraujo plazmos cfDNR. Rezultatai parodė, kad visi šie mėginiai gerai atsiskyrė pagal vidutinius sekoskaitos uCG padengimus ir identifikuotų uCG frakcijas. 5hmCG atveju, patikimi skirtumai tarp mėginių grupių stebėti tik pagal identifikuotų CG sekų kiekius. Svarbu paminėti, kad visais atvejais, esant patikimam mėginių atskyrimui, nėščiųjų cfDNR uCG ir 5hmCG modifikacijos dydžiai įgijo tarpines vertes – mažiausias CG padengimas ir

kiekis stebėtas nesilaukiančių moterų cfDNR, o didžiausias – choriono gaurelių gDNR (žr. 3.32 A ir B pav.). Taip pat visų mėginių uCG ir 5hmCG sekų padengimo duomenys buvo vizualizuoti daugiamačių skalių (angl. multidimensional scaling, MDS) metodu. Tai dar kartą parodė epigenetinius skirtumus tarp mėginių grupių ir patvirtino tendenciją besilaukiančių moterų plazmos cfDNR rodyti tarpines vertes tarp choriono gaurelių gDNR ir nesilaukiančių moterų cfDNR (žr. 3.32 C pav.). Visi šie rezultatai galimai patvirtina, kad nėščiųjų kraujo plazmos cfDNR yra sudaryta iš vaisiaus placentos ląstelių ir pačios moters kūno ląstelių DNR mišinio, o matomi epigenetiniai skirtumai leidžia tikėtis uCG ir 5hmCG duomenis pritaikyti vaisiaus NIPT.

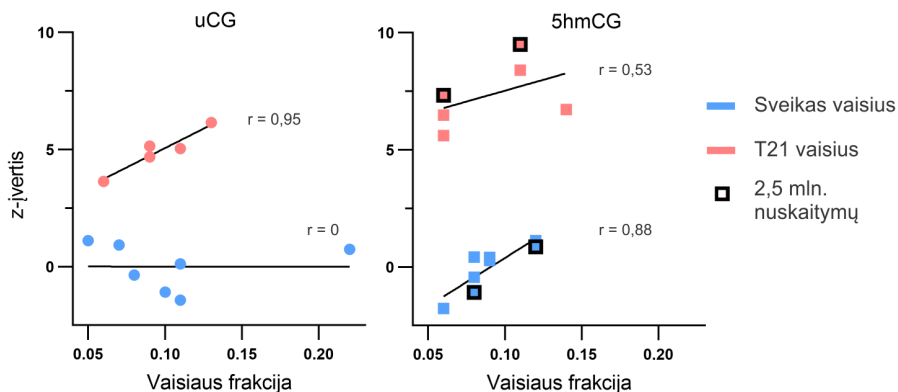


3.32 pav. Trijų mėginių grupių – placentos choriono gaurelių gDNR, nesilaukiančių ir nėščiųjų moterų kraujo plazmos cfDNR – skirtumai pagal uTOP-seq ir hmTOP-seq bibliotekų duomenis. A) Visų trijų grupių mėginių uCG ir 5hmCG vidutinis padengimas. B) Visų trijų grupių mėginių identifikuotų uCG ir 5hmCG frakcijos. Skirtumai tarp mėginių grupių įvertinti

ANOVA analize (n.s. – nepatikimas skirtumas ($p > 0,05$), ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$, **** – $p \leq 0,0001$). C) Visų trijų grupių mėginių vizualizacija daugiamačių skalių metodu pagal uCG ir 5hmCG padengimo duomenis.

3.3.3. Vaisiaus T21 epigenetinis nustatymas sekoskaitos būdu

Toliau buvo testuojamas CG padengimo ir identifikuotų CG frakcijos pritaikomumas vaisiaus NIPT T21 detekcijai. Buvo sukurtas logistinės regresijos modelis, leidžiantis nuspėti vaisiaus kariotipą pagal z-įvertį. Konkretaus mėginio z-įvertis gaunamas paskaičiavus tiriamosios (šiuo atveju 21-osios) ir referentinės chromosomos signalų (CG padengimo arba frakcijos) santykį bei visų sveikų vaisių cfDNR mėginių signalų santykių vidurkį ir standartinį nuokrypį. Tokiu būdu z-įvertis leidžia įvertinti, kiek tiriamojo mėginio chromosomų CG signalų santykis yra nutolęs nuo sveikų vaisių chromosomų signalų santykio. Sukurtas modelis kaip referentinę chromosomą panaudojo 20 ir 16 chromosomas, atitinkamai uCG ir 5hmCG signalams, ir parodė 100 % T21 detekcijos tikslumą. Taip pat įdomu tai, kad uCG signalo atveju z-įvertis didėja esant didesnei T21 cfDNR mėginio vaisiaus frakcijai, tačiau patikimai nekinta sveikų nėštumų atveju (žr. 3.33 pav.). Kylant vaisiaus frakcijai didėja trisominės ir disominės chromosomų DNR kiekių skirtumas (Sparks et al., 2012), galimai todėl T21 mėginiuose stebimas didėjantis 21-osios chromosomos uCG nuskaitymų kiekis ir z-įverčio augimas. Tačiau labai svarbu paminėti, kad vaisiaus frakcijos dydis šiame tyrime nerodė įtakos T21 detekcijos tikslumui, todėl galimas patikimas NIPT atlikimas su įvairiais mėginiais, besiskiriančiais vaisiaus cfDNR kiekiais.



3.33 pav. Visuminės moters kraujo cfDNR vaisiaus frakcijos įtaka z-įverčiui, vertinant vaisiaus kariotipą pagal uCG ir 5hmCG sekoskaitos mėginiuose identifikuotų CG frakcijas. Visur buvo stebimas patikimas skirtumas tarp sveikų ir T21 mėginių ($p < 0,0001$). Juodu rėmeliu apibraukti cfDNR

mėginiai, analizuoti negilia, vidutiniškai 2,5 mln. neapdorotų hmTOP-seq nuskaitymų, sekoskaita.

Taip pat buvo iširta, kokio minimalaus sekoskaitos nuskaitymų kiekio reikia norint atlikti vaisiaus kariotipo tyrimus. Atlikta *in silico* analizė parodė, kad tiksliam T21 nustatymui pagal CG frakciją pakanka 3 milijonų apdorotų uCG (uTOP-seq bibliotekų) nuskaitymų ir vos 1 milijono 5hmCG (hmTOP-seq) nuskaitymų. Tai buvo įrodyta eksperimentiškai, negilia sekoskaita nuskaičius po dvi sveiko ir T21 nėštumo cfDNR hmTOP-seq bibliotekas vidutiniškai su 2,5 milijono pradinių ir 1,3 milijono apdorotų nuskaitymų. Šiuo atveju taip pat gaunama puiki T21 detekcija (žr. 3.33 pav.), o tai didelis privalumas, nes negili sekoskaita potencialiai gali atpiginti NIPT kainas ir padidinti tyrimų prieinamumą.

Apibendrinant, visa tai rodo, kad uTOP-seq ir hmTOP-seq sekoskaitos metodai gali būti sėkmingai pritaikyti tiksliam vaisiaus neinvaziam prenataliniam 21 chromosomos trisomijos nustatymui.

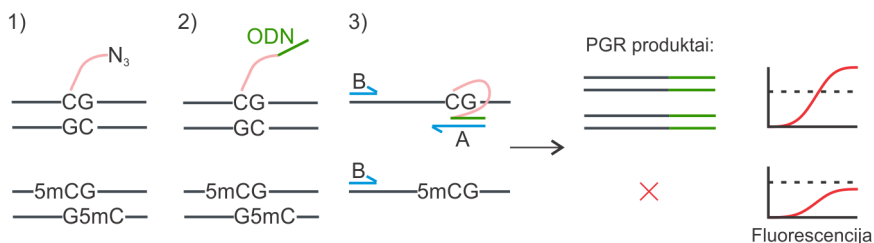
3.3.4. Regioninės uTOP-PGR metodo kūrimas

Parodėme, kad mūsų TOP-seq sekoskaitos metodai puikiai tinka vaisiaus neinvaziam prenataliniam testavimui, tačiau net ir negili sekoskaita yra brangus tyrimas, kuris taip pat reikalauja intensyvios bioinformatinės analizės. Todėl norėjome pasiūlyti pigesnę ir visoms klinikinėms laboratorijoms prieinamesnę sprendimą. Nusprendėme sukurti regioninės uTOP-PGR metodą konkrečių CG taikinių, kurie būtų specifiniai vaisiaus kariotipo biožymenys, modifikavimo būsenos stebėjimui. Tokio tyrimo planuojami trys pagrindiniai etapai (žr. schemą 3.34 pav.):

- 1) tiriamosios DNR uCG sekos kovalentiškai pažymimos azido grupėmis;
- 2) azido-alkino cikloprijungimo reakcijos metu prie pažymėtų CG sekų prijungiamas DNR oligonukleotidas;
- 3) tikro laiko PGR stebimas konkretaus specifinio DNR regiono pagausinimas.

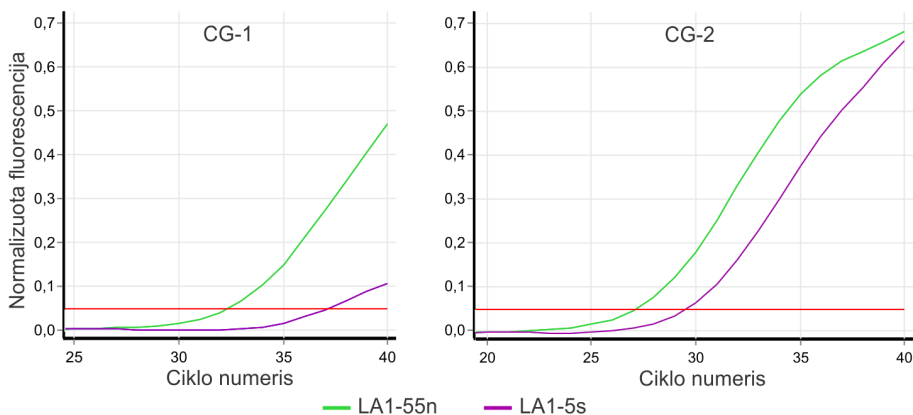
Svarbu paminėti, kad regioninės uTOP-PGR metode naudojami du pradmenys, iš kurių pirmasis (3.34 pav., A pradmuo) yra komplementarus konjuguotam ODN bei 5 nt genominės DNR sekai šalia tiriamojo CG taikinio, taip padidinant specifiskumą konkrečiam gDNR regionui. Kartu naudojant antrąjį pradmenį (3.34 pav., B pradmuo), visiškai komplementarų genominei DNR sekai toliau nuo tiriamojo CG taikinio, yra padauginamas specifinis tiriamojo DNR regiono produktas. Kadangi pirmajame etape bus pažymimos tik nemodifikuotos CG sekos, galima tikėtis, kad kuo silpniau yra metilintas (ar kitaip modifikuotas) tiriamasis DNR lokusas, tuo daugiau susidarys

specifinio PGR produkto ir tai stebėsime pagal fluorescencijos signalo ankstesnį slenkstinės vertės pasiekimą, t. y. bus mažesnis mėginio Ct (Ct – PGR ciklo numeris, kada fluorescencija pasiekia slenkstinę vertę) (žr. 3.34 pav.).



3.34 pav. Regioninės uTOP-PGR metodo schema. uCG, bet ne 5mCG, sekas kovalentiškai pažymėjus azido grupėmis (1) ir prie jų prijungus ODN (2), toliau naudojant pastarajam bei genominei DNR sekai komplementarius pradmenis susidaro PGR produktai (3) ir todėl tikro laiko PGR sistema stebima tai rodanti didėjanti fluorescencija. Tuo tarpu esant metilintoms (ar kitaip modifikuotoms) CG sekoms tikro laiko PGR metu nesusidaro produktai ir fluorescencija nepasiekia slenkstinės vertės (pavaizduotos punktyrine linija).

Pirmiausiai tokio metodo veikimu norėjome įsitikinti tirdami mums gerai žinomus DNR metilinimo skirtumus tarp dviejų neuroblastomos ląstelių tipų, LA1-55n (N-tipo) ir LA1-5s (S-tipo), esančius 2-osios chromosomos CG saloje (chr2:3699126-3699465, hg19). Pagal ankstesnius mūsų grupės pirosekoskaitos duomenis (Staševskij et al., 2017) dviejose CG pozicijose, CG-1 (chr2:3699306) ir CG-2 (chr2:3699318) metilinimo lygis LA1-55n ląstelėse buvo tik 3 %, kai tuo tarpu LA1-5s ląstelėse jis siekė net 95 %. Atlikus regioninę uTOP-PGR su specifiniais DNR pradmenimis tiriamosioms CG sekoms ir šalia esantiems regionams (žr. 2.2.19.), tikro laiko PGR stebėjome ankstesnį fluorescencijos signalą naudojant LA1-55n ląstelių DNR nei su LA1-5s DNR (žr. 3.35 pav.). CG-1 atveju fluorescencija pasiekė slenkstinę vertę ties $32,39 \pm 0,38$ ir $37,12 \pm 0,30$ PGR ciklais, o CG-2 atveju – $27,13 \pm 0,08$ ir $29,54 \pm 0,14$ ciklais, atitinkamai LA1-55n ir LA1-5s ląstelių gDNR. Paminėtina, kad į tikro laiko PGR buvo įnešti vienodi kiekiai abiejų NB ląstelių DNR po ODN konjugacijos. Taigi, šie rezultatai parodo, kad regioninės uTOP-PGR būdu gautų specifinių DNR produktų kiekis yra susijęs su konkrečių CG taikinių modifikavimo lygiu – esant mažam DNR metilinimui gaunama daugiau PGR produktų ir todėl stebimas ankstesnis fluorescencijos signalas.



3.35 pav. Dviejų CG lokusų (CG-1 ir CG-2) skirtingo modifikavimo lygio įvertinimas regioninės uTOP-PGR būdu LA1-55n ir LA1-5s NB ląstelių gDNR. Tikro laiko PGR sistema fiksuojama skirtingu laiku didėjanti fluorescencija, rodanti nevienodą susintetintų PGR produktų kiekį tiriamuosiuose mėginiuose.

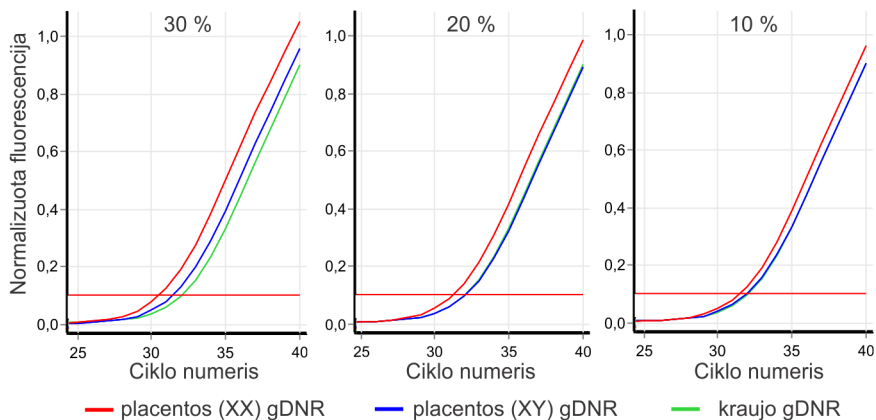
3.3.5. Vaisiaus lyties nustatymas regioninės uTOP-PGR būdu

uTOP-PGR metodą siekėme panaudoti neinvaziam vaisiaus lyties nustatymui pagal skirtingai metilintus CG taikinius X chromosomoje mergaičių ir berniukų placentos audiniuose. X chromosoma pasirinkta todėl, kad ją turi abi lytys ir pagal ją būtų galimas patikimas lyties nustatymas. Tuo tarpu Y chromosoma yra tik berniukų ląstelėse, todėl ją tiriant nepavyktų atskirti mergaičių mėginių (teisingai neigiamų rezultatų, angl. true negative) nuo techniškai nepavykusios analizės mėginių (klaidingai neigiamų rezultatų, angl. false negative). Pagal viešai prieinamus bisulfitinės konversijos sekoskaitos duomenis buvo pasirinkti 4 skirtingai metilinti CG taikiniai: chrX:31090306, chrX:47580815, chrX:53283877, chrX:133646863 (Hanna et al., 2016). Šie lokusai yra stipriau metilinti kraujo gDNR nei placentos gDNR, taip pat labiau metilinti mergaičių nei berniukų placentose – teoriškai tai suteikia galimybę iš besilaukiančios moters visuminės cfDNR pagal tikro laiko PGR signalo stiprumą nustatyti vaisiaus lytį.

Iš pradžių buvo parodyta, kad atlikus regioninę uTOP-PGR pagal fluorescencijos signalo skirtumus galima atskirti ne tik moters kraujo gDNR nuo choriono gaurelių gDNR, bet ir tarpusavyje atskirti mergaitės ir berniuko placentos gDNR. Geriausias mėginių atskyrimas stebėtas analizuojant chrX:133646863 taikinį – moters kraujo DNR mėginio Ct vertė buvo $33,49 \pm 0,1$, berniuko placentos – $32,33 \pm 0,29$, mergaitės placentos – $30,96 \pm 0,25$. Tikro laiko PGR stebimas pagausinto tiriamojo regiono kiekis

priklauso nuo X chromosomos kopijų skaičiaus ir CG taikinio metilinimo lygio juse, tačiau svarbu pabrėžti, kad diagnostiniam tyrimui yra svarbus mėginių Ct verčių skirtumas, o ne absoliučiosios jų Ct vertės.

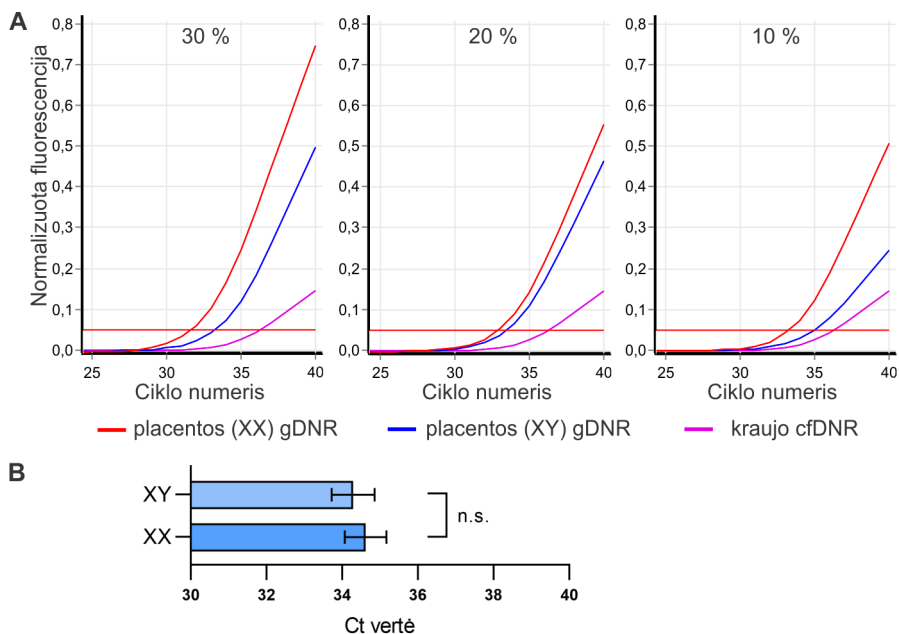
Kadangi besilaukiančios moters plazmos cfDNR tik nedidelę dalį sudaro vaisiaus DNR, toliau tikrinome, ar galime stebėti lyties skirtumus modeliniuose DNR mišiniuose, paruoštuose įvairiais santykiais sumaišius kraujo ir choriono gaurelių gDNR. Buvo paruošti moters kraujo gDNR mišiniai su 30 %, 20 % ir 10 % placentos (mergaitės ir berniuko) gDNR, visuose mėginiuose išlaikant vienodą galutinį DNR kiekį. Tikro laiko PGR rezultatai parodė, kad chrX:133646863 taikiny tinkamiausias vaisiaus lyties stebėjimui DNR mišiniuose esant 30 % choriono gaurelių gDNR (žr. 3.36 pav.). Esant mažesniai choriono gaurelių DNR kiekiui, 10 % ar 20 %, nuo grynos kraujo DNR atsiskiria tik mėginys su mergaitės placentos DNR, o su berniuko nebeatsiskiria.



3.36 pav. Vaisiaus lyties nustatymo testavimas regioninės uTOP-PGR metodu, naudojant moters kraujo ląstelių ir placentos gDNR mišinius, kuriuose mergaitės (XX) ar berniuko (XY) placentos gDNR sudarė 30 %, 20 % arba 10 % bendro DNR mišinio. Analizėje vertinti chrX:133646863 CG taikinio modifikavimo skirtumai mėginiuose.

Vis dėlto, stebėti rezultatai nėra tikslūs, kadangi naudotas audinių DNR mišinys nėra tikslus cfDNR atitikmuo. Todėl toliau norėjome patikrinti, ar pagal chrX:133646863 taikinį būtų galimas vaisiaus lyties atskyrimas analizuojant cfDNR mėginius. Pirmiausiai panaudojome nesilaukiančios moters plazmos cfDNR ir jos mišinius su 30 %, 20 % ir 10 % mergaitės ar berniuko placentos gDNR, visuose mėginiuose išlaikant vienodą galutinį DNR kiekį. Tikro laiko PGR stebėjome galimą vaisiaus lyties nustatymą visuose tirtuose mišiniuose (žr. 3.37 A pav.). Todėl galiausiai regioninė

uTOP-PGR buvo išbandyta su tikrąja plazmos cfDNR, gauta iš besilaukiančių moterų. Iš viso analizei buvo panaudoti 6 cfDNR mėginiai, po tris iš nėštumų su mergaitėmis ir berniukais. Tačiau tikro laiko PGR negavome patikimo cfDNR mėginių atsiskyrimo pagal vaisiaus lytį (žr. 3.37 B pav.). Tai galėjo nulemti nepakankamas tiriamųjų CG sekų metilinimo skirtumas tarp skirtingų lyčių vaisių placentų DNR. Todėl ateityje reiktų detaliau patyrinti uTOP-PGR metodiką, analizei naudojant daugiau CG taikinių.

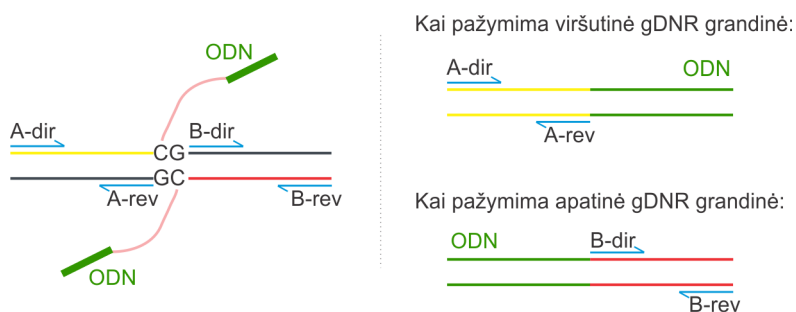


3.37 pav. Vaisiaus lyties nustatymo testavimas regioninės uTOP-PGR metodu, naudojant moters kraujo plazmos cfDNR. A) Vaisiaus lyties nustatymui naudoti DNR mišiniai, sudaryti iš nesilaukiančios moters kraujo plazmos cfDNR ir 30 %, 20 % arba 10 % mergaitės (XX) ar berniuko (XY) placentos gDNR. Analizėje vertinti chrX:133646863 CG taikinio modifikavimo skirtumai mėginiuose. B) Vaisiaus lyties nustatymui pagal chrX:133646863 CG taikinį naudoti po 3 mergaitės ir berniuko besilaukiančių moterų kraujo cfDNR mėginiai. Skirtumas tarp mėginių vertintas Studento t-testu, n.s. – nepatikimas skirtumas ($p > 0,05$).

3.3.6. Vaisiaus T21 epigenetinis nustatymas tikro laiko PGR analize, panaudojant TOP-seq bibliotekas

Nors parodėme regioninės uTOP-PGR metodo potencialą vaisiaus NIPT, tačiau naudojant pasirinktus CG taikinius jis buvo nepakankamo selektyvumo. Todėl toliau buvo išbandyta tirti pasirinktus genomo regionus, kurie jau būtų

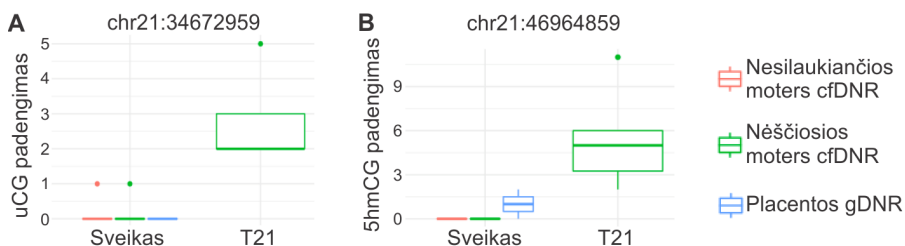
amplifikuoti uTOP-seq ir hmTOP-seq bibliotekose ir išanalizuoti sekoskaitoje, vadinasi, patikrinti mūsų pačių technologinėje platformoje. Šių DNR regionų pagausinimas yra nulemtas CG žymėjimo – TOP-seq bibliotekose susidaro DNR fragmentai nuo žymėtų uCG ir 5hmCG sekų. Panaudojant tikro laiko PGR galėtume analizuoti tam tikrų CG sekų modifikavimo lygius uTOP-seq ir hmTOP-seq bibliotekose nevykdant jų sekoskaitos. Tokia analizė būtų atliekama su pradmenimis, kurie abu yra komplementarūs tik genominiams DNR sekoms, esančioms šalia tiriamosios skirtingo modifikavimo CG sekos. TOP-seq metodai yra specifiniai DNR grandinėms ir nuo vienos tiriamosios CG pozicijos susidaro du skirtingi PGR produktai, todėl NIPT analizei galima sukurti dvi pradmenų poras (A ir B poras, žr. 3.38 pav.), abipus taikinio CG sekos.



3.38 pav. Schema, vaizduojanti dviejų pradmenų porų prisijungimo vietas abipus tiriamosios CG sekos genominei DNR (kairėje) ir TOP-seq bibliotekų fragmentuose (dešinėje), kurie susidarė nuo pažymėtos viršutinės (pavaizduota geltona spalva) arba apatinės (raudona spalva) gDNR grandinės.

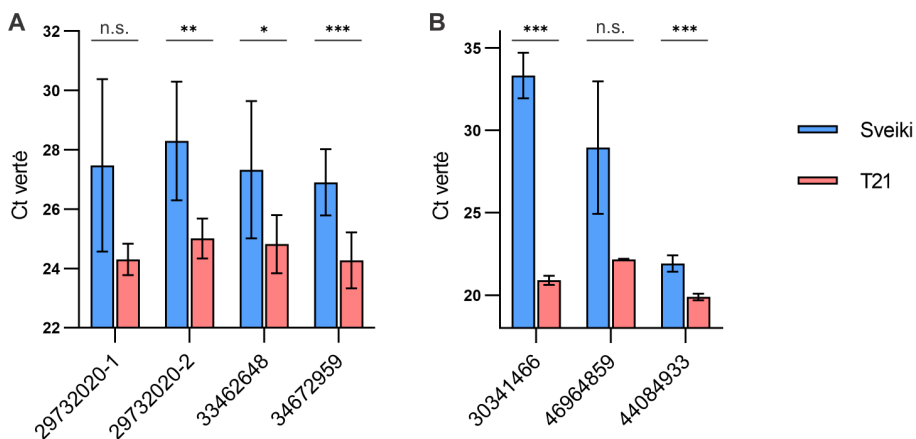
Naujoji technologija buvo išbandyta vaisiaus T21 detekcijai iš besilaukiančios moters plazmos cfDNR. Tam potencialiai tinkamos CG pozicijos buvo surastos iš mūsų jau nuskaitytų bibliotekų (aprašyta 3.3.2. skyrelyje) duomenų. Lyginant cfDNR mėginius iš nėštumų su T21 vaisiumi su visais trimis likusiais mėginių tipais (cfDNR iš sveikų nėštumų, cfDNR iš nesilaukiančių moterų ir choriono gaurelių gDNR), buvo nustatytos T21 specifinės skirtingai modifikuotos uCG ir 5hmCG sekos 21-joje chromosomoje. Buvo pasirinktos 10 CG pozicijų, po 5 uCG ir 5hmCG, kurios geriausiai atskiria T21 vaisius nuo sveikų nėštumų, ir sukurtos pradmenų poros abipus šių sričių. Pasirinktos CG sekos turėjo stipresnius nuskaitymų padengimus T21 mėginiuose – buvo stipriau nmodifikuotos (uCG atveju) arba hidroksimetilintos (5hmCG atveju) nei likusiuose mėginiuose (pavyzdžiai pateikti 3.39 pav.). Todėl T21 atveju iš TOP-seq bibliotekų tikro

laiko PGR sistema turime stebėti didesnius kiekius padaugintų analizuojamų DNR regionų.



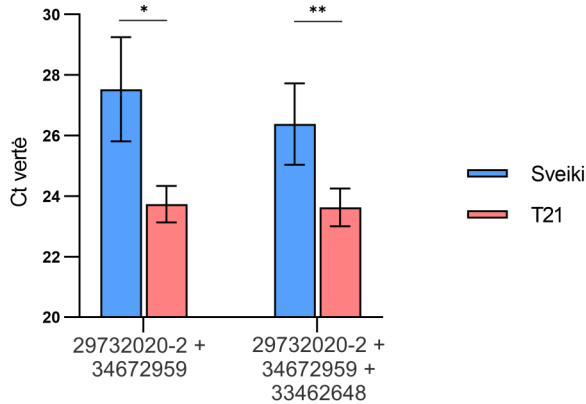
3.39 pav. Padengimo skirtumai T21 specifinėse skirtingai modifikuotose CG sekose pagal TOP-seq bibliotekų duomenis. A) uCG (chr21:34672959) ir B) 5hmCG (chr21:46964859) sekų padengimo skirtumai tarp nesilaukiančios moters ir nėščiosios moters, esant sveikam ar T21 vaisiui, kraujo cfDNR bei normalaus kariotipo placentos gDNR mėginių (modifikuota pagal dr. J. Gordevičiaus pav.).

Tikro laiko PGR tikrinome po 4 anksčiau sekoskaitoje analizuotas uTOP-seq ir hmTOP-seq bibliotekas, paruoštas iš cfDNR, esant nėštumams su sveikais ir T21 vaisiais (žr. 2.2.20.). Iš pradinių 10 CG taikinių atsirinkome po tris geriausias uCG ir 5hmCG sekas (žr. 3.3 lentelę), šalia kurių esančių regionų analizė suteikė geriausią T21 atskyrimą nuo sveikų mėginių, t. y. stebėtas teisingo PGR produkto susidarymas ir atsikartojantis skirtumas tarp mėginių Ct verčių. Atrinktų CG taikinių regionai tikro laiko PGR sistema buvo analizuoti iš viso 18 sveikų nėštumų ir 9 T21 cfDNR TOP-seq bibliotekose, iš kurių 5 sveikų ir 3 T21 mėginių bibliotekos nebuvo anksčiau tirtos sekoskaitos būdu. Analizė parodė, kad konkretaus regiono Ct vertės tarp to paties kariotipo mėginių gaunamos panašios, o T21 atveju jos visada yra mažesnės nei sveikų nėštumų, todėl 21-osios chromosomos detekcija galėtų būti atliekama įvertinant Ct verčių dydžius (žr. 3.40 pav.). Į 3.40 paveikslą įtraukti tik tie sveikų nėštumų cfDNR bibliotekų duomenys, kai susidarė teisingas PGR produktas ir gautas Ct buvo ne didesnis nei 34. Be to, dėl turėto riboto cfDNR kiekio, vieno mėginio bibliotekoje ne visada galėjome patikrinti visus taikinius, todėl detaliau analizuotų ir į 3.40 pav. įtrauktų duomenų kiekis surašytas 3.3 lentelėje. Pastebėtina, kad visų CG pozicijų analizę buvo pasirinkta atlikti tik pagal nuo vienos iš DNR grandinių susidarantį DNR regioną, išskyrus chr21:29732020 atveju buvo vertinamas abiejų DNR grandinių modifikavimo lygis ir todėl tiriamųjų DNR regionų pavadinimuose nurodyti skaitmenys 1 ir 2: 29732020-1 ir 29732020-2.



3.40 pav. Vaisiaus T21 detekcija tikro laiko PGR, panaudojant TOP-seq bibliotekas. A) Keturių uCG regionų analizė uTOP-seq bibliotekose, paruoštos iš besilaukiančių moterų plazmos cfDNR. B) Trijų 5hmCG regionų analizė hmTOP-seq bibliotekose, paruoštos iš besilaukiančių moterų plazmos cfDNR. Tikro laiko PGR Ct verčių skirtumai tarp sveikų ir T21 vaisių mėginių buvo vertinti Stjudento t-testu (n.s. – nepatikimas skirtumas ($p > 0,05$), * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$).

Kadangi tikro laiko PGR analizuojant vieną DNR regioną dažnai stebima didelė biologinė variacija tarp mėginių ir tai galimai sumažintų T21 detekcijos tikslumą, buvo išbandyta atlikti daugybines PGR siekiant padidinti Ct verčių skirtumą (ΔCt) tarp skirtingo kariotipo mėginių. Su sveiko ir T21 nėštumo cfDNR uTOP-seq bibliotekomis buvo analizuota po du arba po tris uCG regionus, jų padauginimui naudojant atitinkamą skaičių specifinių pradmenų porų vienoje reakcijoje. 3.41 pav. pateiktas pavyzdys su dviejų regionų (29732020-2 ir 34672959) ir trijų regionų (29732020-2, 34672959 ir 33462648) analize. Naudojant 29732020-2 ir 34672959 regionų daugybines PGR gautas labai geras rezultatas – vidutinis ΔCt tarp mėginių siekė 3,8, kai po vieną šių sričių vidutinis ΔCt atitinkamai buvo 2,4 ir 2,6. Taigi, ateityje jautriai T21 detekcijai galėtų būti panaudojama daugybinė tikro laiko PGR su cfDNR TOP-seq bibliotekomis.



3.41 pav. Vaisiaus T21 detekcija daugybines tikro laiko PGR, panaudojant uTOP-seq bibliotekas, ruoštas iš besilaukiančių moterų plazmos cfDNR. Daugybine PGR buvo atlikta dviejų 29732020-2 + 34672959 ir trijų regionų 29732020-2 + 34672959 + 33462648 analizė, tiriant atitinkamai 7 sveikus ir 2 T21 bei 8 sveikus ir 5 T21 mėginius. Tikro laiko PGR Ct verčių skirtumai tarp sveikų ir T21 vaisių mėginių buvo vertinti Stjudento t-testu (* – $p < 0,05$, ** – $p \leq 0,01$).

3.3 lentelė. NIPT analizei tikro laiko PGR metodu, panaudojant TOP-seq bibliotekas, parinkti T21 specifiniai skirtingai modifikuoti CG taikiniai ir tirtų nėščiųjų moterų kraujo plazmos cfDNR mėginių kiekis. Į 3.40 pav. įtraukti tik tų mėginių rezultatai, kurių PGR slenkstinė ciklo vertė buvo nedidesnė už 34.

CG sekos koordinatė	Tiriamo regiono pavadinimas	Analizuotų cfDNR mėginių kiekis	Į 3.40 pav. įtrauktų cfDNR mėginių kiekis
uCG			
chr21:29732020	29732020-1	11 (sveiki) 5 (T21)	3 (sveiki) 5 (T21)
chr21:29732020	29732020-2	11 (sveiki) 4 (T21)	5 (sveiki) 4 (T21)
chr21:33462648	33462648	9 (sveiki) 5 (T21)	7 (sveiki) 5 (T21)
chr21:34672959	34672959	9 (sveiki) 6 (T21)	8 (sveiki) 6 (T21)
5hmCG			
chr21:30341466	30341466	5 (sveiki) 3 (T21)	4 (sveiki) 3 (T21)
chr21:46964859	46964859	6 (sveiki) 2 (T21)	2 (sveiki) 2 (T21)
chr21:44084933	44084933	5 (sveiki) 2 (T21)	5 (sveiki) 2 (T21)

Apibendrinant, šioje dalyje aprašytuose tyrimuose parodėme, kad hmTOP-seq ir uTOP-seq metodais stebima epigenetinė CG sekų modifikavimo informacija gali būti panaudojama neinvaziam prenataliniam vaisiaus kariotipo nustatymui. Iš besilaukiančių moterų kraujo plazmos cfDNR galima sėkmingai detektuoti vaisiaus 21-osios chromosomos trisomiją, specifinius 5hmCG ir uCG taikinius analizuojant tikro laiko PGR arba sekoskaitos būdu.

4. REZULTATŲ APITARIMAS

4.1. hmTOP-seq – naujas 5hmC profiliavimo metodas

Dėl savo vienos bazės skiriamosios gebos bisulfitine konversija paremta sekoskaita yra etaloninis epigenetinių DNR modifikacijų, tame tarpe ir 5-hidroksimetilcitozino (5hmC), profiliavimo metodas. Tačiau DNR stipriai degraduoja bisulfito poveikyje, taip apribojant jo pritaikomumą, ypač mediciniuose tyrimuose, kai iš pacientų yra gaunami labai maži tiriamosios DNR kiekiai (Zeng et al., 2019; Wang et al., 2022). Taip pat bisulfitinę konversiją naudojantys metodai pasižymi didelėmis sekoskaitos kainomis bei sudėtinga duomenų analize dėl nuskaitomų visų geno sekų, net ir tokių, kuriose nėra tiriamosios DNR modifikacijos. Tuo tarpu kiti 5hmC nustatymo metodai, paremti restrikcijos endonukleazėmis ar baltymų afiniškumu, nors ir nėra destruktivūs, tačiau yra apriboti fermentų atpažinimo sekų skaičiumi ar pasižymi maža skiriamąja geba (Zeng et al., 2019). Anksčiau mūsų tyrėjų grupė sukūrė nemodifikuotų CG (angl. unmodified CG, uCG) sekų analizės metodą uTOP-seq (angl. uCG-specific tethered oligonucleotide-primed sequencing), pagrįstą DNR žymėjimu paremta sekoskaita (Staševskij et al., 2017). uTOP-seq pasižymi labai didele uCG nustatymo skiriamąja geba, prilygstančia bisulfitinę konversiją naudojantiems metodams, tačiau nesukelia DNR degradacijos ir yra ekonomiškė, nes nuskaitomos tik informatyvios DNR sekos. Dėl uTOP-seq privalumų, jo pagrindu buvo kuriamas naujas, bisulfito nenaudojantis, didelės skyros 5hmC profiliavimo metodas hmTOP-seq (angl. 5hmC-specific TOP-seq).

hmTOP-seq metode panaudojant T4 β-gliukoziltransferazę (BGT) ir UDP-6-N₃-Glc kofaktorių, 5hmC pažymimas azido grupę turinčia gliukoze, prie kurios „click“ reakcijos metu prijungiamas biotinilintas oligodeoksiribonukleotidas (ODN). Tai leidžia praturtinti negausius 5hmC turinčius DNR fragmentus. Toliau panaudojant prijungtam ODN komplementarų pradmenį, nuo žymėto 5hmC vykdoma naujos DNR grandinės sintezė, kurios sekoskaita įgalina nustatyti tiksliai 5hmC genomines pozicijas.

Pirmiausiai hmTOP-seq metodo veikimas buvo patikrintas su modeline bakteriofago λ DNR, *in vitro* hidroksimetilinta GCGC pozicijose. Analizė parodė, kad hmTOP-seq yra labai didelės, beveik vienos bazės, skiriamosios gebos metodas: 67 % nuskaitymų prasidėjo tiksliai nuo žymėto 5hmC, o iš viso net 98 % nuskaitymų – iki 4 nt atstumu nuo jo. Taip pat hmTOP-seq yra pusiau kiekybinis (angl. semi-quantitative) metodas, leidžiantis įvertinti santykinę 5hmC lygį.

Reikia paminėti, kad hmTOP-seq publikavimo metu pasirodė straipsnis apie labai panašų Jump-seq metodą (Hu et al., 2019). Šis metodas taip pat remiasi ODN prijungimu prie azidinta gliukoze žymėto 5hmC ir naujos DNR grandinės sintezės iniciacija nuo jo, tačiau jis pasižymi už hmTOP-seq mažesne, iki 20 nt skiriamąja geba. Taip galėtų būti todėl, kad Jump-seq prie 5hmC prijungiamas DNR oligonukleotidas, turintis DBCO grupę. Pfu DNR polimerazės ir substrato konformacijos modeliavimas parodė, kad dėl savo dydžio DBCO grupė sunkiai telpa polimerazės aktyviajame centre (modeliavimą atliko prof. habil. dr. S. Klimašauskas). Dėl sterinių DBCO efektų galimai yra apsunkinamas DNR polimerazės „peršokimas“ nuo ODN ant žymėtos gDNR ir todėl naujos DNR grandinės sintezė tęsiama didesniu atstumu nuo žymėto 5hmC (Hu et al., 2019). Mes pradiniuose hmTOP-seq kūrimo darbuose taip pat buvome išbandę DBCO strategiją, tačiau ji buvo itin neefektyvi. Taigi, hmTOP-seq naudojamas efektyvus ODN prijungimo prie žymėto 5hmC ir DNR sintezės nuo jo būdas leidžia pasiekti didelę metodo skiriamąją gebą.

Detaliam hmTOP-seq veikimo įvertinimui sudarėme pelės embrioninių kamieninių ląstelių (ESC) 5hmC genolapius. Parodėme, kad hmTOP-seq gali būti naudojamas su įvairiu pradinės gDNR kiekiu (5-500 ng), kas potencialiai gali turėti plačias metodo taikymo galimybes. Be to, atliktas palyginimas parodė aukštas koreliacijas tarp pelės ESC hmTOP-seq duomenų ir vienos bazės skyros bisulfitinės konversijos TAB-Seq (Yu et al., 2012) bei mažos skiriamosios gebos nano-hmC-Seal (Han et al., 2016) metodų rezultatų – tai įrodė hmTOP-seq patikimumą. Be to, palyginimas atskleidė ir hmTOP-seq privalumus prieš kitus metodus. hmTOP-seq buvo identifikuota daugiau 5hmCG sekų, naudojant net ir nedidelį (50 ng) pradinės gDNR kiekį: 500 ng bibliotekose nustatyta 4,8 mln., 50 ng bibliotekose – 2,0 mln., o TAB-Seq – 1,9 mln. sekų (naudojant iki 1 µg gDNR).

hmTOP-seq stebėjome pelės ESC 5hmC genominių pasiskirstymą, sutampantį su anksčiau aprašytais tendencijomis. 5hmC labiausiai buvo praturtintas stiprikliuose ir genų egzonuose, kuriuose yra siejamas su genų raiškos aktyvinimu (Pfeifer et al., 2020). Tuo tarpu promotoriuose stebėtas 5hmC trūkumas, išskyrus stipriausiai hidroksimetilintas CG sekas, kurios buvo praturtintos neaktyviuose promotoriuose. Tai gerai sutinka su duomenimis, kad promotoriuose 5hmC žymi genų raiškos slopinimą (Wu et al., 2011; Huang et al., 2014).

hmTOP-seq įgalina atskirų DNR grandinių 5hmC analizę ir tai mums leido stebėti nesimetrišką hidroksimetilinimą genų kūnuose. Juose koduojančiajai DNR grandinei buvo būdingas stipresnis 5hmCG lygis nei matricinei grandinei, ir šis skirtumas tarp DNR grandinių teigiamai koreliavo su genų

aktyvumu – didesnis hidrokسيمetilini mo skirtumas stebetas genuose, pasižyminčiuose stipresne raiška. Tokia 5hmC asimetriškumo tendencija anksčiau buvo aprašyta žmogaus smegenų ląstelėse ir manoma, kad transkripcijos elongacijos metu galėtų būti skatinamas DNR grandinei specifinis TET baltymų aktyvumas, nors to mechanizmas nėra supastas (Wen et al., 2014). Naujausi tyrimai rodo, kad TET2 baltymo aktyvumui įtakos neturi priešingoje DNR grandinėje esančio C modifikavimo būseną (Crawford et al., 2016), be to, TET1 ir TET2 aktyvumas priklauso nuo aplink CG esančio sekos konteksto nuo -3 iki +2 pozicijų (Adam et al., 2022), o visa tai bent dalinai galėtų sudaryti sąlygas nesimetriškam DNR hidrokسيمetilini mo. Svarbu paminėti, kad pelės ESC genų kūnuose nematėme analogiško uCG asimetriškumo. Tai galimai paaiškinama tuo, kad žinduolių ląstelėse net 92-99 % 5mCG sekų yra simetriškai modifikuotos (Lister et al., 2009; Yu et al., 2012). Be to, nedidelė dalis genome esančių hemimetilintų CG sekų yra linkusios vienodai pasiskirstyti abiejose DNR grandinėse (Kyriakopoulos et al., 2022).

Dėl itin didelės hmTOP-seq skiriamosios gebos, šiuo metodu galima analizuoti subtilius hidrokسيمetilini mo skirtumus baltymus koduojančių genų splaisingo srityse (egzonų ir intronų ribose). Pelės ESC hmTOP-seq duomenyse nustatytas 5' splaisingo srities 5hmCG kiekio padidėjimas egzoni nėje dalyje ir nuosmukis introni nėje dalyje gerai atspindi anksčiau publikuotą 5hmC pasiskirstymą, nustatytą etaloniniu bisulfitinės konversijos metodu (Wen et al., 2014). 5hmC modifikacija egzonų ir intronų ribose buvo susieta su alternatyviu splaisingu (Khare et al., 2012; Wen et al., 2014), todėl hmTOP-seq metodas galėtų pasitarnauti detalesniems šios srities tyrimams.

Kadangi 5hmC žymėjimui naudojame BGT fermentą, kuris neturi jokio DNR sekos šališkumo ir glikozilina 5hmC skirtingų bazių apsuptyje (Josse ir Kornberg, 1962), tai hmTOP-seq metodas leidžia nustatyti hidrokسيمetilintas ne tik CG, bet ir žinduolių ląstelėse rečiau modifikuojamas CH pozicijas. Pelės ESC daugiausiai (50 %) identifikavome hidrokسيمetilintų CA sekų. Tai puikiai sutinka su literatūroje aprašytais duomenimis pelės ir žmogaus ląstelėse (Sun et al., 2015; He et al., 2021a) ir galimai yra susiję su tuo, kad iš visų CH pozicijų būtent CA yra dažniausiai metilintamos DNMT3A/B fermentų (Jurkowska et al., 2011).

Dar vienas svarbus hmTOP-seq privalumas – ekonomiškumas ir bioinformatinės analizės efektyvumas. Kadangi bibliotekų ruošimo metu vykdomas 5hmC turinčių DNR fragmentų praturtinimas, sekoskaitoje nuskaitomos tik informatyvios genomo sekos. Tuo tarpu kituose vieno nukleotido tikslumo metoduose, pavyzdžiui, bisulfitinės konversijos

TAB-Seq (Yu et al., 2012) ar fermentinio deaminavimo ACE-seq (Schutsky et al., 2018), yra nuskaitomas visas tiriamasis genomus.

4.2. hmTOP-seq panaudojimas multi-ominėje neuroblastomos skirtingų tipų ląstelių analizėje

Po sėkmingo hmTOP-seq validavimo ir įvertinimo su pelės ESC gDNR, toliau panaudodami šį metodą tyrėme 5hmC pasiskirstymą ir jo galimas funkcijas neuroblastomos (NB) ląstelėse. Siekiant geriau suprasti esamus NB ląstelių tipus ir jų identiteto reguliaciją, tyrimuose naudojome šešias jų linijas: dvi motinines, išskirtas iš pacientų SK-N-BE(2) ir LA-N-1, bei iš jų išvestas po dvi dukterines sublinijas: BE(2)-C (I-tipo) ir BE(2)-M17 (N-tipo); LA1-55n (N-tipo) ir LA1-5s (S-tipo).

NB ląsteles auginome 24-72 val. normoksijos ir hipoksijos, dažnai pasitaikančios augliuose ir nulemiančios agresyvesnę vėžio fenotipą, sąlygomis. Tiek bendro 5hmC kiekio NB ląstelių gDNR matavimas HPLC-MS/MS metodu, tiek ir hmTOP-seq bibliotekų sekoskaitos duomenys parodė, kad hipoksijos metu ląstelėse padaugėja 5hmC, kuris galimai susijęs su hipoksiniiais genų raiškos pokyčiais. NB 5hmC pagausėjimas buvo pastebėtas ir kituose darbuose ir galimai yra nulemiamas suintensyvėjusios TET baltymų raiškos, reguliuojamos hipoksijos atsako veiksnio HIF1 (Mariani et al., 2014; Thienpont et al., 2016; He et al., 2021b). Tiesa, anksčiau buvo parodyta, kad hipoksijos metu 5hmC padaugėja N-tipo, bet ne S-tipo NB ląstelėse (Mariani et al., 2014), tačiau analizė buvo atlikta naudojant tik dvi S-tipo ląstelių linijas, todėl galbūt tai nėra universali šio ląstelių tipo savybė.

Norint detaliau įvertinti epigenetinę 5hmC funkciją hipoksiniams genų raiškos pokyčiams, buvo paruoštos 4 dukterinių NB ląstelių linijų: BE(2)-C, BE(2)-M17, LA1-55n ir LA1-5s, augintų normoksijos ir hipoksijos sąlygomis, RNR sekoskaitos bibliotekos. Iš sekoskaitos duomenų kiekvienai ląstelių linijai buvo sudarytos trys genų grupės: 1) genai, kuriuose hipoksijos sąlygomis padaugėjo 5hmCG – up-DHG, arba sumažėjo – down-DHG (angl. differentially hydroxymethylated genes); 2) genai su hipoksijoje sustiprėjusia arba susilpnėjusia raiška, atitinkamai up- ir down-DEG (angl. differentially expressed genes); 3) genai, kuriuose stebimas hipoksinis 5hmCG ir raiškos padidėjimas – up-DEHG, arba sumažėjimas – down-DEHG (angl. differentially expressed and hydroxymethylated genes). DEHG grupės genuose buvo stebėtas didžiausias 5hmCG signalo ir raiškos lygio pokytis, todėl analizėse dažniausiai naudojome juos kaip informatyviausius genus. Funkcinė genų praturtinimo GO (angl. gene ontology) analizė parodė Up-DEHG sąsajas su bazinėmis metabolizmo funkcijomis, pavyzdžiui, atsaku

į hipoksiją ir glikolizę, bei neuronų diferenciacijos ir vystymosi procesais. Ypač svarbu, kad stebėjome neigiamos vystymosi reguliacijos terminus, pavyzdžiui, „neigiama neuronų diferenciacijos reguliacija“. Tai galimai susiję su hipoksijos indukuojama NB ląstelių dediferenciacija, lemiančia padidėjusį vėžio agresyvumą (Huertas-Castaño et al., 2020).

Kadangi NB heterogeniškumas yra didelė kliūtis šio vėžinio susirgimo gydymui (Braekeveldt et al., 2018), naudodami įvairius metodus kompleksiskai tyrėme NB tarpląstelinius skirtumus. Pagal ląstelių genų raišką ir jų 5hmC signalą (h-density) van Groningen et al., 2017 sudarytuose ADRN ir MES genų rinkiniuose, BE(2)-C, BE(2)-M17 bei LA1-55n ląsteles priskyrėme adrenerginiams ląstelių tipui, o LA1-5s – mezenchiminiam tipui. Tarpusavyje lyginant visas apjungtas ADRN (BE(2)-C + BE(2)-M17 + LA1-55n) ląsteles arba kiekvieną iš jų atskirai su MES LA1-5s ląstelėmis, ląstelių specifinių DHG ir DEHG GO praturtinimo analizė parodė ADRN genų sąsajas su nervų sistemos vystymosi, neuronų diferenciacijos ir sinapsių procesais, o MES genų – su EMT, ląstelių judrumu ir adhezija. Tai gerai atspindi aprašytus ADRN ir MES tipų bruožus (Boeva et al., 2017; van Groningen et al., 2017). Tačiau pagal adrenerginių BE(2)-C ir BE(2)-M17 ląstelių palyginimą sudarytų joms specifinių DEHG ir DHG sąrašų praturtinimas „Hallmark“ genų rinkiniuose parodė subtilius ląstelių skirtumus įvairiuose signaliniuose keliuose, galimai rodančius skirtingą šių ląstelių vėžiškumo reguliaciją ir BE(2)-C vėžinių kamieninių ląstelių savybes (Ross et al., 2003; Walton et al., 2004).

3'nrRNR raiškos tyrimai toliau atskleidė tam tikrus skirtumus tarp N- (BE(2)-M17 ir LA1-55n) ir I-tipo BE(2)-C ląstelių bei panašumus tarp I- ir S-tipo LA1-5s ląstelių. Visos ADRN ląstelės pasižymėjo už LA1-5s stipresne 3'nrRNR *CTC-510F12.4* ir persidengiančio baltymo geno *RAB3D* raiška, tačiau BE(2)-C ir LA1-5s ląstelėms buvo būdingas mažesnis, tarpusavyje panašus *RP5-1126H10.2* ir *UBR4* bei *AC010729.1* ir *SOX11* RNR kiekis. Nors trūksta duomenų apie šių 3'nrRNR funkcijas NB, kai kurių su jais persidengiančių baltymų funkcijos yra žinomos. Pavyzdžiui, buvo parodyta, kad su *RP5-1126H10.2* persidengiantis *UBR4* genas yra svarbus neurogenezei (Kim et al., 2018) ir yra galimas NB vėžio slopintojas (Wang et al., 2006), o *SOX11* pasiūlytas kaip specifinis ląstelių ADRN identiteto reguliatorius (Decaestecker et al., 2020). *RAB3D* baltymas, kuris indukuoja krūties vėžio ląstelių EMT (Yang et al., 2015), taip pat buvo aptiktas NB ląstelių egzomosose ir susietas su NB ląstelių migracijos skatinimu (Fonseka et al., 2019).

Žinduolių ląstelių epigenomams yra būdingi dideli, dalinai metilinti DNR domenai – PMD (angl. partially methylated domains), siejami su

transkripciškai neaktyviais regionais. PMD išsidėstymas sveikose ir vėžinėse ląstelėse nurodo specifiškumus audiniams (Salhab et al., 2018; Brinkman et al., 2019), o jų metilinimo variabilumas atskleidžia tarpląstelinį auglių heterogeniškumą (Brinkman et al., 2019; Gull et al., 2022). Todėl panaudojant NB ląstelių uTOP-seq bibliotekų sekoskaitos duomenis buvo tiriami joms būdingi PMD. Ši analizė atskleidė galimus epigenomo struktūros panašumus tarp BE(2)-C ir LA1-5s ląstelių – jose identifikuota daugiausiai ir didžiausio dydžio PMD, be to, stebėtas didesnis jų tarpusavio persidengimas, lyginant su N-tipo (BE(2)-M17 ir LA1-55n) ląstelių PMD. NB ląstelėms unikalių PMD analizė parodė, kad N-tipo ląstelių specifiniai PMD buvo labiau praturtinti ankstyvosios replikacijos genomo vietose, o BE(2)-C ir LA1-5s – vėlyvosios. Be to, atliekant NB ląstelių porinius palyginimus pastebėjome, kad tam tikroms ląstelėms specifiniai DEHG buvo praturtinti PMD, būdinguose kitoms ląstelėms, su kuriomis yra atliekamas palyginimas. Visa tai atskleidžia galimas PMD sąsajas su NB ląstelių identiteto reguliacija. Neatsitiktinė (epi)genomo struktūra buvo parodyta ir kiaušidžių vėžio tyrimuose – genai, atsakingi už vėžinių ląstelių vystymąsi ir savitumą, buvo sutinkami už PMD ribų (Gull et al., 2022).

Nors genai, esantys PMD viduje, paprastai yra silpnai ar visai neišreiškiami (Salhab et al., 2018; Decato et al., 2020), mūsų rezultatai parodė, kad ląstelėms specifinių PMD genai išvengė slopinančiojo efekto, jei jie patenka į ankstyvosios replikacijos regionus (šių regionų genai dažnai pasižymi stipria raiška (Donley ir Thayer, 2013)). Pasiūlėme, kad tokį efektą galėtų nulėmti PMD genų hidroksimetilinimas. Be to, PMD esantys genai yra aktyvinami ir hipoksijos metu – ląstelėms specifiniai hipoksiniai up-DEHG buvo praturtinti tų ląstelių specifiniuose PMD.

Svarbu paminėti, kad NB ląstelėse 5hmC analizę atlikome ne tik CG, bet ir kitose, rečiau hidroksimetilinamose CH sekose ir parodėme jų sąsajas su genų raiškos reguliacija. Genams, turintiems hidroksimetilintas CH pozicijas, buvo būdinga stipresnė genų raiška nei be 5hmCH sekų. Nors mes ir kiti (Cui et al., 2020) pastebėjome 5hmC trūkumą PMD regionuose, bet NB ląstelėse 5hmCH padidino jų viduje esančių nuslopintų genų raišką. Įdomu tai, kad BE(2)-C ir LA1-5s, bet ne abiejų N-tipų (BE(2)-M17 ir LA1-55n), ląstelių specifiniai DEHG, turintys 5hmCH, parodė sąsajas su aukšta NB klinicine rizika (pagal Applebaum et al., 2019 rizikos skirstymą). BE(2)-C I-tipo ląstelės yra apibūdinamos kaip labai agresyvios, tačiau LA1-5s S-tipo ląstelės turėtų neformuoti naviko (Ross et al., 2003), bet jų sąryšį su didele klinicine NB rizika galėjo nulėmti jų mezenchiminis, į judrias nervinės keteros ląsteles panašus identitetas (Boeva et al., 2017; van Groningen et al., 2017). Taip pat manome, kad tarpląstelinėmis sąveikomis LA1-5s galėtų paskatinti kitų NB

ląstelių migraciją panašiai kaip buvo parodyta, kad S-tipo ląstelių sekretuojami baltymai didino N-tipo išgyvenamumą ir proliferaciją (Li et al., 2021a).

Apibendrinant, mūsų atlikta multi-ominė NB ląstelių analizė suteikė galimybę detaliai įvertinti skirtingų ląstelių linijų identitetus, jų tarpusavio panašumus ir skirtumus. Ypač svarbu tai, kad stebėjome tarpines I-tipo BE(2)-C ląstelių savybes tarp N- ir S-tipų. Nors pagal skirtingą baltymus koduojančių genų raišką ir jų hidroksimetilinimą BE(2)-C priskyrimė ADNRN tipui, tačiau pagal tirtų 3' nkrNR genų raišką ir PMD išsidėstymą genome jos rodė panašumus su MES tipu. Be to, BE(2)-C ląstelėse buvo matomos tarpinės 5hmC praturtinimo tendencijos tarp N- ir S-tipams būdingo 5hmC praturtinimo aplink PMD regionus. Visa tai galimai atskleidžia BE(2)-C buvimą pereinamojoje diferenciacijos būsenoje, kuri jau anksčiau buvo aprašyta pagal morfologinius ir biocheminius NB ląstelių linijų bruožus (Ciccarone et al., 1989; Ross et al., 2003). BE(2)-C ląstelės galėtų būti ir savitas agresyviausių ląstelių potipis, kuriam būdingos vėžinių kamieninių ląstelių savybės (Walton et al., 2004). Naujausiuose NB navikų pavienių ląstelių genų raiškos tyrimuose taip pat buvo parodytas tarpinis tarp ADNRN ir MES tipų ląstelių fenotipas, susietas su didesniu NB piktybiškumu ir galimai atspindintis I-tipo ląsteles (Yuan et al., 2022).

4.3. hmTOP-seq ir uTOP-seq metodų taikymas neinvaziniams vaisiaus kariotipo tyrimams

Vaisiaus neinvaziniai prenataliniai tyrimai (NIPT) iš besilaukiančios moters kraujo plazmoje laisvai cirkuliuojančios neląstelinės DNR (angl. cell-free, cfDNR) – tai dar viena sritis, kur sėkmingai pritaikėme mūsų naujai sukurtą hmTOP-seq bei ankstesnį uTOP-seq metodus. Pagrindė NIPT naudojami vaisiaus lyties ir aneuploidijų, ypač 21, 13 ir 18 chromosomų trisomijų, nustatymui, naudojant genetinius DNR sekoskaitos metodus (Skrzypek ir Hui, 2017). Tačiau vaisiaus cfDNR sudaro vidutiniškai tik 10-20 % motinos kraujo plazmos visuminės cfDNR (Taglauer et al., 2014). Todėl suradus ir panaudojus epigenetinius vaisiaus cfDNR biožymenis būtų galima praturtinti vaisiaus cfDNR ir taip padidinti NIPT jautrumą bei sumažinti tyrimų kainą.

Yra duomenų, kad placenta yra hipometilinta moters kraujo atžvilgiu: kraujo ląstelių gDNR yra metilinta ~72 % CG sekų, o placentos – tik 55-59 % (Chu et al., 2011; Lun et al., 2013). Taip pat mes ir kiti (Nestor et al., 2012) placentoje nustatėme didesnę 5hmC kiekį nei kraujo gDNR. Tai leido tikėtis, kad panaudojus TOP-seq metodus pagal skirtingus CG sekų modifikavimo

lygius bŭtŭ galima atskirti vaisiaus cfDNR, į besilaukiančios moters kraują patenkančią iš placentos, nuo pačios moters cfDNR, kurios didžiąją dalį sudaro kraujodaros ląstelių DNR. Todėl pirmiausiai tikrinome trijų skirtingų biologinių mėginių grupių – placentos choriono gaurelių gDNR, nesilaukiančių moterų kraujo plazmos cfDNR ir nėščiujų kraujo plazmos cfDNR – atskyrimo galimybes pagal uCG ir 5hmCG. Parodėme, kad visos tirtos mėginių grupės patikimai atsiskiria tarpusavyje pagal skirtingus uCG padengimus bei identifikuotų uCG ir 5hmCG frakcijas. Be to, mažiausias CG sekų kiekis ir jų padengimas stebėtas nesilaukiančių moterų cfDNR, didžiausias – choriono gaurelių gDNR, o nėščiųjų cfDNR mėginiuose – vidutinis, kas galimai patvirtina, kad besilaukiančių moterų visuminė plazmos cfDNR yra sudaryta pagrinde iš vaisiaus placentos ir moters kraujo DNR mišinio.

Identifikuotų uCG ir 5hmCG sekų kiekis bei jų sekoskaitos padengimai buvo panaudoti vaisiaus 21-osios chromosomos trisomijos (T21), Dauno sindromo, detekcijai. Sukurtas modelis pagal z-įverčius parodė tikslų sveikų ir T21 nėštumų atskyrimą net esant ypač mažam sekoskaitos gyliui – detekcijai pakanka vos 1 mln. hmTOP-seq ir 3 mln. uTOP-seq apdorotų nuskaitymų. Palyginimui, vykdant T21 detekciją iš visuminės, nors ir negilios, DNR sekoskaitos duomenų, reikia daugiau nei 10 mln. nuskaitymų (Raman et al., 2019). Tiesa, buvo matoma tendencija, kad mėginių z-įvertis kyla didėjant vaisiaus cfDNR frakcijai, panašiai kaip tai buvo pastebėta anksčiau genetiniuose visuminės DNR sekoskaitos tyrimuose (Dheedene et al., 2016), tačiau tai neturėjo įtakos T21 detekcijos tikslumui.

Kadangi sekoskaita yra gana brangus metodas, reikalaujantis detalios bioinformatinės analizės, todėl išbandėme paprastesnės tikro laiko PGR sistemos pritaikomumą NIPT, atliekant regioninę uTOP-PGR. Technologijos veikimą testavome vaisiaus lyties nustatymui pagal kraujo ir placentos gDNR bei mergaičių ir berniukų placentų gDNR skirtingai metilintus CG taikinius X chromosomoje (Hanna et al., 2016). Pademonstravome, kad regioninės uTOP-PGR metodu galime stebėti epigenetinius audinių skirtumus ir tai potencialiai gali būti pritaikoma NIPT. Vis dėlto, tikro laiko PGR nepavyko gauti patikimo vaisiaus lyties atskyrimo iš besilaukiančios moters visuminės kraujo plazmos cfDNR. Tai galėjo nulemti nepakankamas tiriamųjų CG sekų metilinimo skirtumas tarp skirtingų lyčių vaisių placentų ir didelė DNR metilinimo biologinė variacija. Taip pat tikėtina, kad regionine uTOP-PGR buvo ištirtas per mažas CG taikinių skaičius.

Toliau siekdami tikro laiko PGR pritaikyti NIPT, šia sistema atlikome pasirinktų CG sekų modifikavimo ir jų žymėjimu paremto DNR regionų pagausinimo analizę, panaudojant uTOP-seq ir hmTOP-seq bibliotekas,

paruoštas iš besilaukiančių moterų kraujo plazmos cfDNR. Iš mūsų turimų sekoskaitos duomenų buvo atrinktos uCG ir 5hmCG pozicijos, pasižyminčios išskirtiniu modifikavimo lygiu T21 nėštumo cfDNR, lyginant su sveikų nėštumų cfDNR, nesilaukiančių moterų cfDNR ir choriono gaurelių gDNR. Parodėme, kad šių CG sekų žymėjimu paremto šalia esančių DNR regionų padauginimo analizė tikro laiko PGR metodu leidžia atskirti sveikus ir T21 vaisius iš uTOP-seq ir hmTOP-seq bibliotekų, nevykdant jų sekoskaitos. Šios metodikos pritaikymas klinikiuose tyrimuose būtų didelis privalumas – tai leistų sumažinti NIPT kainą ir rezultatų analizės trukmę. Anksčiau buvo pasiūlyta vaisiaus Dauno sindromo detekcija pagal epigenetinius biožymenis, tikro laiko PGR vertinant 21-osios chromosomos kiekį, analizėje naudojant skirtingo metilinimo taikinius/regionus tarp placentos ir moters kraujo gDNR (Tsaliki et al., 2012; Zhang et al., 2019). Tačiau T21 atveju yra stebimas pakitęs 21-osios chromosomos metilinimas (Lee et al., 2016), todėl mūsų darbe aprašytas Dauno sindromo nustatymas pagal jam specifinius uCG ir 5hmCG taikinius galėtų būti patikimesnis ir jautresnis NIPT metodas.

IŠVADOS

1. Sukurtas ekonomiškai 5-hidroksimetilcitozino (5hmC) analizės viso genomo mastu hmTOP-seq (angl. 5hmC-specific tethered oligonucleotide-primed sequencing) metodas, pagrįstas specifiniu 5hmC žymėjimu paremta sekoskaita.
2. Su pelės embrioninių kamieninių ląstelių DNR pademonstruota, kad hmTOP-seq leidžia patikimai dideliu atsikartojamumu sudaryti 5hmC genolapius itin didele skiriamąja geba, išsaugant DNR grandinei specifinę hidroksimetilinimo informaciją.
3. hmTOP-seq metodu sudaryti 5hmCG profiliai, kartu su RNR sekoskaitos genų raiškos duomenimis, atskleidžia neuroblastomos ląstelių hipoksinius metabolizmo ir vystymosi genų reguliacijos pokyčius.
4. Multi-ominė – 5hmC, transkriptomikos ir nemodifikuotų CG sekų (pagal uTOP-seq (angl. unmodified CG-specific TOP-seq) duomenis) – neuroblastomos ląstelių analizė leidžia detalai įvertinti skirtingus ląstelių identitetus.
5. hmTOP-seq ir uTOP-seq metodai gali būti pritaikomi epigenetiniame neinvaziniame prenataliniame testavime, nustatant vaisiaus 21-osios chromosomos trisomiją tikro laiko PGR arba sekoskaitos būdu iš besilaukiančių moterų laisvai cirkuliuojančios neląstelinės kraujo plazmos DNR.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Adam, S., Bräcker, J., Klingel, V., Osteresch, B., Radde, N. E., Brockmeyer, J., et al. (2022). Flanking sequences influence the activity of TET1 and TET2 methylcytosine dioxygenases and affect genomic 5hmC patterns. *Commun. Biol.* 2022 51 5, 1–13. doi:10.1038/s42003-022-03033-4.
- Al Tameemi, W., Dale, T. P., Al-Jumaily, R. M. K., and Forsyth, N. R. (2019). Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 4. doi:10.3389/FCELL.2019.00004/BIBTEX.
- Alberry, M., Maddocks, D., Jones, M., Abdel Hadi, M., Abdel-Fattah, S., Avent, N., et al. (2007). Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat. Diagn.* 27, 415–418. doi:10.1002/PD.1700.
- Amouroux, R., Nashun, B., Shirane, K., Nakagawa, S., Hill, P. W. S., D'Souza, Z., et al. (2016). De novo DNA methylation drives 5hmC accumulation in mouse zygotes. *Nat. Cell Biol.* 2016 182 18, 225–233. doi:10.1038/ncb3296.
- Applebaum, M. A., Barr, E. K., Karpus, J., Nie, J., Zhang, Z., Armstrong, A. E., et al. (2019). 5-Hydroxymethylcytosine Profiles Are Prognostic of Outcome in Neuroblastoma and Reveal Transcriptional Networks That Correlate With Tumor Phenotype. *JCO Precis. Oncol.*, 1–12. doi:10.1200/po.18.00402.
- Applebaum, M. A., Jha, A. R., Kao, C., Hernandez, K. M., DeWane, G., Salwen, H. R., et al. (2016). Integrative genomics reveals hypoxia inducible genes that are associated with a poor prognosis in neuroblastoma patients. *Oncotarget* 7, 76816–76826. doi:10.18632/ONCOTARGET.12713.
- Atashzar, M. R., Baharlou, R., Karami, J., Abdollahi, H., Rezaei, R., Pourramezan, F., et al. (2020). Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *J. Cell. Physiol.* 235, 790–803. doi:10.1002/JCP.29044.
- Bachman, M., Uribe-Lewis, S., Yang, X., Burgess, H. E., Iurlaro, M., Reik, W., et al. (2015). 5-Formylcytosine can be a stable DNA modification in mammals. *Nat. Chem. Biol.* 2015 118 11, 555–557. doi:10.1038/nchembio.1848.
- Bachman, M., Uribe-Lewis, S., Yang, X., Williams, M., Murrell, A., and Balasubramanian, S. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nat. Chem.* 6, 1049–1055. doi:10.1038/nchem.2064.
- Bahmad, H. F., Chamaa, F., Assi, S., Chalhoub, R. M., Abou-Antoun, T., and Abou-Kheir, W. (2019). Cancer stem cells in neuroblastoma: Expanding the therapeutic frontier. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 131. doi:10.3389/FNMOL.2019.00131/BIBTEX.
- Bai, L., Yang, G., Qin, Z., Lyu, J., Wang, Y., Feng, J., et al. (2021). Proteome-Wide Profiling of Readers for DNA Modification. *Adv. Sci.* 8, 2101426. doi:10.1002/ADVS.202101426.
- Bayeva, N., Coll, E., and Piskareva, O. (2021). Differentiating Neuroblastoma: A Systematic Review of the Retinoic Acid, Its Derivatives, and Synergistic

- Interactions. *J. Pers. Med.* 11. doi:10.3390/JPM11030211.
- Baylin, S. B., and Jones, P. A. (2016). Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A019505.
- Beck, D., Ben Maamar, M., and Skinner, M. K. (2022). Genome-wide CpG density and DNA methylation analysis method (MeDIP, RRBS, and WGBS) comparisons. *Epigenetics* 17, 518–530. doi:10.1080/15592294.2021.1924970.
- Becker, J., and Wilting, J. (2019). WNT Signaling in Neuroblastoma. *Cancers (Basel)*. 11. doi:10.3390/CANCERS11071013.
- Bedei, I., Wolter, A., Weber, A., Signore, F., and Axt-Flidner, R. (2021). Chances and Challenges of New Genetic Screening Technologies (NIPT) in Prenatal Medicine from a Clinical Perspective: A Narrative Review. *Genes (Basel)*. 12. doi:10.3390/GENES12040501.
- Berman, B. P., Weisenberger, D. J., Aman, J. F., Hinoue, T., Ramjan, Z., Liu, Y., et al. (2012). Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat. Genet.* 44, 40–46. doi:10.1038/ng.969.
- Bhaskara, V. K., Mohanam, I., Rao, J. S., and Mohanam, S. (2012). Intermittent Hypoxia Regulates Stem-like Characteristics and Differentiation of Neuroblastoma Cells. *PLoS One* 7, e30905. doi:10.1371/journal.pone.0030905.
- Bhattacharyya, S., Pradhan, K., Campbell, N., Mazdo, J., Vasantkumar, A., Maqbool, S., et al. (2017). Altered hydroxymethylation is seen at regulatory regions in pancreatic cancer and regulates oncogenic pathways. *Genome Res.* 27, 1830–1842. doi:10.1101/GR.222794.117/-/DC1.
- Bian, K., Lenz, S. A. P., Tang, Q., Chen, F., Qi, R., Jost, M., et al. (2019). DNA repair enzymes ALKBH2, ALKBH3, and AlkB oxidize 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine in vitro. *Nucleic Acids Res.* 47, 5522–5529. doi:10.1093/NAR/GKZ395.
- Boeva, V., Louis-Brennetot, C., Peltier, A., Durand, S., Pierre-Eugène, C., Raynal, V., et al. (2017). Heterogeneity of neuroblastoma cell identity defined by transcriptional circuitries. *Nat. Genet.* 49, 1408–1413. doi:10.1038/ng.3921.
- Bongaerts, E., Aengenheister, L., Dugershaw, B. B., Manser, P., Roeffaers, M. B. J., Ameloot, M., et al. (2021). Label-free detection of uptake, accumulation, and translocation of diesel exhaust particles in ex vivo perfused human placenta. *J. Nanobiotechnology* 19, 1–13. doi:10.1186/S12951-021-00886-5/FIGURES/5.
- Booth, M. J., Branco, M. R., Ficiz, G., Oxley, D., Krueger, F., Reik, W., et al. (2012). Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Science* 336, 934–7. doi:10.1126/science.1220671.
- Braekvelde, N., Von Stedingk, K., Fransson, S., Martinez-Monleon, A., Lindgren, D., Axelson, H., et al. (2018). Patient-Derived Xenograft Models Reveal Intratumor Heterogeneity and Temporal Stability in Neuroblastoma. *Cancer Res.* 78, 5958–5969. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0527.

- Brinkman, A. B., Nik-Zainal, S., Simmer, F., Rodríguez-González, F. G., Smid, M., Alexandrov, L. B., et al. (2019). Partially methylated domains are hypervariable in breast cancer and fuel widespread CpG island hypermethylation. *Nat. Commun.* 10, 1–10. doi:10.1038/s41467-019-09828-0.
- Brunner, A. L., Johnson, D. S., Si, W. K., Valouev, A., Reddy, T. E., Neff, N. F., et al. (2009). Distinct DNA methylation patterns characterize differentiated human embryonic stem cells and developing human fetal liver. *Genome Res.* 19, 1044. doi:10.1101/GR.088773.108.
- Caldwell, B. A., Liu, M. Y., Prasasya, R. D., Wang, T., DeNizio, J. E., Leu, N. A., et al. (2021). Functionally distinct roles for TET-oxidized 5-methylcytosine bases in somatic reprogramming to pluripotency. *Mol. Cell* 81, 859-869.e8. doi:10.1016/J.MOLCEL.2020.11.045.
- Campos Cogo, S., Gradowski Farias da Costa do Nascimento, T., de Almeida Brehm Pinhatti, F., de França Junior, N., Santos Rodrigues, B., Regina Cavalli, L., et al. (2020). An overview of neuroblastoma cell lineage phenotypes and in vitro models. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 245, 1637–1647. doi:10.1177/1535370220949237.
- Cangelosi, D., Morini, M., Zanardi, N., Sementa, A. R., Muselli, M., Conte, M., et al. (2020). Hypoxia Predicts Poor Prognosis in Neuroblastoma Patients and Associates with Biological Mechanisms Involved in Telomerase Activation and Tumor Microenvironment Reprogramming. *Cancers (Basel)*. 12, 1–45. doi:10.3390/CANCERS12092343.
- Chen, C. C., Wang, K. Y., and Shen, C. K. J. (2012). The mammalian de novo DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases. *J. Biol. Chem.* 287, 33116–33121. doi:10.1074/JBC.C112.406975.
- Chen, S., Zhang, M., Xing, L., Wang, Y., Xiao, Y., and Wu, Y. (2015). HIF-1 α Contributes to Proliferation and Invasiveness of Neuroblastoma Cells via SHH Signaling. *PLoS One* 10. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0121115.
- Chi, Y., Wang, D., Wang, J., Yu, W., and Yang, J. (2019). Long Non-Coding RNA in the Pathogenesis of Cancers. *Cells* 8. doi:10.3390/CELLS8091015.
- Chu, T., Handley, D., Bunce, K., Surti, U., Hogge, W. A., and Peters, D. G. (2011). Structural and Regulatory Characterization of the Placental Epigenome at Its Maternal Interface. *PLoS One* 6, 14723. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0014723.
- Ciccarone, F., Valentini, E., Malavolta, M., Zampieri, M., Bacalini, M. G., Calabrese, R., et al. (2018). DNA Hydroxymethylation Levels Are Altered in Blood Cells From Down Syndrome Persons Enrolled in the MARK-AGE Project. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 73, 737–744. doi:10.1093/GERONA/GLX198.
- Ciccarone, V., Spengler, B., Meyers, M. B., Biedler, J. L., and Ross, R. (1989). Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res* 49, 219–225.

- Cimmino, F., Pezone, L., Avitabile, M., Acierno, G., Andolfo, I., Capasso, M., et al. (2015). Inhibition of hypoxia inducible factors combined with all-trans retinoic acid treatment enhances glial transdifferentiation of neuroblastoma cells. *Sci. Reports* 2015 51 5, 1–15. doi:10.1038/srep11158.
- Cohn, S. L., Pearson, A. D. J., London, W. B., Monclair, T., Ambros, P. F., Brodeur, G. M., et al. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J. Clin. Oncol.* 27, 289–297. doi:10.1200/JCO.2008.16.6785.
- Crawford, D. J., Liu, M. Y., Nabel, C. S., Cao, X. J., Garcia, B. A., and Kohli, R. M. (2016). Tet2 Catalyzes Stepwise 5-Methylcytosine Oxidation by an Iterative and de novo Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 730–733. doi:10.1021/JACS.5B10554.
- Cui, X. L., Nie, J., Ku, J., Dougherty, U., West-Szymanski, D. C., Collin, F., et al. (2020). A human tissue map of 5-hydroxymethylcytosines exhibits tissue specificity through gene and enhancer modulation. *Nat. Commun.* 2020 111 11, 1–11. doi:10.1038/s41467-020-20001-w.
- D’Anna, F., Van Dyck, L., Xiong, J., Zhao, H., Berrens, R. V., Qian, J., et al. (2020). DNA methylation repels binding of hypoxia-inducible transcription factors to maintain tumor immunotolerance. *Genome Biol.* 21, 1–36. doi:10.1186/S13059-020-02087-Z/FIGURES/6.
- Davis, C. A., Hitz, B. C., Sloan, C. A., Chan, E. T., Davidson, J. M., Gabdank, I., et al. (2018). The Encyclopedia of DNA elements (ENCODE): data portal update. *Nucleic Acids Res.* 46, D794–D801. doi:10.1093/nar/gkx1081.
- Decaestecker, B., Louwagie, A., Loontjens, S., Vloed, F. De, Roels, J., Vanhauwaert, S., et al. (2020). SOX11 is a lineage-dependency factor and master epigenetic regulator in neuroblastoma. *bioRxiv*, 2020.08.21.261131. doi:10.1101/2020.08.21.261131.
- Decato, B. E., Qu, J., Ji, X., Wagenblast, E., Knott, S. R. V., Hannon, G. J., et al. (2020). Characterization of universal features of partially methylated domains across tissues and species. *Epigenetics and Chromatin* 13. doi:10.1186/s13072-020-00363-7.
- DeNizio, J. E., Dow, B. J., Serrano, J. C., Ghanty, U., Drohat, A. C., and Kohli, R. M. (2021). TET-TDG Active DNA Demethylation at CpG and Non-CpG Sites. *J. Mol. Biol.* 433. doi:10.1016/J.JMB.2021.166877.
- Dennis Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W. G., et al. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350, 485–487. doi:10.1016/S0140-6736(97)02174-0.
- Dennis Lo, Y. M., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M. Z., and Magnus Hjelm, N. (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 218. doi:10.1086/302205.
- Depuydt, P., Boeva, V., Hocking, T. D., Cannoodt, R., Ambros, I. M., Ambros, P. F., et al. (2018). Genomic Amplifications and Distal 6q Loss: Novel Markers for

- Poor Survival in High-risk Neuroblastoma Patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 110. doi:10.1093/JNCI/DJY022.
- Dheedene, A., Sante, T., De Smet, M., Vanbellin ghen, J. F., Grisart, B., Vergult, S., et al. (2016). Implementation of non-invasive prenatal testing by semiconductor sequencing in a genetic laboratory. *Prenat. Diagn.* 36, 699–707. doi:10.1002/PD.4841.
- Donley, N., and Thayer, M. J. (2013). DNA Replication Timing, Genome Stability and Cancer. *Semin. Cancer Biol.* 23, 80. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2013.01.001.
- Drury, S., Hill, M., and Chitty, L. S. (2016). Cell-Free Fetal DNA Testing for Prenatal Diagnosis. *Adv. Clin. Chem.* 76, 1–35. doi:10.1016/BS.ACC.2016.05.004.
- Du, Y., Wang, Y., Hu, X., Liu, J., and Diao, J. (2020). Single-molecule quantification of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in cancer genome. *View* 1. doi:10.1002/VIW2.9.
- Durinck, K., and Speleman, F. (2018). Epigenetic regulation of neuroblastoma development. *Cell Tissue Res.* 372, 309–324. doi:10.1007/S00441-017-2773-Y.
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., and Yakhini, Z. (2009). GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10, 48. doi:10.1186/1471-2105-10-48.
- Faas, B. H., De Ligt, J., Janssen, I., Eggink, A. J., Wijnberger, L. De, Van Vugt, J. M., et al. (2012). Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using massively parallel sequencing-by-ligation and evidence that cell-free fetal DNA in the maternal plasma originates from cytotrophoblastic cells. *Expert Opin. Biol. Ther.* 12 Suppl 1. doi:10.1517/14712598.2012.670632.
- Fabyanic, E. B., Hu, P., Qiu, Q., Wang, T., Berrios, K. N., Flournoy, J., et al. (2021). Quantitative single cell 5hmC sequencing reveals non-canonical gene regulation by non-CG hydroxymethylation. *bioRxiv*, 2021.03.23.434325. doi:10.1101/2021.03.23.434325.
- Fardin, P., Barla, A., Mosci, S., Rosasco, L., Verri, A., Versteeg, R., et al. (2010). A biology-driven approach identifies the hypoxia gene signature as a predictor of the outcome of neuroblastoma patients. *Mol. Cancer* 9, 1–15. doi:10.1186/1476-4598-9-185/FIGURES/5.
- Farina, A. R., Cappabianca, L. A., Zelli, V., Sebastiano, M., and Mackay, A. R. (2021). Mechanisms involved in selecting and maintaining neuroblastoma cancer stem cell populations, and perspectives for therapeutic targeting. *World J. Stem Cells* 13, 685–736. doi:10.4252/WJSC.V13.I7.685.
- Feng, Y., Chen, J. J., Xie, N. Bin, Ding, J. H., You, X. J., Tao, W. B., et al. (2021). Direct decarboxylation of ten-eleven translocation-produced 5-carboxylcytosine in mammalian genomes forms a new mechanism for active DNA demethylation. *Chem. Sci.* 12, 11322–11329. doi:10.1039/D1SC02161C.
- Fernandez, A. F., Assenov, Y., Martin-Subero, J. I., Balint, B., Siebert, R., Taniguchi,

- H., et al. (2012). A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res.* 22, 407–419. doi:10.1101/GR.119867.110.
- Fetahu, I. S., and Taschner-Mandl, S. (2021). Neuroblastoma and the epigenome. *Cancer Metastasis Rev.* 40, 173–189. doi:10.1007/S10555-020-09946-Y.
- Ficz, G., Branco, M. R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T. A., et al. (2011). Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 473, 398–402. doi:10.1038/nature10008.
- Fieuw, A., Kumps, C., Schramm, A., Pattyn, F., Menten, B., Antonacci, F., et al. (2012). Identification of a novel recurrent 1q42.2-1qter deletion in high risk MYCN single copy 11q deleted neuroblastomas. *Int. J. cancer* 130, 2599–2606. doi:10.1002/IJC.26317.
- Foley, J., Cohn, S. L., Salwen, H. R., Chagnovich, D., Cowan, J., Mason, K. L., et al. (1991). Differential Expression of N-myc in Phenotypically Distinct Subclones of a Human Neuroblastoma Cell Line1. *Cancer Res.* 51, 6338–6345.
- Fonseka, P., Liem, M., Ozcitti, C., Adda, C. G., Ang, C.-S., and Mathivanan, S. (2019). Exosomes from N-Myc amplified neuroblastoma cells induce migration and confer chemoresistance to non-N-Myc amplified cells: implications of intra-tumour heterogeneity. *J. Extracell. Vesicles* 8, 1597614. doi:10.1080/20013078.2019.1597614.
- Frankish, A., Diekhans, M., Ferreira, A.-M., Johnson, R., Jungreis, I., Loveland, J., et al. (2019). GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. *Nucleic Acids Res.* 47, D766–D773. doi:10.1093/nar/gky955.
- Fransson, S., Martinez-Monleon, A., Johansson, M., Sjöberg, R. M., Björklund, C., Ljungman, G., et al. (2020). Whole-genome sequencing of recurrent neuroblastoma reveals somatic mutations that affect key players in cancer progression and telomere maintenance. *Sci. Reports 2020 101* 10, 1–14. doi:10.1038/s41598-020-78370-7.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., et al. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 1827–1831. doi:10.1073/PNAS.89.5.1827.
- Gao, F., Xia, Y., Wang, J., Luo, H., Gao, Z., Han, X., et al. (2013). Integrated detection of both 5-mC and 5-hmC by high-throughput tag sequencing technology highlights methylation reprogramming of bivalent genes during cellular differentiation. *Epigenetics* 8. doi:10.4161/EPI.24280.
- Gao, T., He, B., Liu, S., Zhu, H., Tan, K., and Qian, J. (2016). EnhancerAtlas: a resource for enhancer annotation and analysis in 105 human cell/tissue types. *Bioinformatics* 32, btw495. doi:10.1093/bioinformatics/btw495.
- Gartlgruber, M., Sharma, A. K., Quintero, A., Dreidax, D., Jansky, S., Park, Y. G., et al. (2021). Super enhancers define regulatory subtypes and cell identity in neuroblastoma. *Nat. Cancer* 2, 114–128. doi:10.1038/s43018-020-00145-w.
- Gautier, M., Thirant, C., Delattre, O., and Janoueix-Lerosey, I. (2021). Plasticity in

- Neuroblastoma Cell Identity Defines a Noradrenergic-to-Mesenchymal Transition (NMT). *Cancers (Basel)*. 13. doi:10.3390/CANCERS13122904.
- Gelfman, S., Cohen, N., Yearim, A., and Ast, G. (2013). DNA-methylation effect on cotranscriptional splicing is dependent on GC architecture of the exon-intron structure. *Genome Res.* 23, 789–799. doi:10.1101/GR.143503.112.
- George, R. E., Sanda, T., Hanna, M., Fröhling, S., Li, W. L., Zhang, J., et al. (2008). Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma HHS Public Access. *Nature* 455, 975–978. doi:10.1038/nature07397.
- George, S. L., Parmar, V., Lorenzi, F., Marshall, L. V., Jamin, Y., Poon, E., et al. (2020). Novel therapeutic strategies targeting telomere maintenance mechanisms in high-risk neuroblastoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 39. doi:10.1186/S13046-020-01582-2.
- Ghosh, P., and Saadat, A. (2021). Neurodegeneration and epigenetics: A review. *Neurologia*. doi:10.1016/J.NRL.2021.01.016.
- Globisch, D., Münzel, M., Müller, M., Michalakakis, S., Wagner, M., Koch, S., et al. (2010). Tissue Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine and Search for Active Demethylation Intermediates. *PLoS One* 5, e15367. doi:10.1371/journal.pone.0015367.
- Goldschneider, D., Horvilleur, E., Plassa, L. F., Guillaud-Bataille, M., Million, K., Wittmer-Dupret, E., et al. (2006). Expression of C-terminal deleted p53 isoforms in neuroblastoma. *Nucleic Acids Res.* 34, 5603. doi:10.1093/NAR/GKL619.
- Goldwaser, T., and Klugman, S. (2018). Cell-free DNA for the detection of fetal aneuploidy. *Fertil. Steril.* 109, 195–200. doi:10.1016/J.FERTNSTERT.2017.12.019.
- Gómez, S., Castellano, G., Mayol, G., Suñol, M., Queiros, A., Bibikova, M., et al. (2015). DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights. *Epigenomics* 7, 1137–1153. doi:10.2217/EPI.15.49.
- Greenberg, M. V. C., and Bourc'his, D. (2019). The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019 2010 20, 590–607. doi:10.1038/s41580-019-0159-6.
- Gull, N., Jones, M. R., Peng, P. C., Coetzee, S. G., Silva, T. C., Plummer, J. T., et al. (2022). DNA methylation and transcriptomic features are preserved throughout disease recurrence and chemoresistance in high grade serous ovarian cancers. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 41, 1–18. doi:10.1186/S13046-022-02440-Z/FIGURES/5.
- Guo, S., Diep, D., Plongthongkum, N., Fung, H. L., Zhang, K., and Zhang, K. (2017). Identification of methylation haplotype blocks aids in deconvolution of heterogeneous tissue samples and tumor tissue-of-origin mapping from plasma DNA. *Nat. Genet.* 2017 49 49, 635–642. doi:10.1038/ng.3805.
- Haggerty, C., Kretzmer, H., Riemenschneider, C., Kumar, A. S., Mattei, A. L., Bailly, N., et al. (2021). Dnmt1 has de novo activity targeted to transposable elements.

- Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021 287 28, 594–603. doi:10.1038/s41594-021-00603-8.
- Halakos, E. G., Connell, A. J., Glazewski, L., Wei, S., and Mason, R. W. (2019). Bottom up proteomics reveals novel differentiation proteins in neuroblastoma cells treated with 13-cis retinoic acid. *J. Proteomics* 209. doi:10.1016/J.JPROT.2019.103491.
- Han, D., Lu, X., Shih, A. H., Nie, J., You, Q., Xu, M. M., et al. (2016). A Highly Sensitive and Robust Method for Genome-wide 5hmC Profiling of Rare Cell Populations. *Mol. Cell* 63, 711–719. doi:10.1016/j.molcel.2016.06.028.
- Hanna, C. W., Peñaherrera, M. S., Saadeh, H., Andrews, S., McFadden, D. E., Kelsey, G., et al. (2016). Pervasive polymorphic imprinted methylation in the human placenta. *Genome Res.* 26, 756–767. doi:10.1101/GR.196139.115/-/DC1.
- Hatt, L., Aagaard, M. M., Graakjaer, J., Bach, C., Sommer, S., Agerholm, I. E., et al. (2015). Microarray-Based Analysis of Methylation Status of CpGs in Placental DNA and Maternal Blood DNA--Potential New Epigenetic Biomarkers for Cell Free Fetal DNA-Based Diagnosis. *PLoS One* 10. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0128918.
- Hattori, N., Asada, K., Miyajima, N., Mori, A., Nakanishi, Y., Kimura, K., et al. (2021). Combination of a synthetic retinoid and a DNA demethylating agent induced differentiation of neuroblastoma through retinoic acid signal reprogramming. *Br. J. Cancer* 2021 12512 125, 1647–1656. doi:10.1038/s41416-021-01571-y.
- He, B., Zhang, C., Zhang, X., Fan, Y., Zeng, H., Liu, J., et al. (2021a). Tissue-specific 5-hydroxymethylcytosine landscape of the human genome. *Nat. Commun.* 2021 121 12, 1–12. doi:10.1038/s41467-021-24425-w.
- He, P., Lei, J., Zou, L. X., Zhou, G. Z., Peng, L., Deng, Q., et al. (2021b). Effects of hypoxia on DNA hydroxymethylase Tet methylcytosine dioxygenase 2 in a KG-1 human acute myeloid leukemia cell line and its mechanism. *Oncol. Lett.* 22. doi:10.3892/OL.2021.12953.
- He, Y. F., Li, B. Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., et al. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333, 1303–1307. doi:10.1126/SCIENCE.1210944.
- Henrich, K. O., Bender, S., Saadati, M., Dreidax, D., Gartlgruber, M., Shao, C., et al. (2016). Integrative Genome-Scale Analysis Identifies Epigenetic Mechanisms of Transcriptional Deregulation in Unfavorable Neuroblastomas. *Cancer Res.* 76, 5523–5537. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2507.
- Herrmann, A., Rice, M., Lévy, R., Pizer, B. L., Losty, P. D., Moss, D., et al. (2015). Cellular memory of hypoxia elicits neuroblastoma metastasis and enables invasion by non-aggressive neighbouring cells. *Oncogenesis* 4. doi:10.1038/ONCSIS.2014.52.
- Higashi, M., Kolla, V., Iyer, R., Naraparaju, K., Zhuang, T., Kolla, S., et al. (2015). Retinoic acid-induced CHD5 upregulation and neuronal differentiation of

- neuroblastoma. *Mol. Cancer* 14. doi:10.1186/S12943-015-0425-Y.
- Hofer, A., Liu, Z. J., and Balasubramanian, S. (2019). Detection, Structure and Function of Modified DNA Bases. *J. Am. Chem. Soc.* 141, 6420–6429. doi:10.1021/JACS.9B01915/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JA-2019-019152_0007.GIF.
- Holmquist-Mengelbier, L., Fredlund, E., Löfstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., et al. (2006). Recruitment of HIF-1 α and HIF-2 α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 10, 413–23. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.026.
- Hu, L., Li, Z., Cheng, J., Rao, Q., Gong, W., Liu, M., et al. (2013). Crystal structure of TET2-DNA complex: insight into TET-mediated 5mC oxidation. *Cell* 155, 1545–1555. doi:10.1016/J.CELL.2013.11.020.
- Hu, L., Liu, Y., Han, S., Yang, L., Cui, X., Gao, Y., et al. (2019). Jump-seq: Genome-Wide Capture and Amplification of 5-Hydroxymethylcytosine Sites. *J. Am. Chem. Soc.* 141, 8694–8697. doi:10.1021/jacs.9b02512.
- Hu, L., Lu, J., Cheng, J., Rao, Q., Li, Z., Hou, H., et al. (2015). Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation. *Nat.* 2015 5277576 527, 118–122. doi:10.1038/nature15713.
- Huang, R., Cheung, N. V., Vider, J., Cheung, I. Y., Gerald, W. L., Tickoo, S. K., et al. (2011). MYCN and MYC regulate tumor proliferation and tumorigenesis directly through BMI1 in human neuroblastomas. *FASEB J.* 25, 4138–4149. doi:10.1096/FJ.11-185033.
- Huang, Y., Chavez, L., Chang, X., Wang, X., Pastor, W. A., Kang, J., et al. (2014). Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet2 in mouse embryonic stem cells. *PNAS* 111, 1361–1366. doi:10.1073/PNAS.1322921111.
- Huang, Y., Pastor, W. A., Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D. R., and Rao, A. (2010). The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS One* 5. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0008888.
- Huang, Y., Tsubota, S., Nishio, N., Takahashi, Y., and Kadomatsu, K. (2021). Combination of tumor necrosis factor- α and epidermal growth factor induces the adrenergic-to-mesenchymal transdifferentiation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Cancer Sci.* 112, 715–724. doi:10.1111/CAS.14760.
- Huertas-Castaño, C., Gómez-Muñoz, M. A., Pardal, R., and Vega, F. M. (2020). Hypoxia in the Initiation and Progression of Neuroblastoma Tumours. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, Vol. 21, Page 39 21, 39. doi:10.3390/IJMS21010039.
- Hui, L., and Bianchi, D. W. (2017). Noninvasive Prenatal DNA Testing: The Vanguard of Genomic Medicine. *Annu. Rev. Med.* 68, 459–472. doi:10.1146/ANNUREV-MED-072115-033220.
- Imai, Y., Biot, M., Clément, J. A. J., Teragaki, M., Urbach, S., Robert, T., et al. (2020). PRDM9 activity depends on HELLS and promotes local 5-hydroxymethylcytosine enrichment. *Elife* 9, 1–33. doi:10.7554/ELIFE.57117.

- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., et al. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333, 1300–1303. doi:10.1126/SCIENCE.1210597.
- Iwan, K., Rahimoff, R., Kirchner, A., Spada, F., Schröder, A. S., Kosmatchev, O., et al. (2018). 5-Formylcytosine to cytosine conversion by C-C bond cleavage in vivo. *Nat. Chem. Biol.* 14, 72–78. doi:10.1038/NCHEMBIO.2531.
- Jain, D., Meydan, C., Lange, J., Claeys Bouuaert, C., Mason, C. E., Anderson, K. V., et al. (2017). rahu is a mutant allele of Dnmt3c, encoding a DNA methyltransferase homolog required for meiosis and transposon repression in the mouse male germline. *PLoS Genet.* 13. doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1006964.
- Jansky, S., Sharma, A. K., Körber, V., Quintero, A., Toprak, U. H., Wecht, E. M., et al. (2021). Single-cell transcriptomic analyses provide insights into the developmental origins of neuroblastoma. *Nat. Genet.* 2021 535 53, 683–693. doi:10.1038/s41588-021-00806-1.
- Jensen, T. J., Kim, S. K., Zhu, Z., Chin, C., Gebhard, C., Lu, T., et al. (2015). Whole genome bisulfite sequencing of cell-free DNA and its cellular contributors uncovers placenta hypomethylated domains. *Genome Biol.* 16. doi:10.1186/s13059-015-0645-x.
- Ji, S., Shao, H., Han, Q., Seiler, C. L., and Tretyakova, N. Y. (2017). Reversible DNA-Protein Cross-Linking at Epigenetic DNA Marks. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 56, 14130–14134. doi:10.1002/ANIE.201708286.
- Ji, Y., Hao, H., Reynolds, K., McMahon, M., and Zhou, C. J. (2019). Wnt Signaling in Neural Crest Ontogenesis and Oncogenesis. *Cells* 8. doi:10.3390/cells8101173.
- Jiang, P., and Lo, Y. M. D. (2016). The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet.* 32, 360–371. doi:10.1016/J.TIG.2016.03.009.
- Jögi, A., Øra, I., Nilsson, H., Lindeheim, A., Makino, Y., Poellinger, L., et al. (2002). Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7021–6. doi:10.1073/pnas.102660199.
- Jögi, A., Vallon-Christersson, J., Holmquist, L., Axelson, H., Borg, Å., and Pählman, S. (2004). Human neuroblastoma cells exposed to hypoxia: induction of genes associated with growth, survival, and aggressive behavior. *Exp. Cell Res.* 295, 469–487. doi:10.1016/j.yexcr.2004.01.013.
- Johansson, G., Andersson, D., Filges, S., Li, J., Muth, A., Godfrey, T. E., et al. (2019). Considerations and quality controls when analyzing cell-free tumor DNA. *Biomol. Detect. Quantif.* 17. doi:10.1016/J.BDQ.2018.12.003.
- Johnsen, J. I., Dyberg, C., and Wickström, M. (2019). Neuroblastoma—A neural crest derived embryonal malignancy. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 9. doi:10.3389/fnmol.2019.00009.

- Josse, J., and Kornberg, A. (1962). Glucosylation of Deoxyribonucleic Acid: III. α - AND β -GLUCOSYL TRANSFERASES FROM T4-INFECTED ESCHERICHIA COLI. *J. Biol. Chem.* 237, 1968–1976. doi:10.1016/S0021-9258(19)73968-4.
- Jurkowska, R. Z., Jurkowski, T. P., and Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem* 12, 206–222. doi:10.1002/CBIC.201000195.
- Kafer, G. R., Li, X., Horii, T., Suetake, I., Tajima, S., Hatada, I., et al. (2016). 5-Hydroxymethylcytosine Marks Sites of DNA Damage and Promotes Genome Stability. *Cell Rep.* 14, 1283–1292. doi:10.1016/J.CELREP.2016.01.035.
- Kameneva, P., Artemov, A. V., Kastriti, M. E., Faure, L., Olsen, T. K., Otte, J., et al. (2021). Single-cell transcriptomics of human embryos identifies multiple sympathoblast lineages with potential implications for neuroblastoma origin. *Nat. Genet.* 2021 535 53, 694–706. doi:10.1038/s41588-021-00818-x.
- Kharat, S., Ding, X., Swaminathan, D., Suresh, A., Singh, M., Sengodan, S., et al. (2020). Degradation of 5hmC-marked stalled replication forks by APE1 causes genomic instability. *Sci. Signal.* 13. doi:10.1126/SCISIGNAL.ABA8091.
- Khare, T., Pai, S., Koncevicius, K., Pal, M., Kriukiene, E., Liutkeviciute, Z., et al. (2012). 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1037–43. doi:10.1038/nsmb.2372.
- Kim, S. T., Lee, Y. J., Tasaki, T., Hwang, J., Kang, M. J., Yi, E. C., et al. (2018). The N-recognin UBR4 of the N-end rule pathway is required for neurogenesis and homeostasis of cell surface proteins. *PLoS One* 13. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0202260.
- Kimura, S., Sekiguchi, M., Watanabe, K., Hiwatarai, M., Seki, M., Yoshida, K., et al. (2021). Association of high-risk neuroblastoma classification based on expression profiles with differentiation and metabolism. *PLoS One* 16. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0245526.
- Kinde, B., Gabel, H. W., Gilbert, C. S., Griffith, E. C., and Greenberg, M. E. (2015). Reading the unique DNA methylation landscape of the brain: Non-CpG methylation, hydroxymethylation, and MeCP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 6800–6806. doi:10.1073/PNAS.1411269112.
- Kinde, B., Wu, D. Y., Greenberg, M. E., and Gabel, H. W. (2016). DNA methylation in the gene body influences MeCP2-mediated gene repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 15114–15119. doi:10.1073/PNAS.1618737114.
- Kinney, S. M., Chin, H. G., Vaisvila, R., Bitinaite, J., Zheng, Y., Estève, P. O., et al. (2011). Tissue-specific distribution and dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in mammalian genomes. *J. Biol. Chem.* 286, 24685–24693. doi:10.1074/JBC.M110.217083.
- Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A. M., Pape, U. J., Tahiliani, M., Bandukwala, H. S., et al. (2010). Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers

- with mutant TET2. *Nature* 468, 839–843. doi:10.1038/NATURE09586.
- Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324, 929–930. doi:10.1126/SCIENCE.1169786.
- Kriukienė, E., Labrie, V., Khare, T., Urbanavičiūtė, G., Lapinaitė, A., Koncevičius, K., et al. (2013). DNA unmethylome profiling by covalent capture of CpG sites. *Nat. Commun.* 4, 2190. doi:10.1038/ncomms3190.
- Kriukienė, E., Liutkevičiūtė, Z., and Klimašauskas, S. (2012). 5-Hydroxymethylcytosine – the elusive epigenetic mark in mammalian DNA. *Chem. Soc. Rev.* 41, 6916–6930. doi:10.1039/c2cs35104h.
- Kyriakopoulos, C., Nordström, K., Kramer, P. L., Gottfreund, J. Y., Salhab, A., Arand, J., et al. (2022). A comprehensive approach for genome-wide efficiency profiling of DNA modifying enzymes. *Cell reports methods* 2. doi:10.1016/J.CRMETH.2022.100187.
- Laukka, T., Mariani, C. J., Ihtola, T., Cao, J. Z., Hokkanen, J., Kaelin, W. G., et al. (2016). Fumarate and Succinate Regulate Expression of Hypoxia-inducible Genes via TET Enzymes. *J. Biol. Chem.* 291, 4256–4265. doi:10.1074/JBC.M115.688762.
- Lee, D. E., Lim, J. H., Kim, M. H., Park, S. Y., and Ryu, H. M. (2016). Novel Epigenetic Markers on Chromosome 21 for Noninvasive Prenatal Testing of Fetal Trisomy 21. *J. Mol. Diagnostics* 18, 378–387. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.12.002.
- Lentini, A., Lagerwall, C., Vikingsson, S., Mjoseng, H. K., Douvlataniotis, K., Vogt, H., et al. (2018). A reassessment of DNA-immunoprecipitation-based genomic profiling. *Nat. Methods* 2018 157 15, 499–504. doi:10.1038/s41592-018-0038-7.
- Li, J., Wang, Y., Li, L., Or, P. M. Y., Wai Wong, C., Liu, T., et al. (2021a). Tumour-derived substrate-adherent cells promote neuroblastoma survival through secreted trophic factors. *Mol. Oncol.* doi:10.1002/1878-0261.12969.
- Li, L., Gao, Y., Wu, Q., Cheng, A. S. L., and Yip, K. Y. (2019). New guidelines for DNA methylome studies regarding 5-hydroxymethylcytosine for understanding transcriptional regulation. *Genome Res.* 29, 543–553. doi:10.1101/GR.240036.118.
- Li, W., Zhang, X., Lu, X., You, L., Song, Y., Luo, Z., et al. (2017). 5-Hydroxymethylcytosine signatures in circulating cell-free DNA as diagnostic biomarkers for human cancers. *Cell Res.* 27, 1243–1257. doi:10.1038/cr.2017.121.
- Li, X., Shi, X., Gong, Y., Guo, W., Liu, Y., Peng, C., et al. (2021b). Selective Chemical Labeling and Sequencing of 5-Hydroxymethylcytosine in DNA at Single-Base Resolution. *Front. Genet.* 12, 2089. doi:10.3389/FGENE.2021.749211/BIBTEX.
- Liang, J., Yang, F., Zhao, L., Bi, C., and Cai, B. (2016). Physiological and

- pathological implications of 5-hydroxymethylcytosine in diseases. *Oncotarget* 7, 48813–48831. doi:10.18632/ONCOTARGET.9281.
- Liang, J., Zhang, K., Yang, J., Li, X., Li, Q., Wang, Y., et al. (2021). A new approach to decode DNA methylome and genomic variants simultaneously from double strand bisulfite sequencing. *Brief. Bioinform.* 22. doi:10.1093/BIB/BBAB201.
- Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdóttir, H., Ghandi, M., Mesirov, J. P., and Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Syst.* 1, 417–425. doi:10.1016/J.CELS.2015.12.004.
- Lio, C.-W. J., Yue, X., Lo´pez, I. F., Lo´pez-Moyado, L., Tahiliani, M., Aravind, L., et al. (2020). TET methylcytosine oxidases: new insights from a decade of research. *J Biosci* 45. doi:10.1007/s12038-019-9973-4.
- Lister, R., Mukamel, E. A., Nery, J. R., Urich, M., Puddifoot, C. A., Johnson, N. D., et al. (2013). Global Epigenomic Reconfiguration During Mammalian Brain Development. *Science* (80-.). 341, 1237905–1237905. doi:10.1126/science.1237905.
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., et al. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315–322. doi:10.1038/nature08514.
- Liu, C., Cui, X., Zhao, B. S., Narkhede, P., Gao, Y., Liu, J., et al. (2020a). DNA 5-Methylcytosine-Specific Amplification and Sequencing. *J. Am. Chem. Soc.* 142, 4539–4543. doi:10.1021/JACS.9B12707/SUPPL_FILE/JA9B12707_SI_001.PDF.
- Liu, X., Ren, J., Luo, N., Guo, H., Zheng, Y., Li, J., et al. (2019a). Comprehensive DNA methylation analysis of tissue of origin of plasma cell-free DNA by methylated CpG tandem amplification and sequencing (MCTA-Seq). *Clin. Epigenetics* 11, 1–13. doi:10.1186/S13148-019-0689-Y/FIGURES/7.
- Liu, X., Xu, B., Yang, J., He, L., Zhang, Z., Cheng, X., et al. (2021a). UHRF2 commissions the completion of DNA demethylation through allosteric activation by 5hmC and K33-linked ubiquitination of XRCC1. *Mol. Cell* 81, 2960-2974.e7. doi:10.1016/J.MOLCEL.2021.05.022.
- Liu, Y., Cheng, J., Siejka-Zielińska, P., Weldon, C., Roberts, H., Lopopolo, M., et al. (2020b). Accurate targeted long-read DNA methylation and hydroxymethylation sequencing with TAPS. *Genome Biol.* 21, 1–9. doi:10.1186/S13059-020-01969-6/FIGURES/2.
- Liu, Y., Hu, Z., Cheng, J., Siejka-Zielińska, P., Chen, J., Inoue, M., et al. (2021b). Subtraction-free and bisulfite-free specific sequencing of 5-methylcytosine and its oxidized derivatives at base resolution. *Nat. Commun.* 2021 121 12, 1–8. doi:10.1038/s41467-021-20920-2.
- Liu, Y., Rosikiewicz, W., Pan, Z., Jillette, N., Wang, P., Taghbalout, A., et al. (2021c). DNA methylation-calling tools for Oxford Nanopore sequencing: a survey and human epigenome-wide evaluation. *Genome Biol.* 22, 1–33. doi:10.1186/S13059-021-02510-Z/FIGURES/8.

- Liu, Y., Siejka-Zielińska, P., Velikova, G., Bi, Y., Yuan, F., Tomkova, M., et al. (2019b). Bisulfite-free direct detection of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at base resolution. *Nat. Biotechnol.* 2019 374 37, 424–429. doi:10.1038/s41587-019-0041-2.
- Liutkevičiūtė, Z., Kriukienė, E., Grigaitytė, I., Masevičius, V., and Klimašauskas, S. (2011). Methyltransferase-Directed Derivatization of 5-Hydroxymethylcytosine in DNA. *Angew. Chemie Int. Ed.* 50, 2090–2093. doi:10.1002/anie.201007169.
- Liutkevičiūtė, Z., Kriukienė, E., Ličytė, J., Rudytė, M., Urbanavičiūtė, G., and Klimašauskas, S. (2014). Direct decarboxylation of 5-Carboxylcytosine by DNA C5- Methyltransferases. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 5884–5887. doi:10.1021/JA5019223/SUPPL_FILE/JA5019223_SI_001.PDF.
- Liutkevičiūtė, Z., Lukinavičius, G., Masevičius, V., Daujotytė, D., and Klimašauskas, S. (2009). Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA. *Nat. Chem. Biol.* 5, 400–402. doi:10.1038/nchembio.172.
- Lo, Y. M. D., Chan, K. C. A., Sun, H., Chen, E. Z., Jiang, P., Lun, F. M. F., et al. (2010). Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci. Transl. Med.* 2. doi:10.1126/SCITRANSLMED.3001720.
- Lu, X., Han, D., Zhao, B. S., Song, C. X., Zhang, L. S., Doré, L. C., et al. (2015). Base-resolution maps of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine reveal genome-wide DNA demethylation dynamics. *Cell Res.* 2015 253 25, 386–389. doi:10.1038/cr.2015.5.
- Lun, F. M. F., Chiu, R. W. K., Sun, K., Leung, T. Y., Jiang, P., Chan, K. C. A., et al. (2013). Noninvasive prenatal methylomic analysis by genomewide bisulfite sequencing of maternal plasma DNA. *Clin. Chem.* 59, 1583–1594. doi:10.1373/clinchem.2013.212274.
- Luo, C., Hajkova, P., and Ecker, J. R. (2018). Dynamic DNA methylation: in the right place at the right time. *Science* 361, 1336. doi:10.1126/SCIENCE.AAT6806.
- Luo, C., Keown, C. L., Kurihara, L., Zhou, J., He, Y., Li, J., et al. (2017). Single-cell methylomes identify neuronal subtypes and regulatory elements in mammalian cortex. *Science* 357, 600–604. doi:10.1126/SCIENCE.AAN3351.
- Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat. Rev. Genet.* 19, 81–92. doi:10.1038/nrg.2017.80.
- Mai, C. T., Isenburg, J. L., Canfield, M. A., Meyer, R. E., Correa, A., Alverson, C. J., et al. (2019). National population-based estimates for major birth defects, 2010–2014. *Birth defects Res.* 111, 1420–1435. doi:10.1002/BDR2.1589.
- Margalit, S., Avraham, S., Shahal, T., Michaeli, Y., Gilat, N., Magod, P., et al. (2020). 5-Hydroxymethylcytosine as a clinical biomarker: Fluorescence-based assay for high-throughput epigenetic quantification in human tissues. *Int. J. cancer* 146, 115–122. doi:10.1002/IJC.32519.
- Mariani, C. J., Vasanthakumar, A., Madzo, J., Yesilkamal, A., Bhagat, T., Yu, Y., et

- al. (2014). TET1-Mediated Hydroxymethylation Facilitates Hypoxic Gene Induction in Neuroblastoma. *Cell Rep.* 7, 1343–1352. doi:10.1016/j.celrep.2014.04.040.
- Masuzaki, H., Miura, K., Yoshiura, K. I., Yoshimura, S., Niikawa, N., and Ishimaru, T. (2004). Detection of cell free placental DNA in maternal plasma: direct evidence from three cases of confined placental mosaicism. *J. Med. Genet.* 41, 289–292. doi:10.1136/JMG.2003.015784.
- Matthay, K. K., Maris, J. M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C. L., Diller, L., et al. (2016). Neuroblastoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2016 21 2, 1–21. doi:10.1038/nrdp.2016.78.
- Matuleviciute, R., Cunha, P. P., Johnson, R. S., and Foskolou, I. P. (2021). Oxygen regulation of TET enzymes. *FEBS J.* 288, 7143–7161. doi:10.1111/FEBS.15695.
- McGuire, M. H., Herbrich, S. M., Dasari, S. K., Wu, S. Y., Wang, Y., Rupaimoole, R., et al. (2019). Pan-cancer genomic analysis links 3'UTR DNA methylation with increased gene expression in T cells. *EBioMedicine* 43, 127–137. doi:10.1016/J.EBIOM.2019.04.045.
- McKeown, S. R. (2014). Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br. J. Radiol.* 87. doi:10.1259/BJR.20130676.
- Mead, T. J., and Yutzey, K. E. (2012). Notch pathway regulation of neural crest cell development in vivo. *Dev. Dyn.* 241, 376–389. doi:10.1002/dvdy.23717.
- Mellén, M., Ayata, P., and Heintz, N. (2017). 5-Hydroxymethylcytosine accumulation in postmitotic neurons results in functional demethylation of expressed genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E7812–E7821. doi:10.1073/PNAS.1708044114/SUPPL_FILE/PNAS.1708044114.SD03.XLS X.
- Moss, J., Magenheimer, J., Neiman, D., Zemmour, H., Loyfer, N., Korach, A., et al. (2018). Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat. Commun.* 2018 91 9, 1–12. doi:10.1038/s41467-018-07466-6.
- Mujezinovic, F., and Alfirevic, Z. (2007). Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet. Gynecol.* 110, 687–694. doi:10.1097/01.AOG.0000278820.54029.E3.
- Nair, S. S., Coolen, M. W., Stirzaker, C., Song, J. Z., Statham, A. L., Strbenac, D., et al. (2011). Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein capture for genome-wide DNA methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias. *Epigenetics* 6, 34–44. doi:10.4161/EPI.6.1.13313.
- Nemajerova, A., and Moll, U. M. (2019). Tissue-specific roles of p73 in development and homeostasis. *J. Cell Sci.* 132. doi:10.1242/JCS.233338.
- Nestor, C. E., Ottaviano, R., Reddington, J., Sproul, D., Reinhardt, D., Dunican, D.,

- et al. (2012). Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res.* 22, 467–477. doi:10.1101/gr.126417.111.
- Oh, L., Hafsi, H., Hainaut, P., and Ariffin, H. (2019). p53, stem cell biology and childhood blastomas. *Curr. Opin. Oncol.* 31, 84–91. doi:10.1097/CCO.0000000000000504.
- Olsson, M., Beck, S., Kogner, P., Martinsson, T., and Carén, H. (2016). Genome-wide methylation profiling identifies novel methylated genes in neuroblastoma tumors. *Epigenetics* 11, 74–84. doi:10.1080/15592294.2016.1138195.
- Otte, J., Dyberg, C., Pepich, A., and Johnsen, J. I. (2021). MYCN Function in Neuroblastoma Development. *Front. Oncol.* 10, 3210. doi:10.3389/FONC.2020.624079/BIBTEX.
- Papageorgiou, E. A., Karagrigoriou, A., Tsaliki, E., Velissariou, V., Carter, N. P., and Patsalis, P. C. (2011). Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat. Med.* 17, 510–513. doi:10.1038/nm.2312.
- Papageorgiou, E. A., Koumbaris, G., Kypri, E., Hadjidaniel, M., and Patsalis, P. C. (2014). The Epigenome View: An Effort towards Non-Invasive Prenatal Diagnosis. *Genes (Basel)*. 5, 310–329. doi:10.3390/GENES5020310.
- Pedini, P., Graiet, H., Laget, L., Filosa, L., Chatron, J., Cherouat, N., et al. (2021). Qualitative and quantitative comparison of cell-free DNA and cell-free fetal DNA isolation by four (semi-)automated extraction methods: impact in two clinical applications: chimerism quantification and noninvasive prenatal diagnosis. *J. Transl. Med.* 19. doi:10.1186/S12967-020-02671-8.
- Perkovic, M. N., Paska, A. V., Konjevod, M., Kouter, K., Strac, D. S., Erjavec, G. N., et al. (2021). Epigenetics of Alzheimer's Disease. *Biomolecules* 11, 1–40. doi:10.3390/BIOM11020195.
- Pfaffeneder, T., Hackner, B., Truß, M., Münzel, M., Müller, M., Deiml, C. A., et al. (2011). The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50, 7008–7012. doi:10.1002/ANIE.201103899.
- Pfeifer, G. P., Szabó, P. E., and Song, J. (2020). Protein Interactions at Oxidized 5-Methylcytosine Bases. *J. Mol. Biol.* 432, 1718–1730. doi:10.1016/J.JMB.2019.07.039.
- Piskareva, O., Harvey, H., Nolan, J., Conlon, R., Alcock, L., Buckley, P., et al. (2015). The development of cisplatin resistance in neuroblastoma is accompanied by epithelial to mesenchymal transition in vitro. *Cancer Lett.* 364, 142–155. doi:10.1016/j.canlet.2015.05.004.
- Poon, L. L. M., Leung, T. N., Lau, T. K., Chow, K. C. K., and Lo, Y. M. D. (2002). Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 48, 35–41. doi:10.1093/CLINCHEM/48.1.35.
- Prasad, P., Mittal, S. A., Chongtham, J., Mohanty, S., and Srivastava, T. (2017).

Hypoxia-Mediated Epigenetic Regulation of Stemness in Brain Tumor Cells. *Stem Cells* 35, 1468–1478. doi:10.1002/STEM.2621.

- Prikrylova, T., Robertson, J., Ferrucci, F., Konorska, D., Aanes, H., Manaf, A., et al. (2019). 5-hydroxymethylcytosine Marks Mammalian Origins Acting as a Barrier to Replication. *Sci. Reports* 2019 91 9, 1–16. doi:10.1038/s41598-019-47528-3.
- Qi, Q. G., Tuo, Y., Liu, L. X., Yu, C. X., and Wu, A. N. (2021). Amniocentesis and Next Generation Sequencing (NGS)-Based Noninvasive Prenatal DNA Testing (NIPT) for Prenatal Diagnosis of Fetal Chromosomal Disorders. *Int. J. Gen. Med.* 14, 1811–1817. doi:10.2147/IJGM.S297585.
- Qin, W., Wolf, P., Liu, N., Link, S., Smets, M., Mastra, F. La, et al. (2015). DNA methylation requires a DNMT1 ubiquitin interacting motif (UIM) and histone ubiquitination. *Cell Res.* 2015 258 25, 911–929. doi:10.1038/cr.2015.72.
- Qiu, B., and Matthay, K. K. (2022). Advancing therapy for neuroblastoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2022 198 19, 515–533. doi:10.1038/s41571-022-00643-z.
- Raiber, E. A., Murat, P., Chirgadze, D. Y., Beraldi, D., Luisi, B. F., and Balasubramanian, S. (2015). 5-Formylcytosine alters the structure of the DNA double helix. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 44–49. doi:10.1038/NSMB.2936.
- Raiber, E. A., Portella, G., Martínez Cuesta, S., Hardisty, R., Murat, P., Li, Z., et al. (2018). 5-Formylcytosine organizes nucleosomes and forms Schiff base interactions with histones in mouse embryonic stem cells. *Nat. Chem.* 2018 1012 10, 1258–1266. doi:10.1038/s41557-018-0149-x.
- Raman, L., Dheedene, A., De Smet, M., Van Dorpe, J., and Menten, B. (2019). WisecondorX: improved copy number detection for routine shallow whole-genome sequencing. *Nucleic Acids Res.* 47, 1605–1614. doi:10.1093/NAR/GKY1263.
- Ramírez Moreno, M., and Bulgakova, N. A. (2022). The Cross-Talk Between EGFR and E-Cadherin. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 3968. doi:10.3389/FCCELL.2021.828673/BIBTEX.
- Rava, R. P., Srinivasan, A., Sehnert, A. J., and Bianchi, D. W. (2014). Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin. Chem.* 60, 243–250. doi:10.1373/CLINCHEM.2013.207951.
- Rodríguez López, C. M., Lloyd, A. J., Leonard, K., and Wilkinson, M. J. (2012). Differential effect of three base modifications on DNA thermostability revealed by high resolution melting. *Anal. Chem.* 84, 7336–7342. doi:10.1021/AC301459X.
- Ross, R. A., Biedler, J. L., and Spengler, B. A. (2003). A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett.* 197, 35–39. doi:10.1016/S0304-3835(03)00079-X.
- Ross, R. A., Spengler, B. A., and Biedler, J. L. (1983). Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 71, 741–747. doi:10.1093/JNCI/71.4.741.

- Ross, R. A., Spengler, B. A., Domènech, C., Porubcin, M., Rettig, W. J., and Biedler, J. L. (1995). Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ.* 6, 449–56.
- Ross, R. A., Walton, J. D., Han, D., Guo, H. F., and Cheung, N. K. V. (2015). A distinct gene expression signature characterizes human neuroblastoma cancer stem cells. *Stem Cell Res.* 15, 419–426. doi:10.1016/J.SCR.2015.08.008.
- Salhab, A., Nordström, K., Gasparoni, G., Kattler, K., Ebert, P., Ramirez, F., et al. (2018). A comprehensive analysis of 195 DNA methylomes reveals shared and cell-specific features of partially methylated domains. *Genome Biol.* 19, 150. doi:10.1186/s13059-018-1510-5.
- Samaraweera, L., Grandinetti, K. B., Huang, R., Spengler, B. A., and Ross, R. A. (2014). MicroRNAs define distinct human neuroblastoma cell phenotypes and regulate their differentiation and tumorigenicity. *BMC Cancer* 14. doi:10.1186/1471-2407-14-309.
- Samura, O. (2020). Update on noninvasive prenatal testing: A review based on current worldwide research. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 46, 1246–1254. doi:10.1111/JOG.14268.
- Sanstead, P. J., Ashwood, B., Dai, Q., He, C., and Tokmakoff, A. (2020). Oxidized Derivatives of 5-Methylcytosine Alter the Stability and Dehybridization Dynamics of Duplex DNA. *J. Phys. Chem. B* 124, 1160–1174. doi:10.1021/ACS.JPCB.9B11511.
- Schodel, J., Oikonomopoulos, S., Ragoussis, J., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Mole, D. R. (2011). High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood* 117, e207–e217. doi:10.1182/blood-2010-10-314427.
- Schofield, C. J., and Ratcliffe, P. J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 343–354. doi:10.1038/nrm1366.
- Schramm, A., Köster, J., Assenov, Y., Althoff, K., Peifer, M., Mahlow, E., et al. (2015). Mutational dynamics between primary and relapse neuroblastomas. *Nat. Genet.* 47, 872–877. doi:10.1038/ng.3349.
- Schübeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nat.* 2015 5177534 517, 321–326. doi:10.1038/nature14192.
- Schuijers, J., Junker, J. P., Mokry, M., Hatzis, P., Koo, B. K., Sasselli, V., et al. (2015). Ascl2 acts as an R-spondin/Wnt-responsive switch to control stemness in intestinal crypts. *Cell Stem Cell* 16, 158–170. doi:10.1016/J.STEM.2014.12.006.
- Schultz, M. D., He, Y., Whitaker, J. W., Hariharan, M., Mukamel, E. A., Leung, D., et al. (2015). Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. *Nat.* 2015 5237559 523, 212–216. doi:10.1038/nature14465.
- Schumacher, A., Kapranov, P., Kaminsky, Z., Flanagan, J., Assadzadeh, A., Yau, P., et al. (2006). Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Res.* 34, 528–542. doi:10.1093/NAR/GKJ461.

- Schutsky, E. K., DeNizio, J. E., Hu, P., Liu, M. Y., Nabel, C. S., Fabyanic, E. B., et al. (2018). Nondestructive, base-resolution sequencing of 5-hydroxymethylcytosine using a DNA deaminase. *Nat. Biotechnol.* 36, 1083–1090. doi:10.1038/nbt.4204.
- Seiler, C. L., Fernandez, J., Koerperich, Z., Andersen, M. P., Kotandeniya, D., Nguyen, M. E., et al. (2018). Maintenance DNA Methyltransferase Activity in the Presence of Oxidized Forms of 5-Methylcytosine: Structural Basis for Ten Eleven Translocation-Mediated DNA Demethylation. *Biochemistry* 57, 6061–6069. doi:10.1021/ACS.BIOCHEM.8B00683.
- Serre, D., Lee, B. H., and Ting, A. H. (2010). MBD-isolated Genome Sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 38, 391–399. doi:10.1093/NAR/GKP992.
- Shao, J. B., Gao, Z. M., Huang, W. Y., and Lu, Z. B. (2017). The mechanism of epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in neuroblastoma cells. *Int. J. Oncol.* 50, 1623–1633. doi:10.3892/ijo.2017.3954.
- Shekhawat, J., Gauba, K., Gupta, S., Choudhury, B., Purohit, P., Sharma, P., et al. (2021). Ten–eleven translocase: key regulator of the methylation landscape in cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 147, 1869–1879. doi:10.1007/S00432-021-03641-3/TABLES/2.
- Shi, H., Tao, T., Abraham, B. J., Durbin, A. D., Zimmerman, M. W., Kadoch, C., et al. (2020). ARID1A loss in neuroblastoma promotes the adrenergic-to-mesenchymal transition by regulating enhancer-mediated gene expression. *Sci. Adv.* 6. doi:10.1126/SCIADV.AAZ3440.
- Simpson, J. T., Workman, R. E., Zuzarte, P. C., David, M., Dursi, L. J., and Timp, W. (2017). Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. *Nat. Methods* 2017 144 14, 407–410. doi:10.1038/nmeth.4184.
- Skrzypek, H., and Hui, L. (2017). Noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy and single gene disorders. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 42, 26–38. doi:10.1016/J.BPOBGYN.2017.02.007.
- Skvortsova, K., Stirzaker, C., and Taberlay, P. (2019). The DNA methylation landscape in cancer. *Essays Biochem.* 63, 797. doi:10.1042/EBC20190037.
- Snyder, T. M., Khush, K. K., Valantine, H. A., and Quake, S. R. (2011). Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6229–6234. doi:10.1073/PNAS.1013924108.
- Song, C.-X., Szulwach, K. E., Dai, Q., Fu, Y., Mao, S.-Q., Lin, L., et al. (2013). Genome-wide Profiling of 5-Formylcytosine Reveals Its Roles in Epigenetic Priming. *Cell* 153, 678–691. doi:10.1016/j.cell.2013.04.001.
- Song, C.-X., Szulwach, K. E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X., et al. (2011a). Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat. Biotechnol.* 29, 68–72. doi:10.1038/nbt.1732.
- Song, C. X., Yin, S., Ma, L., Wheeler, A., Chen, Y., Zhang, Y., et al. (2017). 5-

- Hydroxymethylcytosine signatures in cell-free DNA provide information about tumor types and stages. *Cell Res.* 27, 1231–1242. doi:10.1038/CR.2017.106.
- Song, G., Wang, G., Luo, X., Cheng, Y., Song, Q., Wan, J., et al. (2021). An all-to-all approach to the identification of sequence-specific readers for epigenetic DNA modifications on cytosine. *Nat. Commun.* 2021 121 12, 1–16. doi:10.1038/s41467-021-20950-w.
- Song, J., Rechkoblit, O., Bestor, T. H., and Patel, D. J. (2011b). Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. *Science* 331, 1036–1040. doi:10.1126/SCIENCE.1195380.
- Song, J., Teplova, M., Ishibe-Murakami, S., and Patel, D. J. (2012). Structure-Based Mechanistic Insights into DNMT1-Mediated Maintenance DNA Methylation. *Science* 335, 709. doi:10.1126/SCIENCE.1214453.
- Sparks, A. B., Struble, C. A., Wang, E. T., Song, K., and Oliphant, A. (2012). Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: Evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 206, 319.e1-319.e9. doi:10.1016/J.AJOG.2012.01.030.
- Spengler, B. A., Lazarova, D. L., Ross, R. A., and Biedler, J. L. (1997). Cell lineage and differentiation state are primary determinants of MYCN gene expression and malignant potential in human neuroblastoma cells. *Oncol Res* 9, 467–76.
- Spruijt, C. G., Gnerlich, F., Smits, A. H., Pfaffeneder, T., Jansen, P. W. T. C., Bauer, C., et al. (2013). Dynamic readers for 5-(Hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell* 152, 1146–1159. doi:10.1016/j.cell.2013.02.004.
- Staševskij, Z., Gibas, P., Gordevičius, J., Kriukienė, E., and Klimašauskas, S. (2017). Tethered Oligonucleotide-Primed Sequencing, TOP-Seq: A High-Resolution Economical Approach for DNA Epigenome Profiling. *Mol. Cell* 65, 554-564.e6. doi:10.1016/j.molcel.2016.12.012.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15545–50. doi:10.1073/pnas.0506580102.
- Sun, Z., Dai, N., Borgaro, J. G., Quimby, A., Sun, D., Corrêa, I. R., et al. (2015). A Sensitive Approach to Map Genome-wide 5-Hydroxymethylcytosine and 5-Formylcytosine at Single-Base Resolution. *Mol. Cell* 57, 750–761. doi:10.1016/J.MOLCEL.2014.12.035.
- Sun, Z., Terragni, J., Jolyon, T., Borgaro, J. G., Liu, Y., Yu, L., et al. (2013). High-resolution enzymatic mapping of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mouse embryonic stem cells. *Cell Rep.* 3, 567–76. doi:10.1016/j.celrep.2013.01.001.
- Suzumori, N., Ebara, T., Yamada, T., Samura, O., Yotsumoto, J., Nishiyama, M., et al. (2016). Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma is affected by fetal trisomy. *J. Hum. Genet.* 61, 647–652. doi:10.1038/JHG.2016.25.
- Szwagierczak, A., Bultmann, S., Schmidt, C. S., Spada, F., and Leonhardt, H. (2010). Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic

DNA. *Nucleic Acids Res.* 38. doi:10.1093/nar/gkq684.

- Taglauer, E. S., Wilkins-Haug, L., and Bianchi, D. W. (2014). Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta* 35 Suppl. doi:10.1016/J.PLACENTA.2013.11.014.
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., et al. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930–935. doi:10.1126/SCIENCE.1170116.
- Tang, Y., Zheng, S. J., Qi, C. B., Feng, Y. Q., and Yuan, B. F. (2015). Sensitive and simultaneous determination of 5-methylcytosine and its oxidation products in genomic DNA by chemical derivatization coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Anal. Chem.* 87, 3445–3452. doi:10.1021/AC504786R.
- Taylor-Phillips, S., Freeman, K., Geppert, J., Agbebiyi, A., Uthman, O. A., Madan, J., et al. (2016). Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 6. doi:10.1136/BMJOPEN-2015-010002.
- Thienpont, B., Steinbacher, J., Zhao, H., D’Anna, F., Kuchnio, A., Ploumakis, A., et al. (2016). Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. *Nature* 537, 63–68. doi:10.1038/nature19081.
- Thirant, C., Peltier, A., Durand, S., Kramdi, A., Louis-Brennetot, C., Pierre-Eugène, C., et al. (2021). Interplay between intrinsic reprogramming potential and microenvironment controls neuroblastoma cell plasticity and identity. *bioRxiv*, 2021.01.07.425710. doi:10.1101/2021.01.07.425710.
- Tirado-Magallanes, R., Rebbani, K., Lim, R., Pradhan, S., and Benoukraf, T. (2017). Whole genome DNA methylation: beyond genes silencing. *Oncotarget* 8, 5629–5637. doi:10.18632/ONCOTARGET.13562.
- Titcombe, P., Murray, R., Hewitt, M., Antoun, E., Cooper, C., Inskip, H. M., et al. (2022). Human non-CpG methylation patterns display both tissue-specific and inter-individual differences suggestive of underlying function. *Epigenetics* 17, 653–664. doi:10.1080/15592294.2021.1950990.
- Tsagaratou, A., and Rao, A. (2014). TET Proteins and 5-Methylcytosine Oxidation in the Immune System. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 78, a020248. doi:10.1101/SQB.2013.78.020248.
- Tsaliki, E., Papageorgiou, E. A., Spyrou, C., Koumbaris, G., Kypri, E., Kyriakou, S., et al. (2012). MeDIP real-time qPCR of maternal peripheral blood reliably identifies trisomy 21. *Prenat. Diagn.* 32, 996–1001. doi:10.1002/pd.3947.
- Vaisvila, R., Ponnaluri, V. K. C., Sun, Z., Langhorst, B. W., Saleh, L., Guan, S., et al. (2021). Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at single-base resolution from picograms of DNA. *Genome Res.* 31, 1280–1289. doi:10.1101/GR.266551.120/-/DC1.
- van Groningen, T., Akogul, N., Westerhout, E. M., Chan, A., Hasselt, N. E.,

- Zwijnenburg, D. A., et al. (2019). A NOTCH feed-forward loop drives reprogramming from adrenergic to mesenchymal state in neuroblastoma. *Nat. Commun.* 10. doi:10.1038/s41467-019-09470-w.
- van Groningen, T., Koster, J., Valentijn, L. J., Zwijnenburg, D. A., Akogul, N., Hasselt, N. E., et al. (2017). Neuroblastoma is composed of two super-enhancer-associated differentiation states. *Nat. Genet.* 49, 1261–1266. doi:10.1038/ng.3899.
- van Wezel, E. M., van Zogchel, L. M. J., van Wijk, J., Timmerman, I., Vo, N.-K., Zappeij-Kannegieter, L., et al. (2019). Mesenchymal Neuroblastoma Cells Are Undetected by Current mRNA Marker Panels: The Development of a Specific Neuroblastoma Mesenchymal Minimal Residual Disease Panel. *JCO Precis. Oncol.* 3, 1–11. doi:10.1200/PO.18.00413.
- Veschi, V., Verona, F., and Thiele, C. J. (2019). Cancer Stem Cells and Neuroblastoma: Characteristics and Therapeutic Targeting Options. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 10, 782. doi:10.3389/FENDO.2019.00782/BIBTEX.
- Wagner, M., Steinbacher, J., Kraus, T. F. J., Michalakis, S., Hackner, B., Pfaffeneder, T., et al. (2015). Age-Dependent Levels of 5-Methyl-, 5-Hydroxymethyl-, and 5-Formylcytosine in Human and Mouse Brain Tissues. *Angew. Chemie Int. Ed.* 54, 12511–12514. doi:10.1002/anie.201502722.
- Walton, J. D., Kattan, D. R., Thomas, S. K., Spengler, B. A., Guo, H.-F., Biedler, J. L., et al. (2004). Characteristics of Stem Cells from Human Neuroblastoma Cell Lines and in Tumors. *Neoplasia* 6, 838–845. doi:10.1593/neo.04310.
- Wang, E., Batey, A., Struble, C., Musci, T., Song, K., and Oliphant, A. (2013a). Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat. Diagn.* 33, 662–666. doi:10.1002/PD.4119.
- Wang, L., Zhou, Y., Xu, L., Xiao, R., Lu, X., Chen, L., et al. (2015). Molecular basis for 5-carboxycytosine recognition by RNA polymerase II elongation complex. *Nat.* 2015 5237562 523, 621–625. doi:10.1038/nature14482.
- Wang, Q., Diskin, S., Rappaport, E., Attiyeh, E., Mosse, Y., Shue, D., et al. (2006). Integrative genomics identifies distinct molecular classes of neuroblastoma and shows that multiple genes are targeted by regional alterations in DNA copy number. *Cancer Res.* 66, 6050–6062. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4618.
- Wang, T., Loo, C. E., and Kohli, R. M. (2022). Enzymatic approaches for profiling cytosine methylation and hydroxymethylation. *Mol. Metab.* 57. doi:10.1016/J.MOLMET.2021.101314.
- Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., and Zhou, B. P. (2013b). The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr. Cancer Drug Targets* 13, 963–972.
- Wen, L., Li, X., Yan, L., Tan, Y., Li, R., Zhao, Y., et al. (2014). Whole-genome analysis of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at base resolution in the human brain. *Genome Biol.* 15, R49. doi:10.1186/gb-2014-15-3-r49.
- Westerlund, I., Shi, Y., and Holmberg, J. (2019). EPAS1/HIF2 α correlates with features of low-risk neuroblastoma and with adrenal chromaffin cell

- differentiation during sympathoadrenal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 508, 1233–1239. doi:10.1016/J.BBRC.2018.12.076.
- Wigerup, C., Pålman, S., and Bexell, D. (2016). Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol. Ther.* 164, 152–169. doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2016.04.009.
- Wilkins, O. M., Johnson, K. C., Houseman, E. A., King, J. E., Marsit, C. J., and Christensen, B. C. (2020). Genome-wide characterization of cytosine-specific 5-hydroxymethylation in normal breast tissue. *Epigenetics* 15, 398–418. doi:10.1080/15592294.2019.1695332.
- Wong, M., Tee, A. E. L., Milazzo, G., Bell, J. L., Poulos, R. C., Atmadibrata, B., et al. (2017). The histone methyltransferase DOT1L promotes neuroblastoma by regulating gene transcription. *Cancer Res.* 77, 2522–2533. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1663.
- Wu, H., D'Alessio, A. C., Ito, S., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., et al. (2011). Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev.* 25, 679–684. doi:10.1101/gad.2036011.
- Wu, Y., and Zhou, B. P. (2010). TNF- α /NF κ -B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br. J. Cancer* 102, 639–644. doi:10.1038/sj.bjc.6605530.
- Wynne, S. A., Pinheiro, V. B., Holliger, P., and Leslie, A. G. W. (2013). Structures of an Apo and a Binary Complex of an Evolved Archeal B Family DNA Polymerase Capable of Synthesising Highly Cy-Dye Labelled DNA. *PLoS One* 8, e70892. doi:10.1371/journal.pone.0070892.
- Xiao, F. H., Wang, H. T., and Kong, Q. P. (2019). Dynamic DNA methylation during aging: A “prophet” of age-related outcomes. *Front. Genet.* 10, 107. doi:10.3389/FGENE.2019.00107/BIBTEX.
- Xu, C., and Corces, V. G. (2018). Nascent DNA methylome mapping reveals inheritance of hemimethylation at CTCF/cohesin sites. *Science* 359, 1166–1170. doi:10.1126/SCIENCE.AAN5480.
- Xu, T., and Gao, H. (2020). Hydroxymethylation and tumors: can 5-hydroxymethylation be used as a marker for tumor diagnosis and treatment? *Hum. Genomics* 14. doi:10.1186/S40246-020-00265-5.
- Yan, Y. Y., Guo, Q. R., Wang, F. H., Adhikari, R., Zhu, Z. Y., Zhang, H. Y., et al. (2021). Cell-Free DNA: Hope and Potential Application in Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 192. doi:10.3389/FCELL.2021.639233/BIBTEX.
- Yang, H., Liu, Y., Bai, F., Zhang, J. Y., Ma, S. H., Liu, J., et al. (2013). Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene* 32, 663–669. doi:10.1038/ONC.2012.67.
- Yang, J., Bashkenova, N., Zang, R., Huang, X., and Wang, J. (2020). The roles of TET family proteins in development and stem cells. *Development* 147. doi:10.1242/DEV.183129.

- Yang, J., Liu, W., Lu, X., Fu, Y., Li, L., and Luo, Y. (2015). High expression of small GTPase Rab3D promotes cancer progression and metastasis. *Oncotarget* 6, 11125–11138. doi:10.18632/oncotarget.3575.
- Yin, Y., Morgunova, E., Jolma, A., Kaasinen, E., Sahu, B., Khund-Sayeed, S., et al. (2017). Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science* 356. doi:10.1126/SCIENCE.AAJ2239.
- Yu, E. Y., Zahid, S. S., Aloe, S., Falck-Pedersen, E., Zhou, X. K., Cheung, N. K. V., et al. (2021). Reciprocal impacts of telomerase activity and ADRN/MES differentiation state in neuroblastoma tumor biology. *Commun. Biol.* 2021 41 4, 1–15. doi:10.1038/s42003-021-02821-8.
- Yu, M., Hon, G. C., Szulwach, K. E., Song, C.-X., Zhang, L., Kim, A., et al. (2012). Base-Resolution Analysis of 5-Hydroxymethylcytosine in the Mammalian Genome. *Cell* 149, 1368–1380. doi:10.1016/j.cell.2012.04.027.
- Yu, Y. E., Xing, Z., Do, C., Pao, A., Lee, E. J., Krinsky-McHale, S., et al. (2020). Genetic and epigenetic pathways in Down syndrome: Insights to the brain and immune system from humans and mouse models. *Prog. Brain Res.* 251, 1–28. doi:10.1016/BS.PBR.2019.09.002.
- Yuan, X., Seneviratne, J. A., Du, S., Xu, Y., Chen, Y., Jin, Q., et al. (2022). Single-cell profiling of peripheral neuroblastic tumors identifies an aggressive transitional state that bridges an adrenergic-mesenchymal trajectory. *Cell Rep.* 41, 111455. doi:10.1016/J.CELREP.2022.111455.
- Zeng, H., He, B., Xia, B., Bai, D., Lu, X., Cai, J., et al. (2018). Bisulfite-Free, Nanoscale Analysis of 5-Hydroxymethylcytosine at Single Base Resolution. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 9. doi:10.1021/jacs.8b08297.
- Zeng, H., He, B., and Yi, C. (2019). Compilation of Modern Technologies To Map Genome-Wide Cytosine Modifications in DNA. *ChemBioChem* 20, 1898–1905. doi:10.1002/CBIC.201900035.
- Zhang, J., Yang, C., Wu, C., Cui, W., and Wang, L. (2020). DNA Methyltransferases in Cancer: Biology, Paradox, Aberrations, and Targeted Therapy. *Cancers (Basel)*. 12, 1–22. doi:10.3390/CANCERS12082123.
- Zhang, R., Yin, Y., Zhang, S., Chen, L., Pu, L., Deng, Q., et al. (2019). Application of Differentially Methylated Loci in Clinical Diagnosis of Trisomy 21 Syndrome. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 23, 246–250. doi:10.1089/GTMB.2018.0176.
- Zhang, Y., Jing, Z., Cao, X., Wei, Q., He, W., Zhang, N., et al. (2022). SOCS1, the feedback regulator of STAT1/3, inhibits the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Gene* 821. doi:10.1016/J.GENE.2022.146190.
- Zhao, H., Zhou, X., Sun, H., Zhao, D., Liu, H., Huang, B., et al. (2020a). Epigenome-wide association study reveals CpG sites related to COG of neuroblastoma. *Biosci. Rep.* 40. doi:10.1042/BSR20200826.
- Zhao, S. G., Chen, W. S., Li, H., Foye, A., Zhang, M., Sjöström, M., et al. (2020b).

The DNA methylation landscape of advanced prostate cancer. *Nat. Genet.* 2020 52: 778–789. doi:10.1038/s41588-020-0648-8.

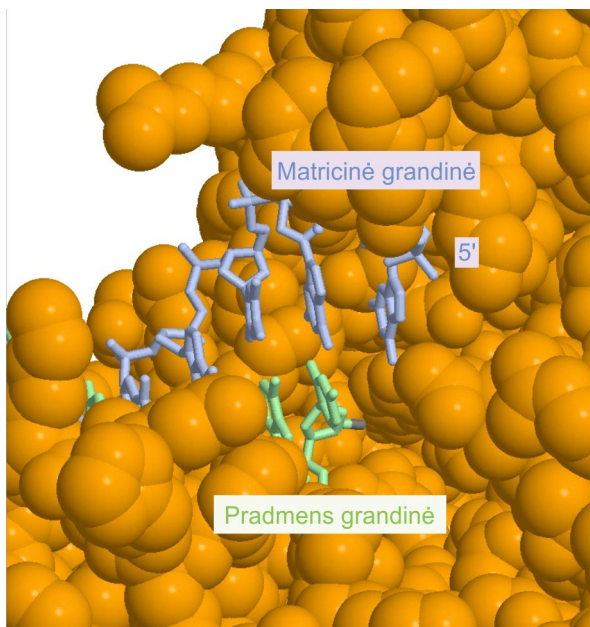
Zhou, T., Xiong, J., Wang, M., Yang, N., Wong, J., Zhu, B., et al. (2014). Structural basis for hydroxymethylcytosine recognition by the SRA domain of UHRF2. *Mol. Cell* 54, 879–886. doi:10.1016/J.MOLCEL.2014.04.003.

Zhou, W., Dinh, H. Q., Ramjan, Z., Weisenberger, D. J., Nicolet, C. M., Shen, H., et al. (2018). DNA methylation loss in late-replicating domains is linked to mitotic cell division. *Nat. Genet.* 50, 591–602. doi:10.1038/s41588-018-0073-4.

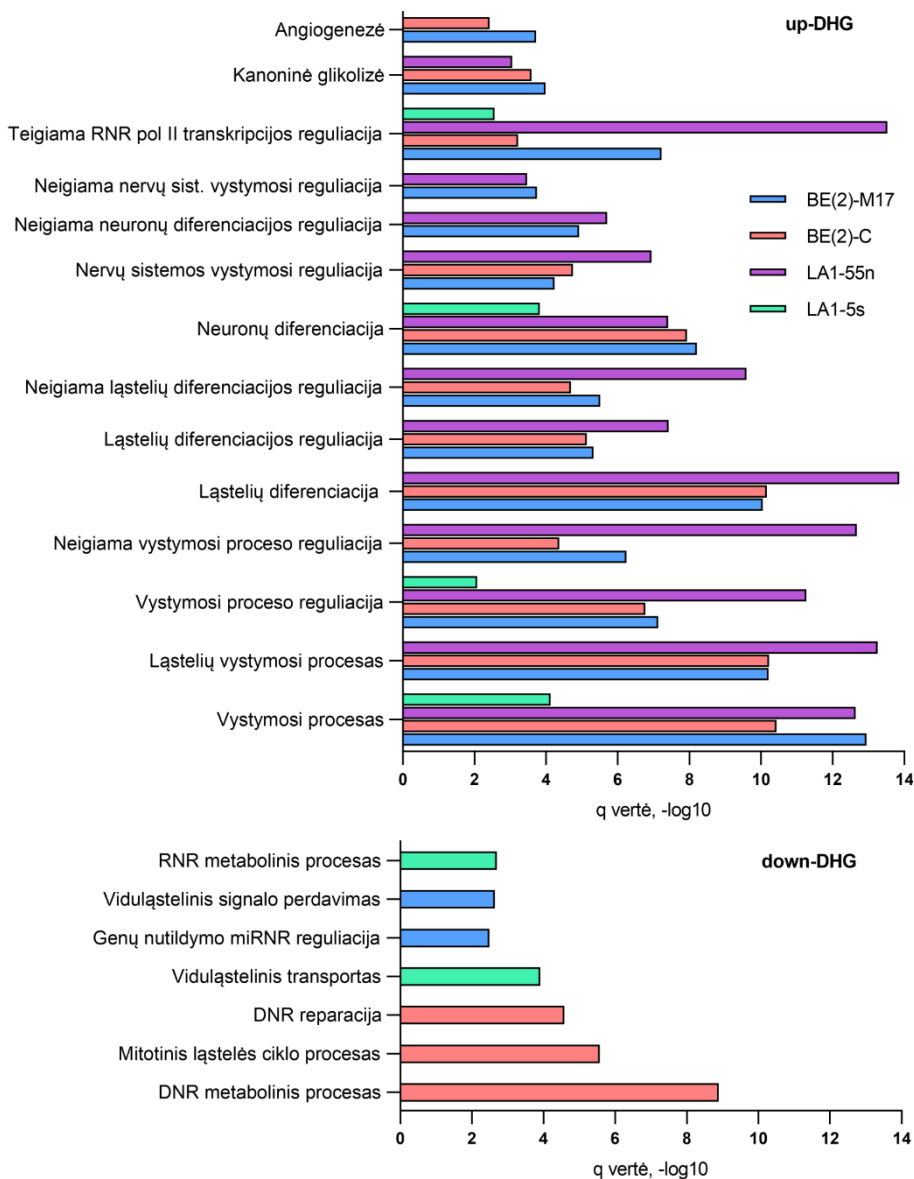
Ziller, M. J., Gu, H., Müller, F., Donaghey, J., Tsai, L. T. Y., Kohlbacher, O., et al. (2013). Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nat.* 2013 5007463 500, 477–481. doi:10.1038/nature12433.

Zimmerman, M. W., Durbin, A. D., He, S., Opiel, F., Shi, H., Tao, T., et al. (2021). Retinoic acid rewires the adrenergic core regulatory circuitry of childhood neuroblastoma. *Sci. Adv.* 7. doi:10.1126/SCIADV.ABE0834.

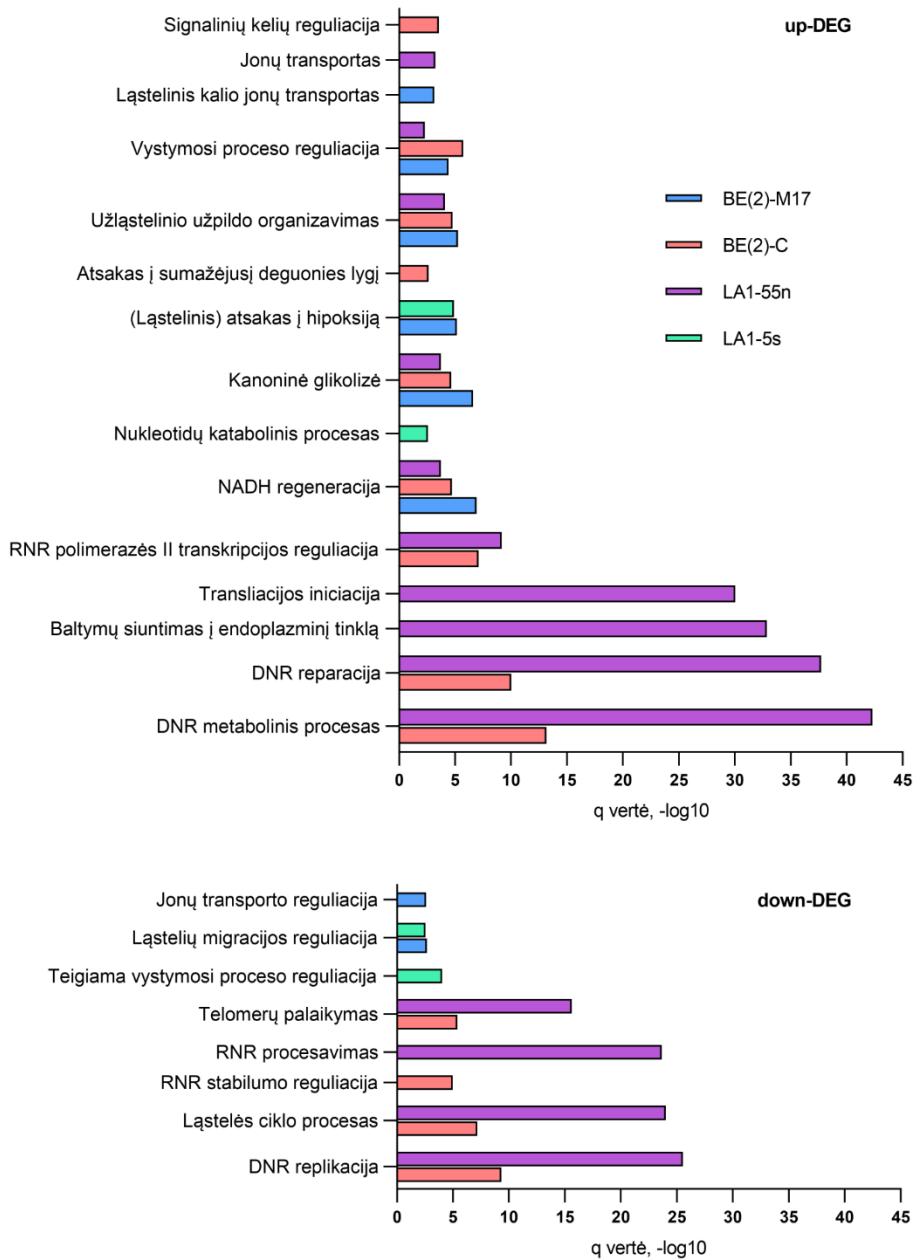
PRIEDAI



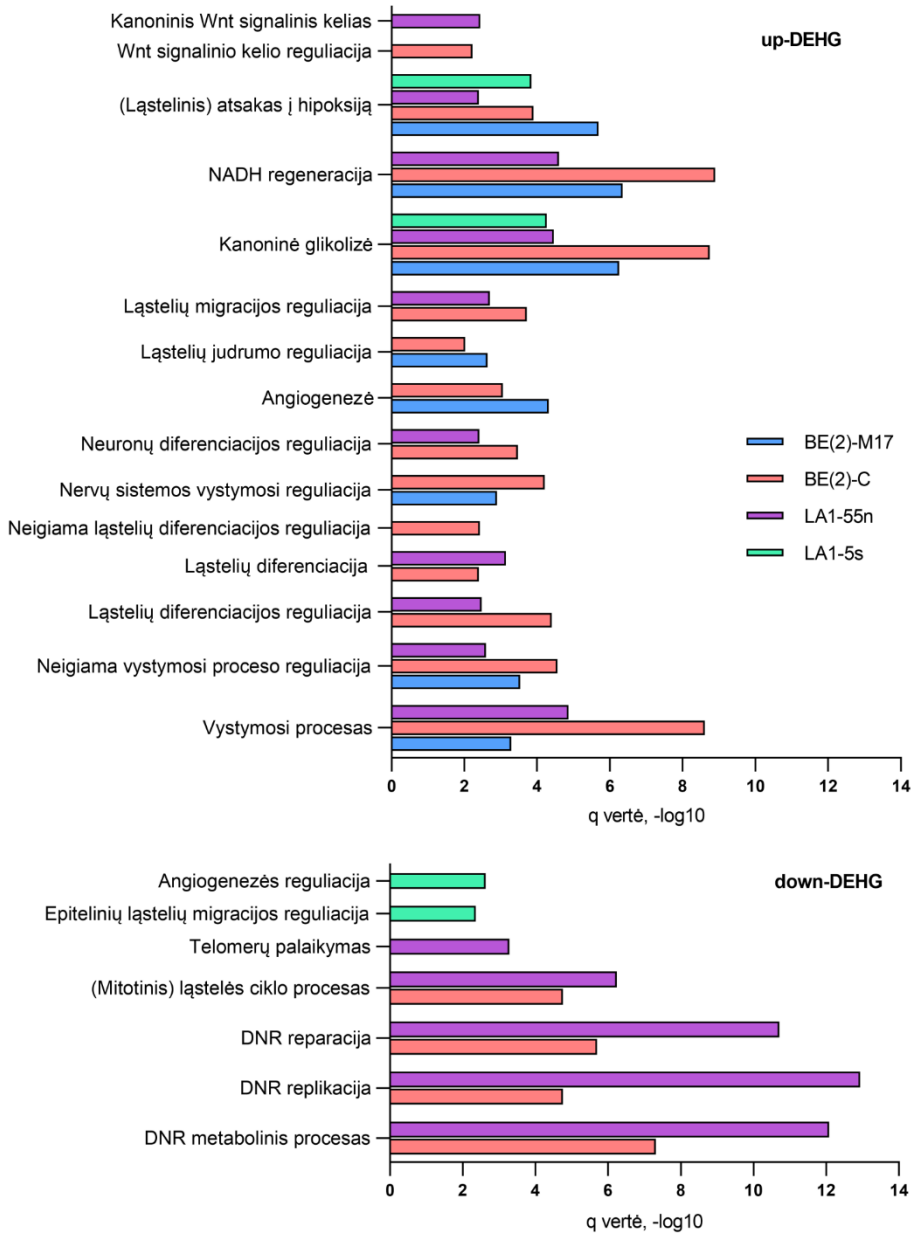
P1 pav. Pfu polimerazės aktyviojo centro kišenės erdvinis modelis. Žalia ir mėlyna spalvomis pavaizduotas Pfu surištas DNR dupleksas.



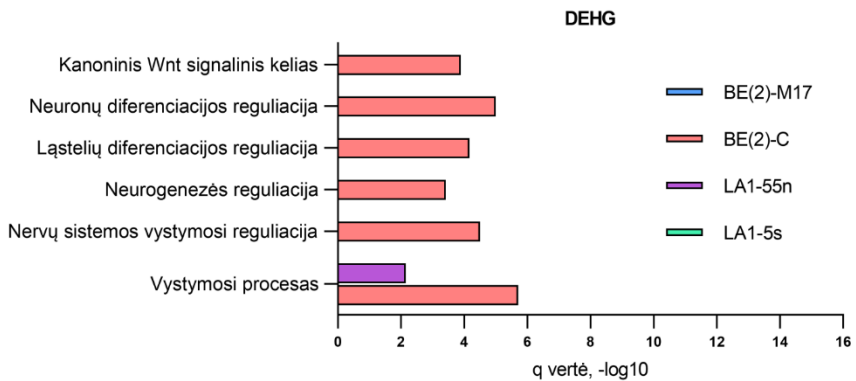
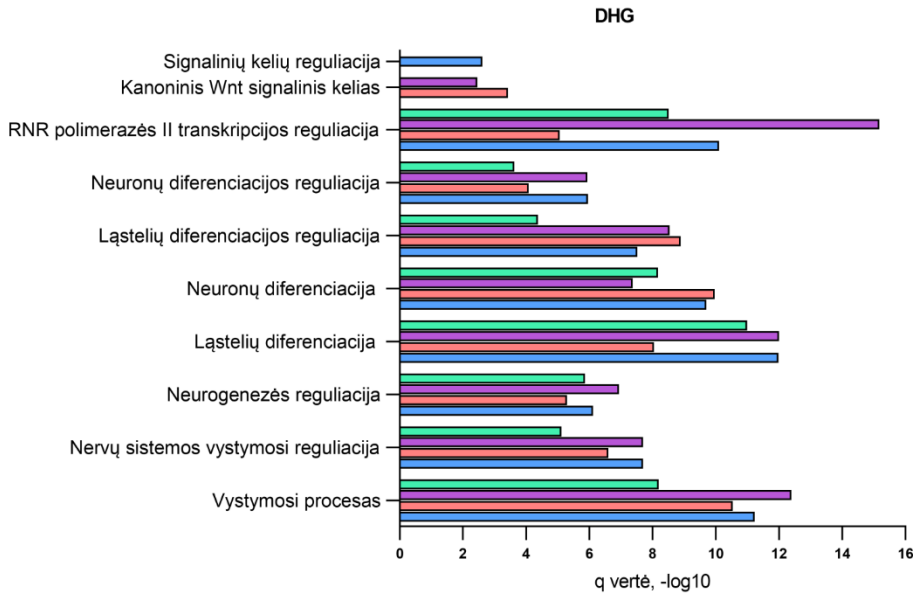
P2A pav. Funkcinė NB ląstelių genų, kuriuose hipoksijos sąlygomis padaugėjo 5hmCG (up-DHG) arba sumažėjo (down-DHG), praturtinimo GO (angl. gene ontology) analizė. Pateikiami GO terminai tik su patikimomis q vertėmis $< 0,05$.



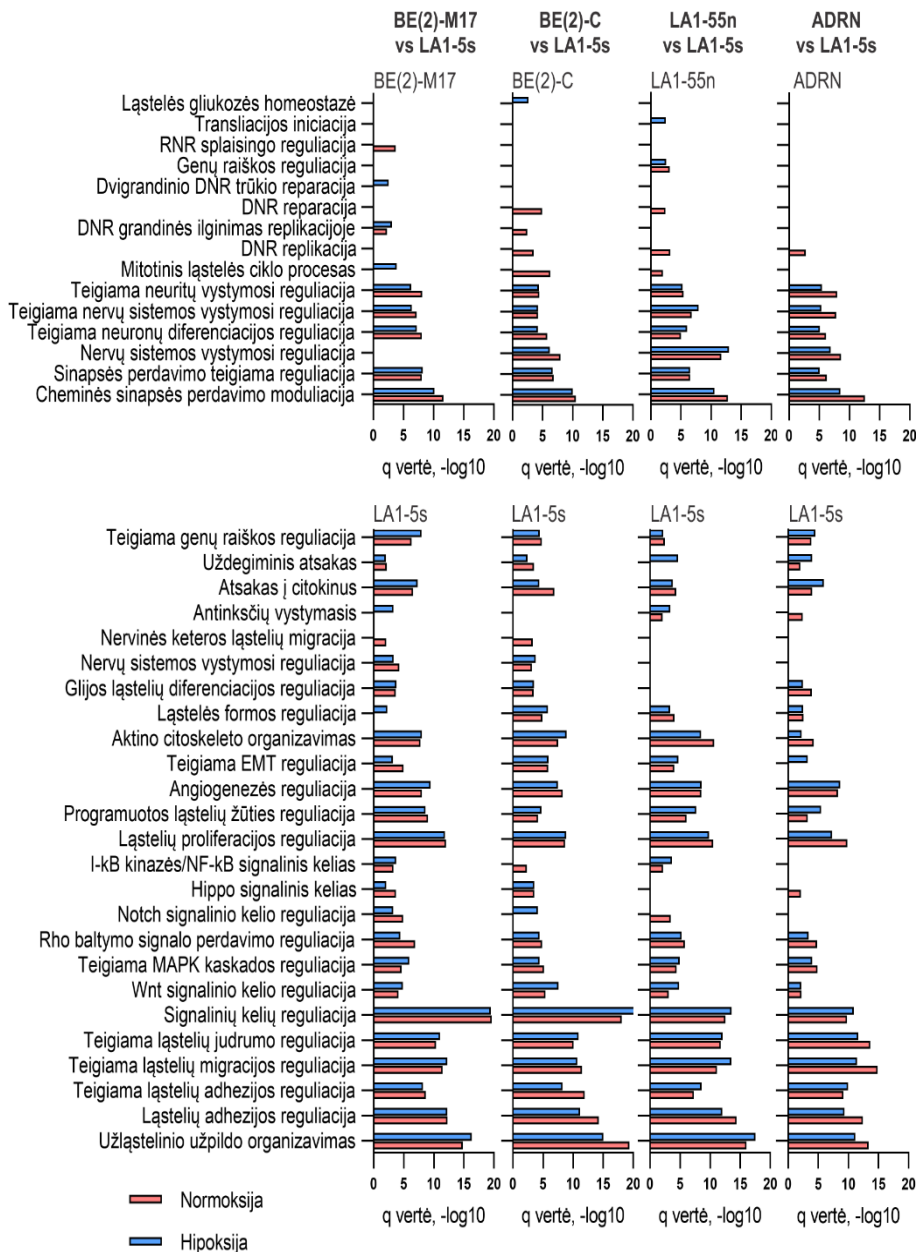
P2B pav. Funkcinė NB ląstelių genų, kurių raiška sustiprėjo (up-DEG) arba susilpnėjo (down-DEG) hipoksijoje, praturtinimo GO analizė. Pateikiami GO terminai tik su patikimomis q vertėmis < 0,05.



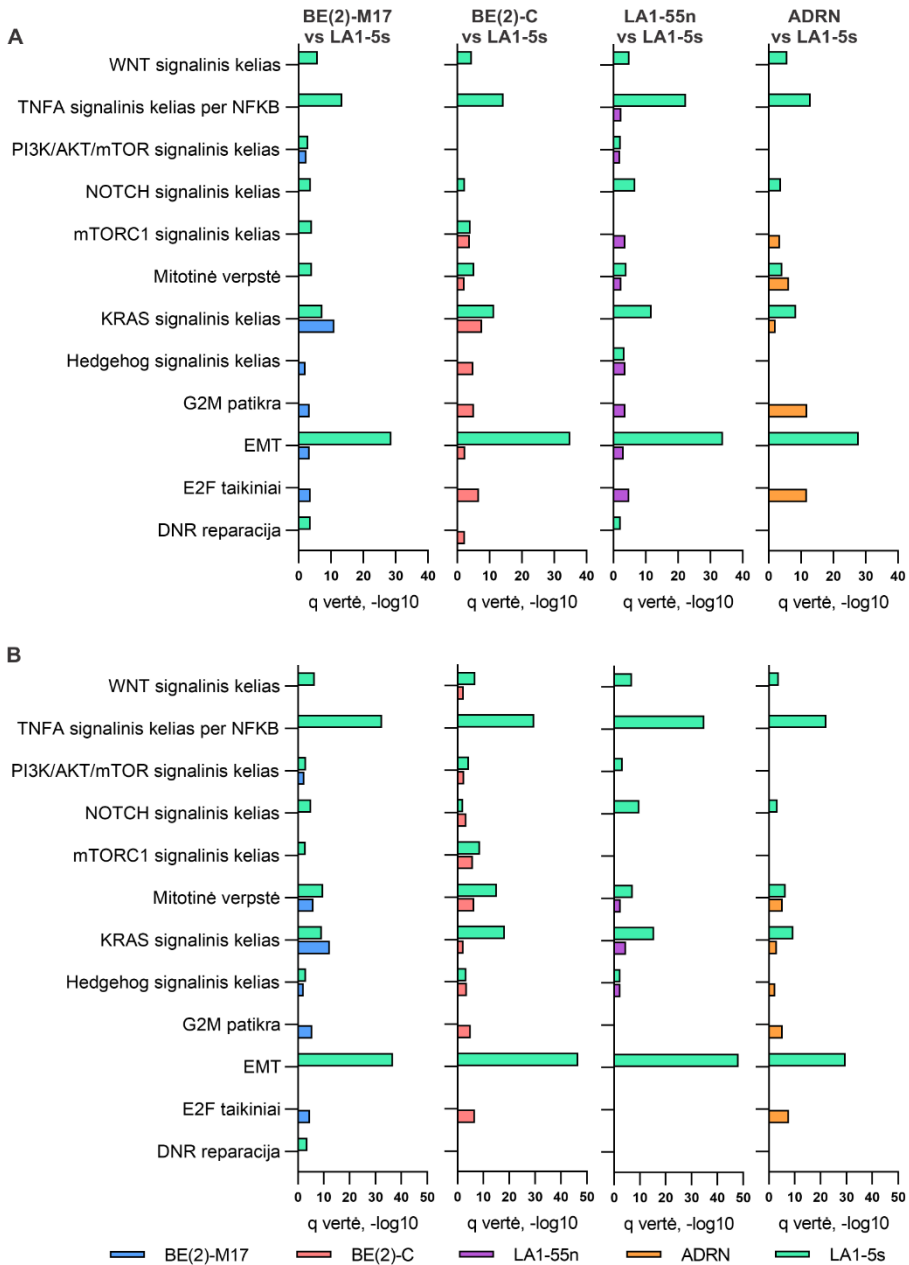
P2C pav. Funkcinė NB ląstelių genų, kuriems buvo būdingas 5hmCG ir raiškos padidėjimas (up-DEHG) arba sumažėjimas (down-DEHG) hipoksijoje, praturtinimo GO analizė. Pateikiami GO terminai tik su patikimomis q vertėmis < 0,05.



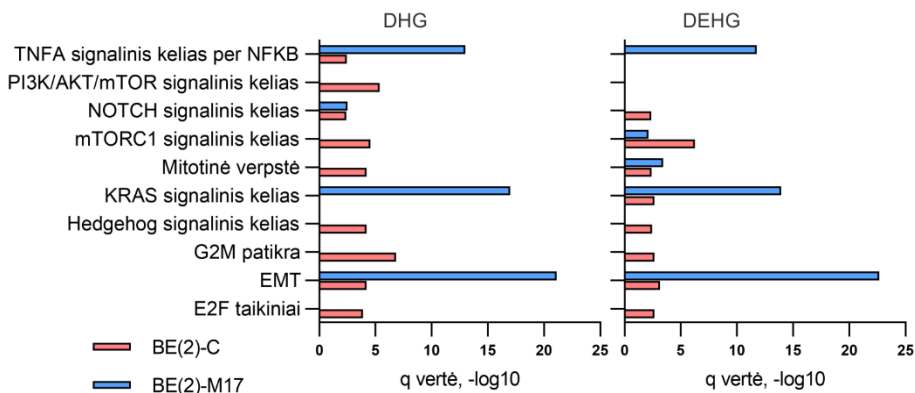
P3 pav. Funkcinė NB ląstelių hipoksinių up-DHG ir up-DEHG genų, su kuriais persidengiančiose 3'UTR CG salose stebėtas 5hmCG pagausėjimas hipoksijos sąlygomis, praturtinimo GO analizė. Pateikiami GO terminai tik su patikimomis q vertėmis < 0,05.



P4 pav. Funkcinė NB ląstelėms, augintoms normoksijos ir hipoksijos sąlygomis, specifinių DEHG genų praturtinimo GO analizė. Viršuje nurodyta, kokie poriniai ląstelių palyginimai buvo atlikti. ADRN – apjungtos BE(2)-C + BE(2)-M17 + LA1-55n ląstelės, potencialiai priskiriamos NB ADRN ląstelių tipui. Pateikiami GO terminai tik su patikimomis q vertėmis < 0,05.



P5 pav. Funkcinė NB ląstelėms, augintoms normoksijoje, specifinių DHG (A) ir DEHG (B) genų praturtinimo analizė „Hallmark“ genų rinkiniuose (iš „MSigDB“ duomenų bazės). Viršuje nurodyta, kokie poriniai ląstelių palyginimai buvo atlikti. ADRN – apjungtos BE(2)-C + BE(2)-M17 + LA1-55n ląstelės, potencialiai priskiriamos NB ADRN ląstelių tipui. Pateikiami terminai tik su patikimomis q vertėmis $< 0,05$.



P6 pav. Funkcinė BE(2)-C ir BE(2)-M17 ląstelėms, augintoms normoksijoje, specifinių DHG ir DEHG genų praturtinimo analizė „Hallmark“ genų rinkiniuose (iš „MSigDB“ duomenų bazės). Pateikiami terminai tik su patikimomis q vertėmis < 0,05.

Lentelė P1. Pelės ESC hmTOP-seq ir uTOP-seq bibliotekų sekoskaitos duomenys. K – kontrolinė biblioteka, paruošta be BGT katalizuojamo 5hmC žymėjimo, R – techninis bibliotekos pakartojimas (replika).

Bibliotekos rūšis	Pradinės DNR kiekis, ng	Neapdorotų nuskaitymų kiekis, mln.	Apdorotų nuskaitymų kiekis, mln.
hmTOP-seq, K, R1	5	0,1	0,004
hmTOP-seq, K, R2	5	0,2	0,005
hmTOP-seq, R1	5	59,8	14,9
hmTOP-seq, R2	5	57,3	15,3
hmTOP-seq, K, R1	50	0,09	0,003
hmTOP-seq, K, R2	50	0,09	0,003
hmTOP-seq, R1	50	61,5	23,0
hmTOP-seq, R2	50	55,4	22,0
hmTOP-seq, K, R1	500	0,8	0,01
hmTOP-seq, K, R2	500	0,2	0,009
hmTOP-seq, R1	500	60,3	32,5
hmTOP-seq, R2	500	57,8	31,9
uTOP-seq, R1	300	57,7	28,4
uTOP-seq, R2	300	44,2	23,1
uTOP-seq, R3	300	38,5	20,1

Lentelė P2. NB ląstelių hmTOP-seq ir uTOPseq bibliotekų sekoskaitos duomenys. K – kontrolinė biblioteka, paruošta be BGT katalizuojamo 5hmC žymėjimo, R – techninis bibliotekos pakartojimas (replika).

Bibliotekos rūšis	Ląstelių auginimo sąlygos	Neapdorotų nuskaitymų kiekis, mln.	Apdorotų nuskaitymų kiekis, mln.
SK-N-BE(2)			
hmTOP-seq, K	Normoksija	0,7	0,5
hmTOP-seq, R1	Normoksija	32,5	26,5
hmTOP-seq, R2	Normoksija	27,8	22,9
hmTOP-seq, K	Hipoksija	0,3	0,2
hmTOP-seq, R1	Hipoksija	29	23,8
hmTOP-seq, R2	Hipoksija	28,1	22,6
BE(2)-M17			
hmTOP-seq, K	Normoksija	0,5	0,3
hmTOP-seq, R1	Normoksija	45,2	36,4
hmTOP-seq, R2	Normoksija	64,7	51,5
hmTOP-seq, K	Hipoksija	0,3	0,2
hmTOP-seq, R1	Hipoksija	55,9	42,9
hmTOP-seq, R2	Hipoksija	50,8	40,0
BE(2)-C			
hmTOP-seq, K	Normoksija	0,7	0,4
hmTOP-seq, R1	Normoksija	33,3	25,9
hmTOP-seq, R2	Normoksija	25,2	19,7
hmTOP-seq, K	Hipoksija	0,3	0,2
hmTOP-seq, R1	Hipoksija	30,3	23,8
hmTOP-seq, R2	Hipoksija	26,8	20,5
LA-N-1			
hmTOP-seq, K	Normoksija	0,6	0,4
hmTOP-seq, R1	Normoksija	26,1	21,3
hmTOP-seq, R2	Normoksija	26,6	21,7
hmTOP-seq, K	Hipoksija	0,3	0,2
hmTOP-seq, R1	Hipoksija	26,3	21,7
hmTOP-seq, R2	Hipoksija	28,0	23,1
LA1-55n			
hmTOP-seq, K	Normoksija	0,7	0,4
hmTOP-seq, R1	Normoksija	24,8	19,2

Lentelė P2 (tęsinys)

Bibliotekos rūšis	Ląstelių auginimo sąlygos	Neapdorotų nuskaitymų kiekis, mln.	Apdorotų nuskaitymų kiekis, mln.
LA1-55n			
hmTOP-seq, R2	Normoksija	25,0	19,3
hmTOP-seq, K	Hipoksija	0,5	0,3
hmTOP-seq, R1	Hipoksija	28,3	21,7
hmTOP-seq, R2	Hipoksija	29,9	23,5
LA1-5s			
hmTOP-seq, K	Normoksija	0,6	0,4
hmTOP-seq, R1	Normoksija	23,7	18,3
hmTOP-seq, R2	Normoksija	23,7	19,0
hmTOP-seq, K	Hipoksija	0,3	0,2
hmTOP-seq, R1	Hipoksija	29,5	23,0
hmTOP-seq, R2	Hipoksija	30,5	23,9
SK-N-BE(2)			
uTOP-seq, R1	Normoksija	29,0	16,5
uTOP-seq, R2	Normoksija	29,9	15,3
BE(2)-M17			
uTOP-seq, R1	Normoksija	28,0	16,4
uTOP-seq, R2	Normoksija	27,9	14,8
BE(2)-C			
uTOP-seq, R1	Normoksija	24,3	15,2
uTOP-seq, R2	Normoksija	29,1	16,2
LA-N-1			
uTOP-seq, R1	Normoksija	28,1	16,4
uTOP-seq, R2	Normoksija	32,1	19,0
LA1-55n			
uTOP-seq, R1	Normoksija	27,3	16,6
uTOP-seq, R2	Normoksija	24,6	13,7
LA1-5s			
uTOP-seq, R1	Normoksija	28,7	17,4
uTOP-seq, R2	Normoksija	28,6	17,3

Lentelė P3. Placentos choriono gaurelių gDNR ir moters kraujo plazmos cfDNR hmTOP-seq ir uTOP-seq bibliotekų sekoskaitos duomenys. R – techninis bibliotekos pakartojimas (replika).

Bibliotekos rūšis	Vaisiaus lytis	Vaisiaus kariotipas	Neapdorotų nuskaitymų kiekis, mln.	Apdorotų nuskaitymų kiekis, mln.
Choriono gaurelių gDNR				
1_hmTOP-seq	XX	Normalus	26,3	8,2
2_hmTOP-seq	XX	Normalus	13,4	7,8
3_hmTOP-seq	XY	Normalus	14,7	7,5
Nesilaukiančių moterų cfDNR				
1_hmTOP-seq	-	-	26,8	8,8
2_hmTOP-seq	-	-	23,7	5,9
3_hmTOP-seq	-	-	24,9	7,9
4_hmTOP-seq	-	-	24,6	8,1
5_hmTOP-seq	-	-	23,9	6,7
6_hmTOP-seq	-	-	22,0	8,5
7_hmTOP-seq	-	-	16,4	5,5
Nėščiųjų moterų cfDNR				
1_hmTOP-seq, R1	XX	Normalus	29,4	8,2
1_hmTOP-seq, R2	XX	Normalus	2,7	1,3
2_hmTOP-seq, R1	XY	Normalus	32,4	10,4
2_hmTOP-seq, R2	XY	Normalus	2,7	1,5
3_hmTOP-seq	XX	Normalus	20,9	7,7
4_hmTOP-seq	XY	Normalus	36,4	11,1
5_hmTOP-seq	XY	Normalus	20,8	5,7
6_hmTOP-seq	XY	Normalus	18,1	3,7
7_hmTOP-seq	XX	Normalus	29,7	10,4
8_hmTOP-seq	XY	T21	28,2	9,4
9_hmTOP-seq	XX	T21	27,8	7,4
10_hmTOP-seq, R1	XX	T21	25,7	6,7
10_hmTOP-seq, R2	XX	T21	2,4	1,1
11_hmTOP-seq, R1	XY	T21	21,1	6,8
11_hmTOP-seq, R2	XY	T21	2,2	1,2

Lentelė P3 (tęsinys)

Bibliotekos rūšis	Vaisiaus lytis	Vaisiaus kariotipas	Neapdorotų nuskaitymų kiekis, mln.	Apdorotų nuskaitymų kiekis, mln.
Choriono gaurelių gDNR				
1_uTOP-seq	XX	Normalus	36,8	17,3
2_uTOP-seq	XX	Normalus	36,7	14,8
3_uTOP-seq	XY	Normalus	40,3	18,1
4_uTOP-seq	XX	Normalus	39,1	18,6
5_uTOP-seq	XY	Normalus	34,4	16,3
6_uTOP-seq	XX	Normalus	39,1	18,7
7_uTOP-seq	XY	Normalus	39,1	17,9
Nesilaukiančių moterų cfDNR				
1_uTOP-seq	-	-	37,7	12,3
2_uTOP-seq	-	-	31,5	13,3
3_uTOP-seq	-	-	39,1	13,5
4_uTOP-seq	-	-	38,6	15,3
5_uTOP-seq	-	-	26,0	11,6
6_uTOP-seq	-	-	36,4	16,6
7_uTOP-seq	-	-	33,9	12,7
Nėščiąjų moterų cfDNR				
1_uTOP-seq	XY	Normalus	35,1	16,1
2_uTOP-seq	XY	Normalus	38,6	19,9
3_uTOP-seq	XX	Normalus	37,0	12,6
4_uTOP-seq	XY	Normalus	40,2	16,9
5_uTOP-seq	XX	Normalus	45,3	21,5
6_uTOP-seq	XX	Normalus	40,9	17,6
7_uTOP-seq	XX	Normalus	38,2	16,5
8_uTOP-seq	XY	Normalus	37,2	15,4
9_uTOP-seq	XY	T21	39,8	17,0
10_uTOP-seq	XX	T21	40,2	17,0
11_uTOP-seq	XY	T21	46,3	18,5
12_uTOP-seq	XX	T21	34,7	15,1
13_uTOP-seq	XX	T21	34,4	14,4

SUMMARY OF THE DOCTORAL DISSERTATION

List of abbreviations

3'ncRNA	non-coding RNA overlapping 3'UTR of a protein-coding gene
5hmC	5-hydroxymethylcytosine
5hmCG	hydroxymethylated CG site
5mC	5-methylcytosine
ACE-seq	APOBEC-coupled epigenetic sequencing
ADRN	adrenergic cell type
BGT	β -glucosyltransferase
cfDNA	cell-free DNA
CGI	CG island
CH	dinucleotide, where H is A, T or C base
DBCO	dibenzylcyclooctyne
DEG	differentially expressed gene
DEHG	differentially expressed and hydroxymethylated gene
DHG	differentially hydroxymethylated gene
eM.SssI	engineered DNA methyltransferase SssI
EMT	epithelial-mesenchymal transition
gDNA	genomic DNA
GO	gene ontology
hmTOP-seq	5hmC-specific TOP-seq
MES	mesenchymal cell type
mESC	mouse embryonic stem cell
NB	neuroblastoma
NIPT	non-invasive prenatal testing
ODN	oligodeoxyribonucleotide
PCA	principal component analysis
PMD	partially methylated domain
R	replicate
qPCR	quantitative PCR
T21	trisomy of chromosome 21
TAB-Seq	TET-assisted bisulfite sequencing
TOP-seq	tethered oligonucleotide-primed sequencing
uCG	unmodified CG site
UDP-6-N ₃ -Glc	uridine diphosphate 6-azide-glucose
uTOP-seq	uCG-specific TOP-seq

Introduction

Epigenetic DNA modifications, without changing the existing DNA sequence, regulate gene expression and genomic imprinting, inactivate transposable elements and X chromosome, and determine cell- and tissue-specific differences (Greenberg and Bourc'his, 2019; Titcombe et al., 2022). The best-studied epigenetic modification of mammalian DNA is 5-methylcytosine (5mC). It can be removed through an active DNA demethylation pathway involving the oxidation of 5mC to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), 5-formylcytosine and 5-carboxycytosine by TET family proteins (Lio et al., 2020). However, 5hmC is not only an intermediate of active DNA demethylation, but also a stable epigenetic mark with specific functions (Bachman et al., 2014). 5mC in promoters is associated with gene repression, while 5hmC is found in gene bodies and enhancers of actively transcribed genes (Skvortsova et al., 2019). In contrast to 5mC, which is found in similar levels in all tissues, 5hmC amounts are variable with the highest level found in brain cells (Nestor et al., 2012). Due to its tissue-specific distribution and still not fully understood epigenetic function, 5hmC is an interesting and important target for epigenetic research.

Currently existing methods for genome-wide 5hmC mapping can be divided into several groups according to the usage of antibodies, chemical or enzymatic reactions (Zeng et al., 2019). However, only a small fraction of them allows 5hmC profiling at a high resolution. Due to the single-base resolution, bisulfite conversion-based DNA sequencing methods are recognized as the gold standard techniques for the genome-wide profiling of epigenetic DNA modifications, including 5hmC. However, DNA is severely degraded by bisulfite treatment limiting its applicability, especially in a clinical research where only small amounts of patient DNA can be obtained (Zeng et al., 2019; Wang et al., 2022). Also, methods using bisulfite conversion suffer from high sequencing costs and complex data analysis, as a whole-genome sequencing of scarce DNA modifications leads to a large proportion of uninformative reads. Meanwhile, other 5hmC detection methods based on restriction endonucleases or affinity enrichment, although not destructive, are limited by the number of enzyme recognition sequences or have a low resolution of ~200-400 bp (Hofer et al., 2019; Zeng et al., 2019). Our research group has previously developed a bisulfite-free high-resolution uTOP-seq (unmodified CG-specific tethered oligonucleotide-primed sequencing) method for analysis of unmodified CG sites (Staševskij et al., 2017). Therefore, considering the constrains of the existing 5hmC profiling methods and advantages of uTOP-seq, we wanted to establish a similar

method hmTOP-seq (5hmC-specific TOP-seq) for the analysis of 5hmC. After a successful development of this method, we aimed to demonstrate its robustness in the analysis of epigenetic transformations of human cancer cells and to explore the possibilities to apply it for the epigenetic detection of human genetic diseases.

The profiles of epigenetic DNA modifications change during the development of both physiological and pathological states of mammalian cells. For instance, cancers are characterized by a local DNA hypermethylation leading to the silencing of tumor suppressor genes, and global hypomethylation associated with the activation of oncogenes and genomic instability (Fetahu and Taschner-Mandl, 2021). In various types of cancer, a decreased amount of 5hmC and a change in its genome-wide distribution were observed and suggested as epigenetic biomarkers for the cancer detection (Yang et al., 2013; Xu and Gao, 2020). Furthermore, DNA methylation and hydroxymethylation are altered in complex diseases such as Alzheimer's and other neurodegenerative disorders (Perkovic et al., 2021), and even in genetic conditions such as Down syndrome (Yu et al., 2020).

Neuroblastoma (NB) is a pediatric cancer of the sympathetic nervous system with a heterogeneous clinical course ranging from spontaneously regressing to widely metastatic treatment-resistant tumors (Otte et al., 2021). A significant cellular heterogeneity is also observed in NB – NB tumor cells, being genetically identical, have diverse morphological and biochemical characteristics. It is very important to understand the variety of NB cells, as it potentially leads to different mechanisms of treatment resistance and determines NB therapy failures (Campos Cogo et al., 2020). In addition, hypoxic (oxygen-deprived) areas are often observed in various tumors and are linked to increased cancer aggressiveness. Hypoxia induces the phenotype of less differentiated NB cells and promotes their metastasis (Huertas-Castaño et al., 2020). Interestingly, the level of 5hmC increased in NB cells cultured in low oxygen conditions and was related to the cellular response to hypoxia (Mariani et al., 2014; Thienpont et al., 2016). However, data on the genomic distribution of 5hmC and its link with the formation of different NB cell types is still lacking. As development and phenotype of NB might be largely determined by the epigenetic reprogramming, its epigenetic biomarkers may help to develop new therapeutic strategies in the future (Durinck and Speleman, 2018).

Accumulating knowledge in the large-scale epigenetic changes of human diseases raised the idea that they can be useful for the diagnosis of genetic disorders. One potential application of epigenetic DNA biomarkers is for the fetal non-invasive prenatal testing (NIPT). Circulating cell-free DNA

(cfDNA) is detected in human blood plasma, originating during apoptosis of cells in various body tissues (Moss et al., 2018). In the blood of a pregnant woman cfDNA of both woman and fetus can be detected (Dennis Lo et al., 1997) enabling fetal NIPT. It is mostly used to detect chromosomal aneuploidies, the most common of which is a trisomy of chromosome 21 – Down syndrome (Hui and Bianchi, 2017). This testing is usually performed by a whole-genome or targeted chromosome-selective cfDNA sequencing (Skrzypek and Hui, 2017). However, at 10-21 weeks of gestation, when NIPT is performed, the amount of fetal cfDNA is only ~10-20 % of the total maternal cfDNA (Taglauer et al., 2014). Therefore, for a reliable NIPT, the usage of fetus-specific epigenetic biomarkers derived from differentially methylated regions between maternal and fetal cfDNA was suggested. For such analysis, methods based on bisulfite treatment, DNA immunoprecipitation and methylation-sensitive restriction endonucleases have already been proposed, and the latter two can enrich fetal cfDNA. However, these methods have significant drawbacks: bisulfite causes DNA degradation, which is especially harmful to small amounts of fetal cfDNA; antibodies show CG density bias; restriction endonuclease are applicable to a limited number of DNA sequences (Papageorgiou et al., 2011, 2014). Thus, new technological solutions are in demand for a reliable NIPT. Notably, fetal epigenetic NIPT based on the analysis of 5hmC has not yet been explored, although, due to its tissue specificity, 5hmC could potentially be used for a sensitive prenatal testing.

Goal of the study

To develop a new cost-effective, bisulfite-free, high-resolution 5hmC analysis method and, together with uTOP-seq sequencing method of unmodified CGs, apply it for the epigenetic studies in various biological contexts.

Main objectives of the study

1. To develop a new high-resolution method hmTOP-seq for 5hmC profiling.
2. To evaluate the performance of hmTOP-seq method in a genome-wide 5hmC analysis of mouse embryonic stem cells.
3. To determine the response of human neuroblastoma cells to hypoxia by hmTOP-seq and RNA-seq analysis.

4. To reveal the characteristics of different neuroblastoma cells based on the epigenetic DNA modification status, evaluated by hmTOP-seq and uTOP-seq methods, and gene expression information.
5. To assess the applicability of hmTOP-seq, uTOP-seq and the tethered oligonucleotide-primed DNA synthesis technology for the non-invasive prenatal testing of fetal gender and a fetal trisomy of chromosome 21.

Scientific novelty

This study described the development of a new hmTOP-seq method for the genome-wide profiling of 5hmC. hmTOP-seq is based on a target-specific tethered ODN-primed sequencing, similar to our recently developed uTOP-seq method for the analysis of unmodified CG sites (Staševskij et al., 2017). In hmTOP-seq 5hmC is labeled with an azide group in a glycosylation reaction catalyzed by T4 β -glucosyltransferase with uridine diphosphate 6-N₃-glucose (UDP-6-N₃-Glc) cofactor. Then, DNA oligonucleotide is attached to 6-N₃-Glc-5hmC in a “click” reaction, and a new DNA strand is primed from the labeled 5hmC using a primer complementary to ODN. After DNA amplification and sequencing, the exact genomic positions of 5hmC can be determined.

The advantages of hmTOP-seq method were demonstrated by 5hmC profiling in the genomic DNA of mouse embryonic stem cells. Experiments proved hmTOP-seq to be a high-resolution method which allowed to analyze 5hmC using a wide range of input DNA amounts (5-500 ng). The new method is highly 5hmC-specific and has a good reproducibility. hmTOP-seq correlated well with the bisulfite treatment-based TAB-Seq (TET-assisted bisulfite sequencing) method, but compared to it, hmTOP-seq has a great advantage – the cost-effectiveness of the analysis due to the target-selective sequencing.

Using the newly developed hmTOP-seq method, for the first time we performed a detailed multiomics (5hmC, transcriptomics and unmodified CGs) analysis of different neuroblastoma cell types. We investigated changes in hydroxymethylation and expression of genes in NB cells under hypoxic conditions and determined their relationship with developmental and cell differentiation processes. We comprehensively studied the cell-type specific features of NB cells. 5hmCG patterns and their relationship with gene expression and topology of partially methylated domains (PMDs) showed similarities not only between BE(2)-M17 and LA1-55n cells of the same N-type, but also between I-type BE(2)-C and S-type LA1-5s cells. Furthermore, our analysis revealed a potential link between the regulation of NB cell

identity and both 5hmC and cell type-specific PMDs. We demonstrated the importance of 5hmC located in non-CG sites in the activation of PMD-repressed genes and the association of BE(2)-C and LA1-5s cell type-specific genes with a high risk of NB.

This study for the first time showed that the analysis of hydroxymethylated or unmodified CG sequences can be applied for the non-invasive prenatal testing of the fetal trisomy of chromosome 21 (Down syndrome). We demonstrated that after application of hmTOP-seq and uTOP-seq analysis on cell-free DNA of pregnant women, accurate detection of the fetal Down syndrome is possible both by sequencing or qPCR, the latter being more affordable for scientific and clinical laboratories world-wide.

Statements to be defended

1. A high-resolution method hmTOP-seq for the genome-wide profiling of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) was developed.
2. A reliable performance of hmTOP-seq was proved by comparing it with other methods in the epigenetic 5hmC analysis of the mouse embryonic stem cells.
3. hmTOP-seq 5hmCG and RNA-seq data demonstrated the response of neuroblastoma cells to hypoxia and evaluated the hypoxic changes of gene activity.
4. Identities of neuroblastoma cells can be comprehensively revealed by their multiomics analysis of 5hmC, transcriptomics and unmodified CGs.
5. It is possible to detect fetal genetic diseases, such as a trisomy of chromosome 21, from CG modification states determined by hmTOP-seq and uTOP-seq methods in pregnant women's cell-free DNA.

Materials and methods

Neuroblastoma cell culture

NB cell lines SK-N-BE(2) (ECACC 95011815), BE(2)-C (ECACC 95011817), BE(2) M17 (ECACC 95011816), LA-N-1 (ECACC 06041201), LA1-5s (ECACC 06041204) and LA1-55n (ECACC 06041203) were maintained in 1:1 mixture of MEM with non-essential amino acids and Ham's F12 medium supplemented with 1x GlutaMAX, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and 15 % FBS (SK-N-BE(2)), 15 % heat-inactivated FBS (BE(2)-C or BE(2)-M17) or 10 % FBS (LA-N-1, LA1-5s and LA1-55n) at 37 °C (all reagents from "Thermo Fisher Scientific" ("TFS")).

For normoxic conditions cells were incubated in atmospheric oxygen and 5 % CO₂ (“NuAire” incubator) and for hypoxic – in 1 % O₂ and 5 % CO₂ (“Binder” incubator, VU LSC IBT Department of Immunology and Cell Biology).

High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) analysis of gDNA

1 µg of NB gDNA, 500 ng of blood leukocyte gDNA or 100-500 ng chorionic villi gDNA were digested with 0.5 U nuclease P1 (“Sigma-Aldrich”) in 42 µl reaction mixture for 2 h at 55 °C, and dephosphorylated by adding 1 U FastAP (“TFS”) and incubating overnight at 37 °C. HPLC-MS/MS system was operated by A. Rukšėnaitė (VU LSC IBT Department of Biological DNA Modification). Standard 5mdC, 5hmdC and dG nucleosides (“TriLink Biotechnologies”) were used for calibration. Data was analyzed using “MassHunter” (“Agilent Technologies”) software.

Preparation of hmTOP-seq libraries of mESC and NB gDNA

gDNA was sonicated in EB (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) buffer on “M220 Focused-ultrasonicator” (“Covaris”) according to manufacturer’s recommendations to yield fragments with a peak size of ~200 bp. The steps of hmTOP-seq protocol were as stated:

1) 5, 50 and 500 ng of fragmented mESC gDNA were incubated in 50 µl reaction mixture with 50 µM UDP-6-N₃-Glc cofactor (“Jena Bioscience”) and 5 U T4 BGT (“TFS”). 5hmC glycosylation of 800-1000 ng fragmented NB gDNA was carried out in 100 µl reaction mixture supplemented with 50 µM UDP-6-N₃-Glc and 10 U T4 BGT. After 2 h incubation at 37 °C enzyme was inactivated by heating at 65 °C for 20 min and DNA was column purified with “GeneJET PCR Purification Kit” (“TFS”).

2) Azide-labeled DNA was end-filled using “DNA End Repair Kit” (“TFS”) and subsequently purified with “GeneJET PCR Purification Kit”. 3’-end adenylation was carried out in 60 µl reaction mixture supplemented with 10 U Klenow exo- DNA polymerase (“TFS”) and 0.5 mM dATP at 37 °C for 45 min, followed by enzyme inactivation at 75 °C for 15 min and DNA purification with “DNA Clean & Concentrator-5” (“ZYMO Research”). Partially complementary adaptors A1/A2 were ligated overnight at 22 °C in 30 µl reaction mixture containing 4.5 µM A1/A2 and 15 U T4 DNA ligase (“TFS”). Next morning enzyme was heat inactivated at 65 °C for 10 min and DNA was purified using “DNA Clean & Concentrator-5”.

3) Biotin-containing ODN was attached in “click” reaction mixture supplemented with 20 µM Alk-biotin ODN, 8 mM CuBr: 24 mM THPTA and

50 % DMSO at 45 °C for 20 min. After DMSO dilution to < 1.5 % DNA was column purified (“GeneJET NGS Cleanup kit”, Protocol A (“TFS”)).

4) Biotinylated DNA was incubated with 0.1 mg “Dynabeads MyOne C1 Streptavidin” (“TFS”) magnetic beads in 40 µl EB supplemented with 1 M NaCl at room temperature for 3 h on a “Biosan” rotator. Subsequently, beads were washed 2x in wash buffer 1 (15 mM Tris-HCl (pH 7.4), 3 M NaCl, 1.5 mM EDTA, 0.05 % Tween 20), 2x in buffer 2 (5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.05 % Tween 20), 1x in 100 mM NaCl, then resuspended in water and heated at 95 °C for 5 min to elute DNA.

5) Enriched DNA was used in 30 µl priming reaction mixture containing 0.2 mM dNTP, 0.5 µM A35 primer, complementary to the attached ODN, 1.5 U Pfu DNA polymerase in recommended buffer (“TFS”) supplemented with additional 1 mM MgSO₄ at the following cycling conditions: 95 °C 2 min, 5 cycles at 95 °C 1 min, 65 °C 10 min, 72 °C 10 min.

6) 22 µl of reaction mixture from previous step were used in 100 µl amplification reaction consisting of “Platinum SuperFi PCR Master Mix” (“TFS”) and 0.5 µM Ad-ODN and Ad-A2 primers. Reactions were incubated at “ProFlex” (“TFS”) thermocycler at the following cycling conditions: 94 °C 4 min, 12 (50 and 500 ng input mESC gDNA or NB gDNA) or 15 cycles (5 ng input mESC gDNA libraries) at 95 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min. The final libraries were size-selected for ~300 bp fragments using “MagJET NGS Cleanup and Size-selection kit” (“TFS”) and their quality and quantity were evaluated with “Agilent 2100 Bioanalyzer” (“Agilent Technologies”) and quantitative PCR (qPCR). hmTOP-seq libraries were sequenced on “Ion Proton” (“TFS”) platform.

Preparation of uTOP-seq libraries of NB gDNA

uTOP-seq libraries were prepared as it was described for hmTOP-seq, except the following differences:

As step 1, 500 ng of fragmented NB gDNA were incubated in 30 µl reaction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA) supplemented with 200 µM Ado-6-N₃ cofactor and 0.5 µM eM.SssI for 1 h at 30 °C and for 20 min at 65 °C. After 0.2 mg/ml Proteinase K (“TFS”) treatment DNA was purified using “DNA Clean & Concentrator-5”. In step 6, uTOP-seq libraries were amplified for 11 cycles.

Total RNA isolation

Total RNA from NB cells was extracted using “RNAzol RT” (“Molecular Research Center”) according to the vendor’s instructions.

Preparation of RNA-seq libraries

mRNA was enriched from 5 µg of total NB RNA using “Dynabeads mRNA Purification Kit” (“TFS”) and rRNA was depleted using “RiboCop rRNA Depletion Kit” (“Lexogen”). RNA-seq libraries were prepared with “Ion Total RNA-Seq Kit v2” (“TFS”) and sequenced on “Ion Proton” platform.

Preparation of uTOP-seq and hmTOP-seq libraries of cfDNA

cfDNA libraries were prepared as it was described for gDNA, except the following differences:

- 1) uTOP-seq: 4-10 ng of cfDNA were labeled in reaction mixture containing 0.11 µM eM.SssI.
hmTOP-seq: 5-10 ng of cfDNA were glycosylated in reaction mixture containing 2.5-5 U T4 BGT.
- 2) Reaction mixtures contained 5 U Klenow exo- DNA polymerase and 5 U T4 DNA ligase.
- 3-4) In uTOP-seq, ODN without biotin (Alk) was used, therefore, DNA enrichment step was not carried out.
- 5) Priming reaction mixture (20 µl) was supplemented with 1 U Pfu DNA polymerase.
- 6) Amplification for 15 cycles (uTOP-seq) or 17 cycles (hmTOP-seq) was carried out by adding the whole priming reaction mixture (from step 5). The final libraries were size-selected for ~270 bp fragments.

Regional uTOP-PCR

1) 100-300 ng of blood leukocytes or chorionic villi gDNA were incubated with 200 µM Ado-6-N₃ cofactor and excess of eM.SssI ([CG]:[eM.SssI] = [1]:[2]) for 1 h at 30 °C. Enzyme was inactivated by heating at 65 °C for 20 min and hydrolyzed with 0.2 mg/ml Proteinase K for 30 min at 55 °C. Finally, labeled DNA was purified using “DNA Clean & Concentrator-5” or “GeneJET PCR purification kit”.

6-30 ng of blood plasma cfDNA was incubated with 0.11 µM eM.SssI. After enzyme inactivation, cfDNA was purified using “Oligo Clean & Concentrator” (“ZYMO Research”).

2) ODN Alk was conjugated to azide-labeled DNA as described previously with one difference: cfDNA was purified using “MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit” (“TFS”).

3) 1-3 ng of gDNA and cfDNA (or their mixture) were amplified in “Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix” (“TFS”) using 0.5 µM primers

complementary to specified genomic regions and attached ODN. Amplification was carried out in a “Rotor-Gene Q” (“Qiagen”) thermocycle at the following cycling conditions: 95 °C 10 min, 40 cycles at 95 °C 15 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s. “Rotor-Gene 6000 Series 1.7” (“Corbett Life Science”) software was used to evaluate Ct (cycle threshold) of every sample.

Detection of the fetal karyotype in qPCR from TOP-seq libraries

0.5 ng of the final cfDNA TOP-seq libraries were used in qPCR with “Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix” and 0.5 μM primers complementary to specific DNA sequences next to the analyzed uCG and 5hmCG sites. Amplification in a “Rotor-Gene Q” thermocycle was set as: 95 °C 10 min, 40 cycles at 95 °C 15 s, 60 °C 60 s. “Rotor-Gene 6000 Series 1.7” software was used to evaluate Ct of every sample.

Bioinformatics analysis

TOP-seq libraries of gDNA of mESC and NB cells were analyzed by Dr. J. Gordevičius and Dr. P. Gibas. TOP-seq libraries of chorionic villi gDNA and blood plasma cfDNA were analyzed by Dr. J. Gordevičius, Dr. P. Gibas and K. Kvederavičiūtė.

NB GO enrichment analysis was performed by submitting foreground and background lists of protein-coding genes to “GORilla” tool (Eden et al., 2009), where all known protein-coding genes were used as the background list. Molecular pathway enrichment analysis was performed using “Hallmark” gene sets from the “MSigDB” database (Subramanian et al., 2005; Liberzon et al., 2015).

Results and discussion

hmTOP-seq – a novel method for the precise profiling of 5hmC

5-hydroxymethylcytosine (5hmC) is the most common intermediate of 5-methylcytosine (5mC) demethylation and a stable epigenetic mark with important functions in the regulation of both physiological and pathological states of mammalian cells (Song et al., 2013; Bachman et al., 2014; Liang et al., 2016). Acknowledging the limitations of the currently existing 5hmC analysis methods and inspired by our recently developed uTOP-seq (uCG-specific tethered oligonucleotide-primed sequencing) method for the analysis of unmodified CG (uCG) sequences (Staševskij et al., 2017), we wanted to develop a new, bisulfite-free, high-resolution method for the profiling of 5hmC. uTOP-seq has a very high resolution, comparable to the methods employing bisulfite conversion, but does not cause DNA degradation and is

more cost-effective because only informative DNA sequences are sequenced, thus hmTOP-seq (5hmC-specific TOP-seq) method was established on its methodological basis.

In the previously developed uTOP-seq method, an oligodeoxyribonucleotide (ODN) was attached to the unmodified CG site covalently labeled with an azide group and employed in the synthesis of a new DNA strand exactly from the labeled cytosine. We decided to use this tethered oligonucleotide-based DNA priming (TOP) approach in the 5hmC-specific analysis method hmTOP-seq. Therefore, after testing several strategies for the 5hmC labeling and ODN attachment, we proposed the final hmTOP-seq scheme (Fig. 1). T4 β -glucosyltransferase (BGT) and UDP-6-N₃-Glc cofactor were used to covalently label 5hmC with a glucose moiety containing an azide group, to which a biotinylated ODN was attached during the Cu(I)-catalyzed “click” reaction. This allowed us to enrich relatively rare 5hmC-containing DNA fragments (gDNA from mammalian cells contains only 0.03-1.2 % 5hmC of total C (Globisch et al., 2010; Szwagierczak et al., 2010; Nestor et al., 2012)). Further, a primer complementary to the tethered ODN was used to prime DNA synthesis from the labeled 5hmC, and after amplification of the novel DNA strands, next-generation DNA sequencing enabled us to determine the exact genomic positions of 5hmC.

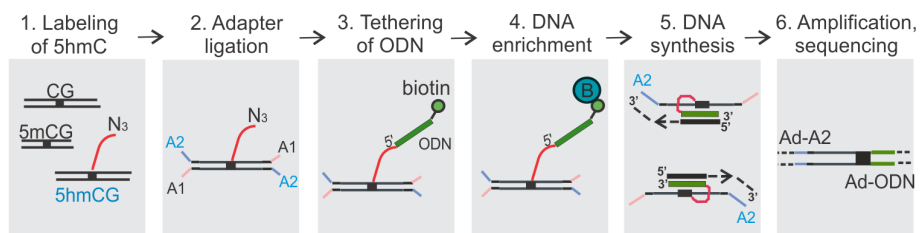


Fig. 1. Workflow of hmTOP-seq method. A1/A2 – partially complementary adapters. “B” (in step 4) – streptavidin coated magnetic bead. Ad-A2 and Ad-ODN – primers (complementary to A2 and ODN) containing “Ion Proton” platform-specific adapter sequences.

Firstly, hmTOP-seq method was validated with a model 48.5 kb bacteriophage λ DNA containing different amounts (2.5 %, 5 %, 10 %, 20 % and 40 %) of enzymatically introduced 5hmC at GCGC sites, obtained by mixing appropriate amounts of fully hydroxymethylated and unmodified DNA (prepared by Z. Staševskij, according to the methodology of Liutkevičiūtė et al., 2009). hmTOP-seq method showed a reliable detection of 5hmC – all 215 hydroxymethylated GCGC sites were identified and the correlation between technical replicates of each library type was very high

(average $r = 0.98$) (Fig. 2 A). Also, hmTOP-seq allowed reliable 5hmC quantification – we observed an increase in median coverage of GCGC sites as their hydroxymethylation level increased (Fig. 2 B). Importantly, hmTOP-seq is a very high-resolution method with 67 % of mapped reads starting exactly at the labeled 5hmC sites, and 98 % of reads in total starting in the immediate vicinity (0-4 nt) of 5hmC (Fig. 2 C). All of this indicated that hmTOP-seq method could potentially be applied for the precise analysis of genomic 5hmC.

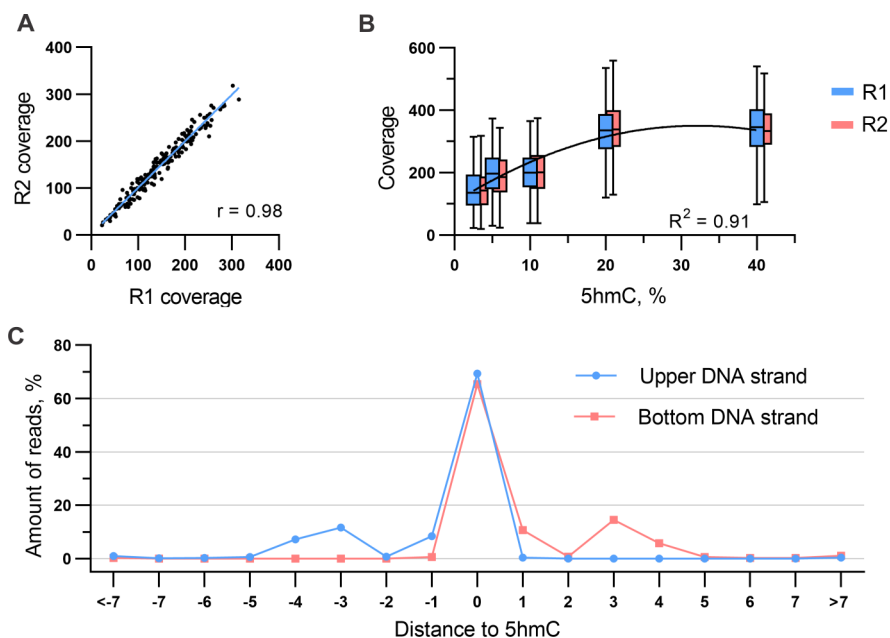


Fig. 2. Analysis of hmTOP-seq libraries of the hydroxymethylated λ DNA. A) Correlation between the coverage of λ DNA, containing 2.5 % hydroxymethylated GCGC sites, hmTOP-seq technical replicates. B) hmTOP-seq coverage dependence on the level of 5hmC in GCGC sites. Quadratic regression was fitted to the data. C) Distance distribution of the mapped read start positions from the nearest C in GCGC sites in hmTOP-seq data of λ DNA, containing 2.5 % hydroxymethylated GCGC sequences.

It is important to note that at the time of hmTOP-seq publishing, a similar Jump-seq method was published (Hu et al., 2019). This method is also based on the priming of DNA synthesis from the ODN attached to the N_3 -glucose-labeled 5hmC but it has a lower resolution than hmTOP-seq (up to 20 nt). This might be explained by the use of a different ODN containing a DBCO (dibenzylcyclooctyne) group. Conformational modeling of Pfu DNA polymerase and its substrate suggested that a bulky DBCO group might be

problematic to accommodate in the active center of the polymerase (performed by Prof. Dr. habil. S. Klimašauskas). Due to the steric effects of DBCO, “jumping” of the DNA polymerase onto gDNA might be complicated and, therefore, DNA synthesis occurs further away from the labeled 5hmC (Hu et al., 2019). In addition, we have also tested the DBCO strategy in our initial hmTOP-seq development stages and found it to be highly inefficient. Thus, in the final hmTOP-seq we used the optimized protocols for ODN tethering to the labeled 5hmC and ODN-primed DNA synthesis, which allowed us to achieve a very high resolution of the method.

To evaluate hmTOP-seq performance with mammalian DNA, we created 5hmC maps of the 2.6 Gb-size genome of mouse embryonic stem cells (mESCs). Similar to the λ DNA analysis, 93 % of mapped reads started in a close proximity (0-4 nt) to CG sites, with the vast majority of them (64 %) starting precisely at the CGs, thus demonstrating the single-base resolution capacity of the method. We showed that hmTOP-seq can be used with various amounts of input gDNA (5-500 ng), which can be useful for various applications. Although decreasing the input DNA led to an increased variability between the technical replicates, it was reduced after calculating the normalized 5hmC density (h-density) as described for uTOP-seq (Staševskij et al., 2017).

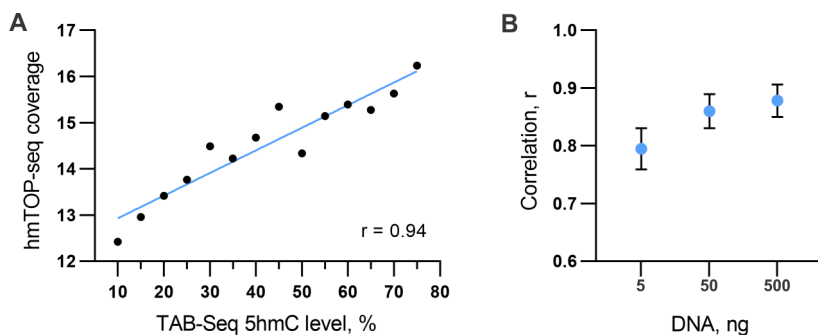


Fig. 3. Comparison of mESC hmTOP-seq data with results obtained by other methods. A) Correlation between the average coverage of hmTOP-seq 500 ng libraries and 5hmC level (stratified in the intervals) estimated by TAB-Seq. 97 % of all overlapping CGs were used for the analysis. B) Correlation of 5hmC signal between hmTOP-seq libraries of different amounts of gDNA and nano-hmC-Seal library data (average DNA region size was 615 bp).

Furthermore, to prove the reliability of hmTOP-seq we compared it with other existing methods and showed high correlations between our mESC 5hmC data and the results obtained by a single-base resolution bisulfite

conversion-using TAB-Seq (Yu et al., 2012) and a low-resolution nano-hmC-Seal (Han et al., 2016) methods (Fig. 3). In addition, the comparison also revealed the advantages of hmTOP-seq over other methods. hmTOP-seq identified more 5hmCG sequences using even a small amount of input gDNA: 4.8 and 2.0 million 5hmCGs in 500 ng and 50 ng libraries, respectively, compared to 1.9 million in TAB-Seq (using up to 1 μ g of gDNA). Analysis of the 5hmCG genomic distribution in mESCs by hmTOP-seq coincided well with previously published data. 5hmCG was most enriched in the enhancers and exons of protein-coding genes, where it has been associated with the activation of gene expression (Pfeifer et al., 2020). Also, 5hmC was generally depleted in promoters, except for the highly hydroxymethylated inactive promoters. This is in a good agreement with the observations that 5hmC at promoters represses gene expression (Wu et al., 2011; Huang et al., 2014).

As hmTOP-seq targets both individual DNA strands of a CG site separately, it has a capacity to display strand-specific hydroxymethylation information. This allowed us to observe an asymmetric distribution of 5hmC in the gene bodies, where the coding DNA strand was characterized by higher levels of 5hmCG than the template strand. And this bias between DNA strands was positively correlated with gene activity, with a greater difference in hydroxymethylation observed in the genes with a stronger expression (Fig. 4). Similar trend in 5hmC asymmetry has been previously described in human brain cells, and it is thought that the coding strand might be more accessible to TET proteins during transcription elongation, although the mechanism is not understood (Wen et al., 2014). Notably, we did not see an analogous uCG asymmetry in the gene bodies of mESCs. This could be explained by the fact that in mammalian cells 92-99 % of 5mCG sequences are symmetrically modified (Lister et al., 2009; Yu et al., 2012). Furthermore, a small fraction of hemimethylated CG sequences present in the genome tend to be equally distributed on both DNA strands (Kyriakopoulos et al., 2022).

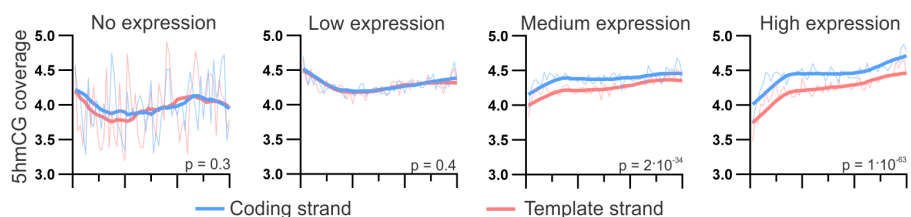


Fig. 4. Distribution of the 5hmCG coverage across the coding and template DNA strands of protein-coding genes in mESC (data from hmTOP-seq 500 ng input libraries). Genes were grouped according to their expression level: 169 genes with no expression, 2710 – low, 3598 – medium and 3300 – high

expression. Student's t-test p-values for the modification differences between the strands are shown.

In addition, due to the extremely high resolution of hmTOP-seq method, it enabled the analysis of the subtle differences in hydroxymethylation at individual CGs distributed around the splicing sites (exon-intron boundaries) of protein-coding genes. In mESC hmTOP-seq data we observed a 5hmCG peak in the exonic part and a 5hmCG drop in the intronic side of the 5' splice site (Fig. 5), which were in a good agreement with the previously published distribution of 5hmC determined by the gold standard bisulfite-based method (Wen et al., 2014). 5hmC at the exon-intron boundaries has been associated with the alternative splicing (Khare et al., 2012; Wen et al., 2014), thus the high-resolution hmTOP-seq could be potentially beneficial for more detailed research of this topic.

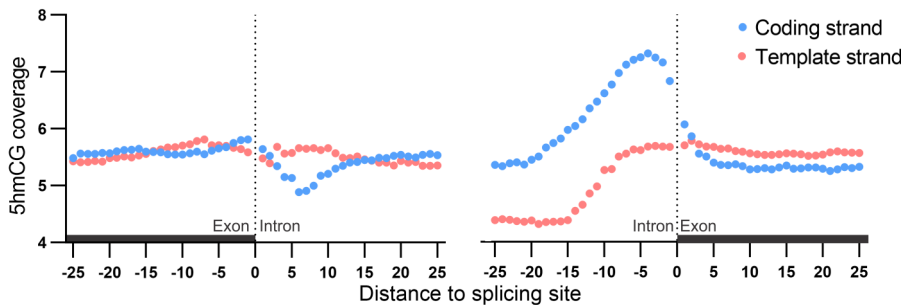


Fig. 5. Distribution of the 5hmCG coverage ± 25 nt around the splicing sites. Data from hmTOP-seq 500 ng input libraries of 10,560 and 6,169 5' and 3' splicing regions, respectively, is presented. Reliable differences in 5hmCG between exonic and intronic parts were observed by Student's t-test ($p < 0.01$).

Since for the labeling of 5hmC we use T4 BGT enzyme, which does not have any DNA sequence bias and glycosylates 5hmC in various contexts (Josse and Kornberg, 1962), hmTOP-seq method allowed us to determine not only 5hmCG, but also hydroxymethylated CH (where H means A, T or C base) positions. 76 665 5hmCH sites were identified in 500 ng input mESC DNA libraries with the highest number of them (50 %) found in CA positions. This is in a good agreement with the published data of mouse and human cells (Sun et al., 2015; He et al., 2021a) and might be explained by the fact that of all CH positions DNMT3A/B enzymes tend to methylate mostly CA sites (Jurkowska et al., 2011).

Furthermore, another important advantages of hmTOP-seq are its cost-effectiveness and simplicity of bioinformatic data analysis. Since the enrichment of 5hmC-containing DNA fragments is carried out during library

preparation, only informative, target-selected genomic DNA fragments are sequenced. Meanwhile, in other single-base resolution methods, such as TAB-Seq, which is based on bisulfite conversion (Yu et al., 2012), or an enzymatic deamination-coupled ACE-seq (Schutsky et al., 2018), the whole genomes are sequenced, thus they suffer from high sequencing costs and complex data analysis.

hmTOP-seq in multiomics analysis of different neuroblastoma cell types

After a successful validation and evaluation of hmTOP-seq with mESC gDNA, we used this method to investigate the 5hmC distribution and its potential functions in neuroblastoma (NB) cells. Initial analyses of NB identified three types of NB cells: the neuroblastic N-type, the non-tumorigenic, fibroblast-like S-type, and the most aggressive cancer stem cell-like I-type (Ross et al., 1995; Walton et al., 2004). More recent studies distinguish only two types of NB: noradrenergic/adrenergic (ADRN) and neural crest cell-like mesenchymal (MES) type (Boeva et al., 2017; van Groningen et al., 2017). Although epigenetic mechanisms are known to be crucial for cell development, the data on their influence on the formation of NB cell types is still lacking. To better understand the regulation of their identity, in our studies we used six cell lines: two maternal lines SK-N-BE(2) and LA-N-1 isolated from patients, and two daughter sublines derived from each of them: BE(2)-C (I-type) and BE(2)-M17 (N-type); LA1-55n (N-type) and LA1-5s (S-type).

To assess global 5hmC levels in NB cells, we cultured them for 24-72 h under normoxic or hypoxic conditions – in normal or 1 % O₂ (so-called pathological hypoxia (McKeown, 2014)) atmospheres. The measurement of the total amount of 5hmC in gDNA of NB cells by the HPLC-MS/MS method showed that 5hmC increased in all NB cells during hypoxia (2.5-fold on average). Such a change of 5hmC level is possibly determined by the increase in the expression of TET proteins, which is regulated by the hypoxia inducible factor HIF1 (Mariani et al., 2014; Thienpont et al., 2016; He et al., 2021b).

Next, we prepared hmTOP-seq libraries of all available NB cells cultured under normoxic and hypoxic conditions for 72 h. On average 1.67 million hydroxymethylated CGs ($\geq 5x$ coverage) were identified in two technical replicates of the libraries for each of the NB cell lines, which correlated very well (mean $r = 0.88$). h-density increased correlations between the technical replicates to ~ 0.95 and was therefore used in further studies. The majority (87 %) of the mapped hmTOP-seq reads started within 0-3 nt of the CG positions, allowing us to construct high-resolution genomic maps of 5hmCG

and determine the distribution of this DNA modification in the genomes of NB cells. The most highly hydroxymethylated CG sequences were enriched in the enhancers, shores of CG islands (CGIs), introns and 3'UTRs of protein-coding genes. In order to assess the 5hmC dynamics occurring in hypoxia, we analyzed h-density changes in 1-kb NB genomic regions. DNA regions with increased 5hmC in hypoxia were most enriched in CGIs and their shores, exons of protein-coding genes, and 3'ncRNA (non-coding RNAs that overlap the 3'UTR of protein-coding genes) genes.

In order to better reveal the epigenetic function of 5hmC and its significance in the regulation of gene expression, RNA sequencing libraries of 4 NB daughterlines: BE(2)-C, BE(2)-M17, LA1-55n and LA1-5s, grown under normoxic and hypoxic conditions, were prepared. From the 5hmC and RNA sequencing data, three groups of protein-coding genes were formed for each cell line: 1) genes that under hypoxic conditions gained 5hmCG, up-DHG (differentially hydroxymethylated genes), or lost 5hmCG, down-DHG; 2) genes with increased or decreased expression in hypoxia, respectively up- and down-DEG (differentially expressed genes); 3) genes that showed a hypoxic increase in both 5hmCG and expression, up-DEHG (differentially expressed and hydroxymethylated genes), or decrease – down-DEHG. Genes in the DEHG group showed the highest change in 5hmCG signal and expression level, so we used mostly them in various analyses as the most informative genes. Functional GO (gene ontology) enrichment analysis showed associations of Up-DEHGs with basic metabolic functions, such as response to hypoxia and glycolysis, as well as processes of neuronal differentiation and development. Of particular importance, we observed terms of negative developmental regulation such as “negative regulation of neuronal differentiation”. This is possibly related to hypoxia-inhibited differentiation of NB cells and hypoxia-induced dedifferentiation of NB cells leading to an increased cancer aggressiveness (Bhaskara et al., 2012; Huertas-Castaño et al., 2020).

Since the heterogeneity of NB is a major obstacle in the treatment of this malignancy (Braekveldt et al., 2018), we comprehensively investigated NB cellular differences. In the principal component analysis (PCA) of h-density and RNA signals I-type BE(2)-C and, particularly, S-type LA1-5s cells differentiated from other related cells independently of culture conditions (Fig. 6 A), whereas parental SK-N-BE(2) and LA-N-1 occupied similar positions to their N-type sublines (BE(2)-M17 and LA1-55n), in agreement with a tendency of NB tumors to be predominantly composed of N-type cells (Ross et al., 1995; Walton et al., 2004). Based on the gene expression and h-density of our NB cells in the published gene sets of two NB cell types

ADRN and MES (van Groningen et al., 2017), we assigned BE(2)-C, BE(2)-M17 and LA1-55n cells to the adrenergic cell type and LA1-5s to the mesenchymal type (Fig. 6 B). GO enrichment analysis of the cell type-specific DHGs and DEHGs, identified by comparing all ADRN cells of a potentially similar identity (BE(2)-C, BE(2)-M17, LA1-55n) against MES LA1-5s cells, showed associations of ADRN genes with nervous system development, neuron differentiation and synapse processes, while MES genes were linked with EMT, cell motility and adhesion. This reflected well the described features of ADRN and MES types (Boeva et al., 2017; van Groningen et al., 2017). Furthermore, in a comparison between the adrenergic BE(2)-C and BE(2)-M17 cells, enrichment of their specific DEHGs and DHGs in a “Hallmark” gene set (from “MSigDB”) showed subtle cellular differences in various signaling pathways, possibly indicating differential regulation of their tumorigenesis and BE(2)-C properties as cancer stem cells (Ross et al., 2003; Walton et al., 2004).

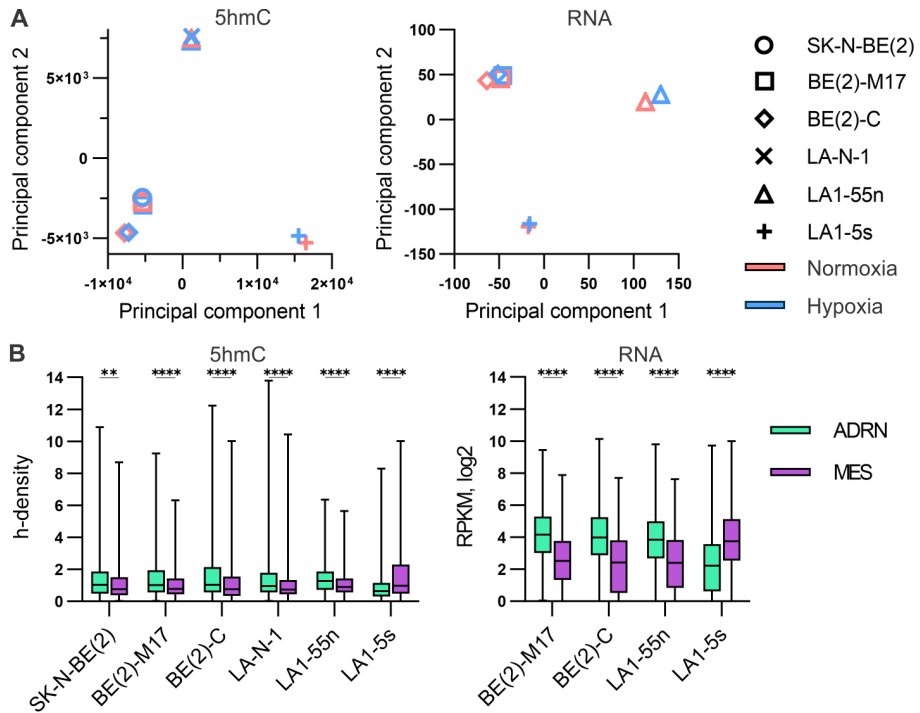


Fig. 6. Analysis of the intercellular differences of NB cell lines. A) PCA of h-density or gene expression of NB cells in normoxia and hypoxia. B) Evaluation of the 5hmC signal and expression level of ADRN and MES-specific genes in the normoxic NB cells. Student's t-test p-values are indicated (** – $p \leq 0.01$, **** – $p \leq 0.0001$). RPKM – reads per kilobase per million reads mapped.

Additionally, 3'ncRNA expression data revealed differences between N-(BE(2)-M17 and LA1-55n) and I-type BE(2)-C cells, and similarities between I- and S-type LA1-5s cells. All ADRN cells showed higher expression of the 3'ncRNA *CTC-510F12.4* and the overlapping (host) protein-coding gene *RAB3D* than MES LA1-5s, whereas *RP5-1126H10.2*, *AC010729.1* and their host genes, *UBR4* and *SOX11*, respectively, were expressed weaker in I-type BE(2)-C and S-type LA1-5s cells as compared to N-type cells. Although data on the functions of these 3'ncRNAs in NB is lacking, their host genes participate in cancer-related processes. *UBR4* was shown to be important for neurogenesis (Kim et al., 2018) and acted as a potential suppressor of NB (Wang et al., 2006). *SOX11* was proposed as a cell type-specific regulator of ADRN identity (Decaestecker et al., 2020). *RAB3D* protein induced EMT in breast cancer cells (Yang et al., 2015) and was also detected in exosomes of NB cells where it was associated with increased migration of them (Fonseka et al., 2019).

Epigenomes of mammalian cells are characterized by large, partially methylated DNA domains – PMDs, associated with transcriptionally inactive regions. The distribution of PMDs in healthy and cancer cells indicates tissue-specific features, and their methylation variability reveals intertumoral heterogeneity (Salhab et al., 2018; Brinkman et al., 2019). Therefore, in order to further investigate the epigenetic differences of NB cells, genomic PMD maps were constructed from uTOP-seq data of all six NB cell lines cultured in normoxia. This analysis revealed potential similarities in a large-scale epigenome structure between I-type BE(2)-C and S-type LA1-5s cells, which had the largest PMDs and the highest amount of them. Also, PMDs overlapped stronger between BE(2)-C and LA1-5s cells as compared to N-type (BE(2)-M17 and LA1-55n) cells. We next explored the unique NB PMDs by comparing NB sublines of SK-N-BE(2) and LA-N-1 groups (named 2-cell-PMDs) or all four NB sublines (named 4-cell-PMDs). As expected, BE(2)-C and LA1-5s cells had greater amounts of 2-cell-PMDs and 4-cell-PMDs than N-type cells.

Importantly, we observed differences between NB cells not only in terms of the PMD sizes, but also in their distribution in the genome. Cell type-specific PMDs of N-type BE(2)-M17 and LA1-55n cells were more enriched at the genomic sites of early replication, while those of BE(2)-C and LA1-5s had tendency to be enriched at late replicating regions. Although genes within PMDs are generally lowly or not expressed at all (Salhab et al., 2018; Decato et al., 2020), our results showed that cell type-specific PMD genes escaped the suppressive effect in the regions of early replication (genes in these regions are often highly expressed (Donley and Thayer, 2013)). We also proposed that

promoter and gene body 5hmCG affected gene activation within the PMDs. Furthermore, the cell type-specific DEHGs, identified in pairwise NB cell comparisons, were enriched inside the unique PMDs of the other cell line compared or overlapped with their boundaries (Fig. 7 A). All of this suggested the role of PMDs in the regulation of NB cell identity. Notably, genes in PMDs might be activated during hypoxia – cell type-specific hypoxic up-DEHGs of each subline were enriched in their own PMDs (Fig. 7 B).

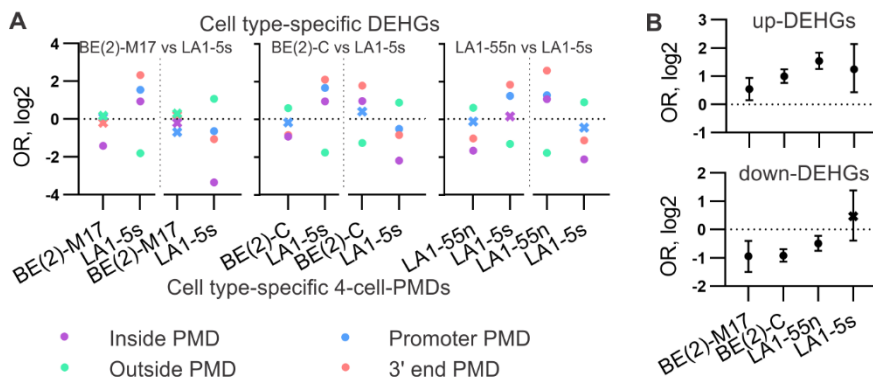


Fig. 7. Distribution of NB cell type-specific genes with respect to PMDs. A) Enrichment of the cell type-specific DEHGs (found by pairwise comparison of cells indicated at the top) across the unique 4-cell-PMDs (indicated at the bottom) split according to the positions of genes: promoter, 3' end, inside or outside the PMD. OR – odds ratio, insignificant enrichment (when $p > 0.05$) is marked with a cross. (B) Enrichment of the hypoxic up- and down-DEHGs of NB cells in their own PMDs.

It is important to mention that we performed 5hmC analysis of NB cells not only in CG but also in CH sites where 5hmC is rare. We identified up to 30,000 5hmCHs in NB cells, and they were enriched mostly in the introns and enhancers of protein-coding genes. Also, we observed the enrichment of both 5hmCG and 5hmCH sites around the PMD boundaries and their depletion inside PMDs. On the other hand, analysis revealed a cell type-specific 5hmC distribution: 5hmCGs and 5hmCHs were enriched in the unique 2-cell-PMDs of N-type cells (BE(2)-M17 and LA1-55n) but depleted in the LA1-5s-specific PMDs, and the PMDs of BE(2)-C presented the intermediate enrichment score. This possibly uncovered that BE(2)-C cells are in an intermediate transitional state of differentiation, which was previously described by morphological and biochemical studies of NB cell lines (Ciccarone et al., 1989; Ross et al., 2003) and recently shown in a single-cell gene expression analysis of NB tumors (Yuan et al., 2022). Furthermore, genes with hydroxymethylated CH sites were characterized by a stronger gene expression

than those without 5hmCH positions, and 5hmCHs increased the expression of repressed genes within the PMDs with the strength similar to the enhancers.

Finally, the possible association of 5hmCHs with the level of cancer risk in NB patients was tested. Interestingly, 5hmCH-containing cell type-specific DEHGs of BE(2)-C and LA1-5s, but not both N-types (BE(2)-M17 and LA1-55n), showed associations with a high NB clinical risk (based on published risk stratification genes (Applebaum et al., 2019)) (Fig. 8). Notably, hypoxia enhanced the link of BE(2)-C-specific DEHGs with a high risk. BE(2)-C I-type cells have been characterized as highly aggressive, whereas LA1-5s S-type cells are expected to be non-tumorigenic (Ross et al., 2003). We suggested that association of S-type with a high clinical risk of NB might be due to its mesenchymal, motile neural crest cell-like identity (Boeva et al., 2017; van Groningen et al., 2017). We also hypothesized that LA1-5s could promote the migration of other NB cells through intracellular factors, similar to how proteins secreted by S-type cells have been shown to increase the survival and proliferation of N-type cells (Li et al., 2021a).

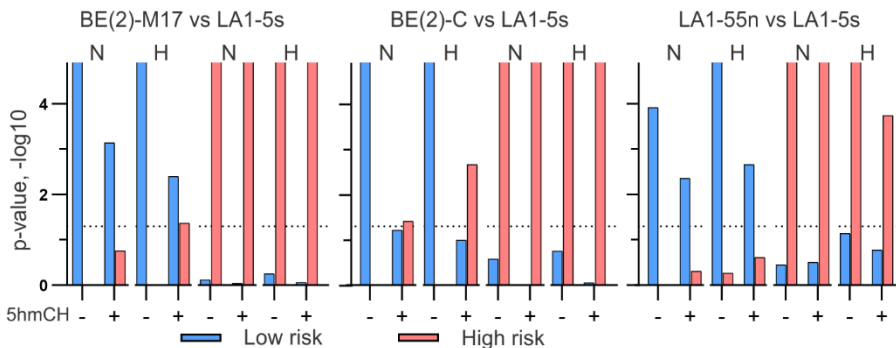


Fig. 8. Significance of the overlap of NB cell type-specific DEHGs split according to the 5hmCH enrichment (-/+) with the published NB DEHGs of low- and high-risk tumors. The top of the graph indicates which cell type-specific DEHGs were analyzed in pairwise comparisons of cells cultured under normoxic (N) or hypoxic (H) conditions. The dashed line represents the significance threshold ($p = 0.05$).

Application of TOP-seq methods for the epigenetic non-invasive prenatal testing of fetal sex and trisomy of chromosome 21

Circulating fetal cell-free DNA (cfDNA) is detected in the blood plasma of a pregnant woman and it can be used for the non-invasive prenatal testing (NIPT) of the fetus karyotype. NIPT is mainly used to determine fetal sex and aneuploidy, especially trisomy of chromosomes 21, 13 and 18, using genetic DNA sequencing methods (Skrzypek and Hui, 2017). Since fetal cfDNA

represents only a small fraction (on average 10-20 %) of the total maternal blood cfDNA (Taglauer et al., 2014), utilizing fetal-specific epigenetic biomarkers could potentially enrich the fetal cfDNA and thus increase the sensitivity and reduce the cost of NIPT. Therefore, we examined the application of uTOP-seq and hmTOP-seq methods for the prenatal diagnostics.

Firstly, we aimed to identify DNA fragments of the fetal origin in the total maternal cfDNA by analyzing differentially modified uCGs and 5hmCGs. Previously published data show that placenta is hypomethylated relative to the female blood (Chu et al., 2011; Lun et al., 2013). Also, we and others (Nestor et al., 2012) have found higher levels of 5hmC in the placenta than in the blood gDNA. This let us to expect that using TOP-seq methods to analyze different modification levels of CG sites would make it possible to distinguish fetal cfDNA, originating from the placenta tissue, from the woman's own cfDNA, which consists mostly of the leukocyte DNA. Therefore, we used biological samples of three different groups: placental chorionic villus gDNA, blood plasma cfDNA of non-pregnant women, and blood plasma cfDNA of pregnant women. A total of 38 cfDNA TOP-seq libraries from non-pregnant and pregnant women, and 10 TOP-seq libraries of placental chorionic villi gDNA of healthy pregnancies were analyzed (prepared by Z. Staševskij and Dr. K. Daniūnaitė). We showed that all sample groups could be reliably separated from each other based on different uCG coverage and fractions of identified uCGs and 5hmCGs. In addition, the lowest coverage and fraction of identified CG sequences was observed in cfDNA of non-pregnant women and the highest in chorionic villus gDNA, while moderate values were seen in cfDNA samples of pregnant women, possibly confirming that the total plasma cfDNA of pregnant women is composed of a DNA mixture of fetal placenta and maternal blood origins.

The coverage and the fraction of identified uCG and 5hmCG sites were further successfully used for the detection of the trisomy of chromosome 21 (T21) – Down syndrome. A model based on the z-scores of pregnancies (using CG fraction data) showed an accurate separation of healthy and T21 fetuses (Fig. 9) even with an extremely low sequencing depth – only 1 and 3 million processed reads of hmTOP-seq and uTOP-seq, respectively, were enough for a precise T21 detection (*in silico* analysis). In comparison, T21 identification from a whole-genome, albeit shallow, sequencing requires more than 10 million reads (Raman et al., 2019). Although there was a tendency for the z-scores to increase with a higher fetal fraction, as previously observed in NIPT studies employing the whole-genome sequencing (Dheedene et al., 2016), this had no effect on the accuracy of the T21 detection (Fig. 9).

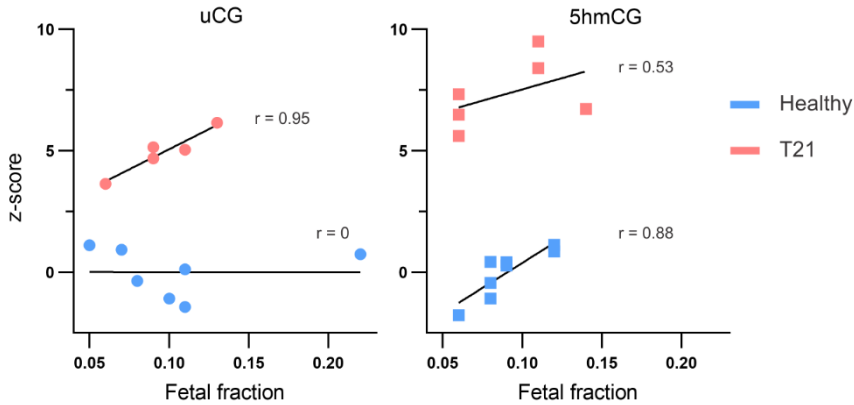


Fig. 9. Effect of the fetal cfDNA fraction on the z-score indicating fetal karyotype based on uCG and 5hmCG fractions. A reliable difference between healthy and T21 pregnancies was observed ($p < 0.0001$).

Since DNA sequencing is a relatively expensive procedure that requires a detailed and intensive bioinformatics analysis, we tested the applicability of a simpler, qPCR-employing regional uTOP-PCR approach for the NIPT. In this method, after the covalent labeling of uCG sites with azide groups and attachment of ODN to them, amplification of a specific DNA region can be monitored by qPCR. In PCR we used two primers, the first of them being complementary to the tethered ODN and 5 nt of the genomic DNA sequence next to the uCG of interest, and the second one, which was fully complementary to the genomic DNA sequence further away in the neighborhood of the targeted uCG. Since only unmodified CG sequences will be labeled leading to the amplification of DNA, it can be expected that the less methylated DNA locus of interest will be, the more specific PCR product will be formed and monitored by qPCR.

We tested the performance of the regional uTOP-PCR for the fetal gender determination based on differentially methylated CG sites in the X chromosome between gDNA of women's blood and placentas of both girls and boys (Hanna et al., 2016). We demonstrated that epigenetic tissue-specific differences can be monitored with this technique suggesting its potential application in NIPT. However, it failed to obtain a reliable fetal sex discrimination from the plasma cfDNA of pregnant women. This might have been influenced by a too little difference in the methylation levels of the studied CG sequences between the fetal placentas of different genders, and a high interindividual variation of the DNA methylation.

Considering that the performance of the regional uTOP-PCR was of an insufficient selectivity, further attempts were made to analyze the

amplification of targeted DNA regions predetermined by labeling of selected CG sequences, using prepared uTOP-seq and hmTOP-seq libraries. Such an analysis by qPCR could be performed with primers that are both complementary only to the genomic DNA sequences adjacent to the CG site of interest. We tested this technique for the fetal T21 detection, and potential T21-specific uCG and 5hmCG positions were identified from our previous sequencing data, comparing plasma cfDNA samples from pregnant women with T21 fetuses to all three remaining sample types (plasma cfDNA from non-pregnant and pregnant women with healthy babies, and chorionic villus gDNA of healthy pregnancies). Selected CG sites had higher TOP-seq coverages in T21 samples than in the rest of specimens – they were more heavily unmodified (uCG) or hydroxymethylated (5hmCG). Thus, in the TOP-seq libraries of T21 we expected to detect larger amounts of DNA regions adjacent to such CG sites.

Table 1. Coordinates of the selected T21-specific uCG and 5hmCG sites and the amount of tested plasma cfDNA specimens of pregnant women.

Coordinate of CG	Region	Amount of tested cfDNA samples
uCG		
chr21:29732020	29732020-1	3 (healthy), 5 (T21)
chr21:29732020	29732020-2	5 (healthy), 4 (T21)
chr21:33462648	33462648	7 (healthy), 5 (T21)
chr21:34672959	34672959	8 (healthy), 6 (T21)
5hmCG		
chr21:30341466	30341466	4 (healthy), 3 (T21)
chr21:46964859	46964859	2 (healthy), 2 (T21)
chr21:44084933	44084933	5 (healthy), 2 (T21)

We selected the final set of T21-specific uCG and 5hmCG targets (Table 1), whose analysis, based on CG labeling, provided the best and most consistent separation between T21 and healthy cfDNA samples. Therefore, by observing larger amounts of amplified specific DNA regions in TOP-seq libraries of T21 samples than those of healthy pregnancies in qPCR, we demonstrated a reliable detection of the fetal karyotype (Fig. 10). We believe that the application of this methodology in the prenatal screening would be highly advantageous – it would reduce the cost of NIPT as well as the testing duration. Detection of the fetal Down syndrome by assessing the amount of chromosome 21 in qPCR based on regions of differential methylation between placental and maternal blood gDNA has been previously proposed (Tsaliki et al., 2012; Zhang et al., 2019). However, altered methylation of the chromosome 21 was observed in the case of T21 (Lee et al., 2016). Thus, the

detection of Down syndrome by T21-specific uCG and 5hmCG biomarkers described in our study could be a more reliable and sensitive NIPT method.

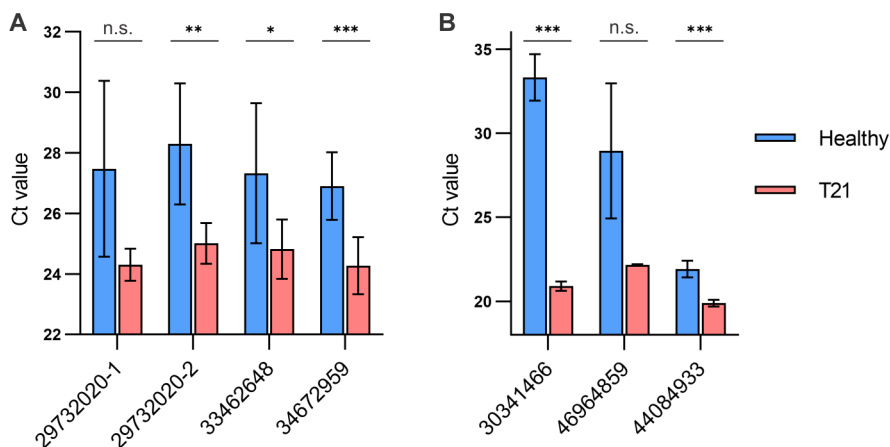


Fig. 10. Detection of the fetal T21 by qPCR in uTOP-seq (A) or hmTOP-seq (B) libraries of plasma cfDNA of pregnant women. Student's t-test was used to evaluate differences of qPCR Ct (cycle threshold) values between sample groups (n.s. – not significant ($p > 0.05$), * – $p \leq 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$).

Conclusions

1. We developed a cost-efficient method for the genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), called hmTOP-seq (5hmC-specific tethered oligonucleotide-primed sequencing), which is based on a specific 5hmC-selective sequencing.
2. hmTOP-seq enables reliable mapping of 5hmC in mouse embryonic stem cells at a high resolution and detects DNA strand-specific hydroxymethylation.
3. 5hmCG profiles constructed from the hmTOP-seq data, together with gene expression information from RNA-seq, reveal hypoxic changes in the metabolism- and development-related genes in neuroblastoma cells.
4. Multiomics – 5hmC, transcriptomics and unmodified CG (from uTOP-seq (unmodified CG-specific TOP-seq) data) – analysis of neuroblastoma cells allows comprehensive assessment of different cell identities.
5. hmTOP-seq and uTOP-seq methods can be applied for the epigenetic non-invasive prenatal testing using blood plasma cell-free DNA of pregnant women to detect fetal trisomy of chromosome 21 by quantitative PCR or DNA sequencing.

CURRICULUM VITAE

Department of Biological DNA Modification
Institute of Biotechnology
Life Sciences Center, Vilnius University
Saulėtekio Ave. 7, 10257 Vilnius, Lithuania

milda.narmonte@gmc.vu.lt

Education

- 2016-2020 Biochemistry PhD studies, Vilnius University
2016 MSc in Biochemistry (*Magna Cum Laude*), Vilnius University
2014 BSc in Biochemistry (*Cum Laude*), Vilnius University

Publications

Peña-Gómez MJ, Moreno-Gordillo P, Narmontė M, García-Calderón CB, Rukšėnaitė A, Klimašauskas S, Rosado IV. Fancd2 maintains replication fork stability during misincorporation of the DNA demethylation products 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine and 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine. *Cell Death Dis.* 2022 May 27;13(5):503

Narmontė M*, Gibas P*, Daniūnaitė K, Gordevičius J, Kriukienė E. Multiomics analysis of neuroblastoma cells reveals a diversity of malignant transformations. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Sept 7;9:727353 (*equal contribution)

Gordevičius J, Narmontė M, Gibas P, Kvederavičiūtė K, Tomkutė V, Paluoja P, Krjutškov K, Salumets A, Kriukienė E. Identification of fetal unmodified and 5-hydroxymethylated CGs in maternal cell-free DNA for non-invasive prenatal testing. *Clin Epigenetics.* 2020 Oct 20;12(1):153

Gibas P*, Narmontė M*, Staševskij Z, Gordevičius J, Klimašauskas S, Kriukienė E. Precise genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine via covalent tether-directed sequencing. *PLoS Biol.* 2020 Apr 10;18(4):e3000684 (*equal contribution)

Liutkevičiūtė Z, Kriukienė E, Ličytė J, Rudytė M, Urbanavičiūtė G, Klimašauskas S. Direct decarboxylation of 5-carboxylcytosine by DNA C5-methyltransferases. *J Am Chem Soc.* 2014 Apr 23;136(16):5884-7

Patent application

Kriukienė E., Gordevičius J., Narmontė M., Gibas P. “Methods and compositions for noninvasive prenatal diagnosis through targeted covalent labeling of genomic sites”. PCT/IB2020/053011 (2020); WO2021198726; EU No EP20722647.3; No US 17/916,056, 30-SEP-2022.

Fellowship

2022 Fellowship (supported by EMBO) at the Laboratory for March-May Developmental Genetics (team leader Dr. H. Koseki) in

International conferences and forums

- 2022 “The Coins”, poster presentation “Multiomics analysis of neuroblastoma cells reveals a diversity of malignant transformations”, virtual event (Lithuania)
- 2021 45th FEBS Congress, oral presentation “Novel approach for genome-wide high-resolution profiling of 5-hydroxymethylcytosine and its application for neuroblastoma analysis”, virtual event (Slovenia)
- 2021 20th FEBS Young Scientists’ Forum, poster presentation “Novel approach for genome-wide high-resolution profiling of 5-hydroxymethylcytosine and its application for neuroblastoma analysis”, virtual event (Croatia)
- 2020 “The Coins”, oral presentation “New approach for genome-wide single-base resolution profiling of 5-hydroxymethylcytosine”, Vilnius, Lithuania
- 2016 “Vita Scientia”, poster presentation “Direct decarboxylation of 5-carboxylcytosine by DNA C5-methyltransferases”, Vilnius, Lithuania

Courses, training

- 2021 “Bioinformatics for biologists: an introduction to Linux, Bash scripting, and R”, Wellcome Genome Campus Advanced Courses and Scientific Conferences, online course, 15 hours
- 2018 “An introduction to R”, Vilnius University, 32 hours, 1.25 ECTS credits
- 2016 COST CM1406 Training School “From Target to Lead Compound: Assay Development, High Throughput & ADME-Tox Screening”, Fraunhofer-IME SP (IME-SP), Hamburg, Germany

Awards

- 2020 EMBO Short-term fellowship, No. 8921, supporting a visit to the laboratory of Dr. H. Koseki in RIKEN research center, Japan
- 2020 FEBS YSF grant supporting participation in the 20th FEBS Young Scientists’ Forum and the 45th FEBS Congress
- 2017 Promotional scholarship for doctoral candidates from the Research Council of Lithuania

Membership

since 2019 Lithuanian Biochemical Society and FEBS

DISERTACIJOS RENGIMUI NAUDOTŲ PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

PUBLIKACIJOS

1. Narmontė M*, Gibas P*, Daniūnaitė K, Gordevičius J, Kriukienė E. Multiomics analysis of neuroblastoma cells reveals a diversity of malignant transformations. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Sept 7;9:727353
2. Gibas P*, Narmontė M*, Staševskij Z, Gordevičius J, Klimašauskas S, Kriukienė E. Precise genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine via covalent tether-directed sequencing. *PLoS Biol.* 2020 Apr 10;18(4):e3000684

(*vienodas autorių indėlis)

PATENTINĖ PARAIŠKA

Kriukienė E., Gordevičius J., Narmontė M., Gibas P. „Methods and compositions for noninvasive prenatal diagnosis through targeted covalent labeling of genomic sites“. PCT/IB2020/053011 (2020); WO2021198726; EU No EP20722647.3; No US 17/916,056, 30-SEP-2022.

Autorės indėlis į publikacijas:

1. Optimizuotas hmTOP-seq bibliotekų ruošimo protokolas, paruoštos sekoskaitai uTOP-seq, hmTOP-seq ir RNR-seq bibliotekos, atlikti HPLC-MS/MS bei genų raiškos eksperimentai, prisidėta prie sekoskaitos rezultatų analizės, kartu su bendraautoriais rengta pradinė rankraščio versija bei atliktas jo redagavimas.
2. Atlikta dalis pradinių hmTOP-seq metodo etapų optimizavimų su modeliniais DNR fragmentais, optimizuotas gDNR hmTOP-seq bibliotekų ruošimo protokolas, paruoštos pelės ESC hmTOP-seq bibliotekos, kartu su bendraautoriais redaguotas rankraštis.

Autorės indėlis į patentinę paraišką:

Optimizuoti TOP-seq protokolai su cfDNR, paruoštos cfDNR uTOP-seq ir hmTOP-seq bibliotekos, atlikti vaisiaus lyties ir T21 nustatymo testavimai tikro laiko PGR sistema.

PRISTATYTI PRANEŠIMAI

1. Narmontė M., Gibas P., Daniūnaitė K., Gordevičius J., Kriukienė E., „Multiomics analysis of neuroblastoma cells reveals a diversity of malignant transformations“, standinis pranešimas, tarptautinė konferencija „The Coins“, 2022 vasario 28 d. - kovo 3 d., virtualus renginys (Lietuva)
2. Narmontė M., Gibas P., Staševskij Z., Daniūnaitė K., Gordevičius J., Klimašauskas S., Kriukienė E., „Novel approach for genome-wide high-resolution profiling of 5-hydroxymethylcytosine and its application for neuroblastoma analysis“, žodinis pranešimas, 45-asis FEBS kongresas, 2021 liepos 3-8 d., virtualus renginys (Slovėnija)
3. Narmontė M., Gibas P., Staševskij Z., Daniūnaitė K., Gordevičius J., Klimašauskas S., Kriukienė E., „Novel approach for genome-wide high-resolution profiling of 5-hydroxymethylcytosine and its application for neuroblastoma analysis“, standinis pranešimas, 20-asis FEBS jaunųjų mokslininkų forumas, 2021 birželio 15-18 d., virtualus renginys (Kroatija)
4. Narmontė M., Gibas P., Staševskij Z., Gordevičius J., Klimašauskas S., Kriukienė E., „New approach for genome-wide single-base resolution profiling of 5-hydroxymethylcytosine“, žodinis pranešimas, tarptautinė konferencija „The Coins“, 2020 vasario 25-27 d., Lietuva

PADĖKA

Norėčiau nuoširdžiai padėkoti savo darbo vadovei dr. Editai Kriukienei už supažindinimą su mokslo „virtuve“, pasiūlytas darbo tematikas ir pirmuosius mokslo renginius; už ilgametį buvimą šalia, visą skirtą laiką ir suteiktą visapusišką pagalbą; už galimybę mokytis ir tobulėti bei gautą neįkainojamą patirtį.

Dėkoju skyriaus vedėjui prof. habil. dr. Sauliui Klimašauskui už priėmimą į komandą, mokslines idėjas, patarimus.

Dėkoju visiems publikacijų bendraautoriams už darbą kartu. Ypač esu dėkinga dr. Povilui Gibui, dr. Juozui Gordevičiui ir Kotrynai Kvederavičiūtei už atliktą bioinformatinę analizę ir praskleistą šydą į sekoskaitos duomenų analizės pasaulį. Taip pat ačiū visam DMTS kolektyvui, o ypatingai Zdislav S., Liepai G., Kotrynai S. – už tai, kad esate kartu.

Esu dėkinga gynimo tarybos nariams, prof. dr. Sonatai Jarmalaitei, prof. dr. Rolandui Meškiui, prof. dr. Artūriui Petroniui, prof. dr. Sauliui Servai ir dr. Gintautui Tamulaičiui, kad sutikote skirti savo brangų laiką šio disertacinio darbo vertinimui. Taip pat ačiū prof. dr. Sonatai Jarmalaitei ir prof. dr. Artūriui Petroniui už darbo recenzavimą ir pateiktas vertingas pastabas.

Galiausiai noriu padėkoti visiems draugams ir artimiesiems už palaikymą. Tėveliams – kad užaugino mane ir suteikė tvirtą pagrindą savarankiško gyvenimo startui. Platelių bočiams – už neblėstantį tikėjimą, kad pasieksiu mokslo aukštumas. Ir vyrui – už besąlygišką meilę ir buvimą visada šalia, tu – mano stiprybės šaltinis.

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.