

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Rūta Gerasimaitė

DNR METILTRANSFERAZĖS HhaI ATPAŽIŠTAMOS SEKOS
INŽINERIJA IR KONFORMACINIŲ VIRSMŲ KINETIKOS TYRIMAS

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

VILNIUS, 2011

Disertacija rengta 2003–2009 m. Biotechnologijos institute.

Disertacija ginama eksternu

Mokslinis konsultantas:

prof. habil. dr. **Saulius Klimašauskas** (Vilniaus universitetas, Biotechnologijos institutas; fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

TURINYS

TURINYS	3
Sutrumpinimų sąrašas	6
Įvadas	8
1. Literatūros apžvalga.....	14
1.1. DNR metilinimas prokariotuose	15
1.2. DNR metilinimas eukariotuose	16
1.2.1. DNR metilinimo funkcijos eukariotuose.....	16
1.2.2. Žinduolių DNR metiltransferazės	18
1.3. DNR citozino-5 metiltransferazių struktūrinė organizacija.....	20
1.3.1. DNR C5-MTazių aminorūgščių sekos organizacija.....	20
1.3.2. MTazių katalitinio domeno struktūra.....	22
1.4. C5-metiltransferazių sąveika su metilinama DNR	24
1.4.1. Bazės išsukimas – stereocheminė citozino aktyvacija	25
1.4.2. Bazės išsukimo tyrimas	26
1.4.3. Bazės išsukimas – daugelio kitų fermentų katalitinio mechanizmo dalis.....	30
1.4.4. Katalitinės kilpos judesys.....	31
1.5. DNR citozino C5-MTazių katalitinis mechanizmas	32
1.5.1. Kovalentinė citozino aktyvacija	33
1.5.2. Tarpinių junginių stabilizavimas	34
1.5.3. β -eliminavimas	37
1.6. Kinetinis M.HhaI mechanizmas.....	37
1.7. Metiltransferazių sekos specifiškumas.....	40
1.7.1. Taikinio atpažinimo domenai	40
1.7.2. TAD amino rūgščių sekoje aptinkami dėsniumai	41
1.7.3. Metiltransferazių HhaI ir HaeIII kontaktai su taikinio bazėmis.....	43
1.7.4. Taikinio atpažinimo ir katalizės ryšys.....	46
1.8. C5-MTazių specifiškumo keitimas	48
1.8.1. TAD keitimas tarp skirtingų MTazių.....	48
1.8.2. TAD dalių keitimas tarp skirtingų MTazių	49
1.8.3. Taškinė mutagenezė	50
1.9. DNR metiltransferazės – molekulinės biologijos įrankiai	52
1.9.1. DNR apsaugojimas nuo restrikcijos endonukleazių.....	53
1.9.2. Eukariotinių organizmų DNR metilinimo tyrimas.....	53
1.9.3. Chromatino struktūros tyrimas.....	55
1.9.4. Norimų vietų eukariotų genomuose metilinimas	56
1.9.5. Funkcinių ir reporterinių grupių įvedimas į specifines gamtinių DNR molekulių vietas	58
1.9.6. Kitos DNR MTazių pritaikymo sritys.....	61
2. Medžiagos ir tyrimo metodai.....	62
2.1. Medžiagos	62
2.1.1. Reagentai	62
2.2. Radioaktyvios medžiagos	62

2.2.1. Kofaktorius ir jo analogai.....	62
2.2.2. Terpės <i>E.coli</i> auginimui	62
2.2.3. Bakterijų kamienai	63
2.2.4. Baltymų preparatai	63
2.3. DNR preparatai	64
2.3.1. Buferiniai tirpalai MTazių tyrimui <i>in vitro</i>	66
2.4. Manipuliacijos su DNR.....	67
2.4.1. DNR gryninimas ir koncentracijos nustatymas.....	67
2.4.2. DNR elektroforezė	67
2.4.3. DNR koncentracijos nustatymas	67
2.5. Genų inžinerijos metodai	68
2.6. Mikrobiologiniai metodai	68
2.6.1. <i>E.coli</i> transformacija cheminiu metodu	68
2.6.2. <i>E.coli</i> elektroporacija.....	69
2.6.3. Bakterijų auginimo sąlygos	69
2.7. Mutantinių <i>hhaIM</i> genų konstravimas	70
2.7.1. Didesnio tirpumo M.HhaI su C-galiniu His ₆ fragmentu konstravimas	70
2.7.2. Didesnio tirpumo pL2Bsp-Δ324GH ₆	70
2.7.3. pHHΔBE konstravimas	71
2.7.4. pHhaI-ΔL2 bibliotekos konstravimas	72
2.7.5. HhaI-ΔL2 bibliotekos selekcija.....	72
2.8. Baltymų metodai	73
2.8.1. Denatūruojanti baltymų elektroforezė.....	73
2.8.2. MTazių gryninimas giminingumo chromatografijos būdu	73
2.8.3. Natyvų C-galą turinčios M.HhaI gryninimas.....	74
2.8.4. Baltymų koncentracijos nustatymas.....	75
2.8.5. Išgrynintų baltymų molekulinės masės nustatymas.....	77
2.8.6. AdoMet kiekio išgrynintų baltymų preparatuose nustatymas.....	77
2.9. Metiltransferazių specifškumo ir aktyvumo tyrimai.....	79
2.9.1. MTazių specifškumo ir aktyvumo tyrimas naudojant restrikcijos endonukleazes	79
2.9.2. MTazių savitojo aktyvumo nustatymas.....	79
2.9.3. 5-metilcitozinų identifikavimas DNR sekoje, naudojant reakciją su bisulfitu.....	80
2.10. Enzimologiniai tyrimo metodai	84
2.10.1. Giminingumo AdoMet ir AdoHey tyrimas	84
2.10.2. DNR radioaktyvumo matavimas	84
2.10.3. MTazių charakterizavimas stacionarios kinetikos sąlygomis	85
2.10.4. Cheminės reakcijos greičio nustatymas ikistacionariomis sąlygomis.....	86
2.10.5. Pradinio susidarymo produktų šuolio tyrimas.....	86
2.10.6. Reakcijos eigos matavimas realiu laiku, naudojant sustabdytos tėkmės aparatūrą.....	87
2.11. Kiti metodai.....	89
2.11.1. AdoMet gryninimas.....	89

2.11.2. MTazių reakcija su 5-fluorocitoziną turinčia DNR.....	89
2.11.3. Plazmidinės DNR žymėjimas GCG taikiniuose.....	89
3. REZULTATAI.....	91
3.1. Naujo specifiškumo DNR metiltransferazių konstravimas ir charakterizavimas.....	91
3.1.1. L2Bsp specifiškumo <i>in vivo</i> analizė.....	93
3.1.2. Efektyvesnių GCG taikinius metilinančių MTazių konstravimas ..	94
3.1.3. Atrinktų MTazių katalitinio efektyvumo ir specifiškumo tyrimas .	98
3.1.4. ΔL2-MTazių specifiškumo tyrimas modifikuojant DNR bisulfitu	101
3.1.5. ΔL2-MTazių kinetinis charakterizavimas	104
3.1.6. DNR alkilinimas reakcijose su sintetiniais AdoMet analogais	106
3.1.7. Apibendrinimas	109
3.2. Greitų baltymo ir DNR konformacinių virsmų M.HhaI katalizuojamoje reakcijoje tyrimas	113
3.2.1. Tiesioginis citozino išsukimo ir kovalentinės aktyvacijos stebėjimas realiu laiku	113
3.2.2. Citozino išsukimo ir katalitinės kilpos užsidarymo stebėjimas vienu metu	117
3.2.3. Reakcijos su klaidingai suporuotais substratais	124
3.2.4. Reakcija su AdoMet	127
3.2.5. Apibendrinimas	129
Išvados	134
Publikacijų sąrašas.....	136
Padėka	137
Literatūros sąrašas.....	138

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

λ^{em}	emisijos bangailgis
λ^{ex}	sužadavimo bangailgis
4,5mC	N4,5-dimetilcitozinas
4mC	N4-metilcitozinas
5FC, F	5-fluorocitozinas
5mC, M	5-metilcitozinas
6mA	N6-metiladeninas
a.v.	aktyvumo vienetas
AdoHcy	S-adenozil-L-homocisteinas
AdoMet	S-adenozil-L-metioninas
amr.	aminorūgštis
Ap^R	atsparumas ampicilinui
AU	absorbcijos vienetai
BMR	branduolio magnetinis rezonansas
bp	bazių pora
BSA	jaučio serumo albuminas (<i>bovine serum albumine</i>)
C5-MTazė	citozino C5-metiltransferazė
Cm^R	atsparumas chloramfenikolui
dpm	skilimai per minute (<i>desintegrations per minute</i>)
EDTA	etilendiamintetraacto rūgštis
ESI-MS	su masių spektrometru sujungtas elektrošpurškimo jonizatorius
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazino-etanosulfoninė rūgštis
HPLC	aukšto slėgio skysčių chromatografija
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas
k	greičio konstanta
K_D	disociacijos konstanta
K_M	Michaelis-Menten konstanta
KM	konservatyvus motyvas
Km^R	atparumas kanamicinui
LC/MS	skysčių chromatografas, sujungtas su masių spektrometru
M., MTazė	metiltransferazė

mTAG	metodas specifinių DNR sekų žymėjimui, kuriame žymėjimui tinkamų funkcinių grupių prijungimą prie DNR katalizuoja DNR metiltransferazės (<i>methyltransferase-directed transfer of activated groups</i>)
NDS	natrio dodecilsulfatas
NHS	<i>N</i> -hidroksisukcinimidas
OD₆₀₀	optinis tankis 600 nm bangoilgio šviesoje
P	2-aminopurinas
PAA	poliakrilamidas
PDB	makromolekulių struktūrų duomenų bazė (<i>Protein Data Bank</i>)
PGR	polimerazės grandininė reakcija
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoridas
R., REazė	restrikcijos endonukleazė
RM	restrikcija-modifikacija
TAD	taikinio atpažinimo domenas
Tris	tris-(hidroksimetil)-aminometanas
UV	ultravioletiniai spinduliai
WT	laukinis tipas (<i>wild type</i>)

Tekste naudojami standartiniai heterociklinių bazių ir aminorūgščių pavadinimų vienos arba trijų raidžių sutrumpinimai.

IVADAS

Žmogaus genomo projektas pradėjo masinių tyrimų erą molekuliniėje biologijoje: viena po kitos nustatomos genomų ir metagenomų sekos, atliekami masiniai paraleliniai genų raiškos ir epigenetinių modifikacijų tyrimai, kuriami bioinformatiniai įrankiai gautų duomenų analizei ir duomenų bazės jų sisteminiui (Galperin ir Cochrane, 2011). Dabar vieno eksperimento metu galima sekti tūkstančių genų raiškos pokyčius, taigi atrodo, kad kaip niekada sparčiai artėjame prie senos svajonės – suprasti ląstelės kaip visumos funkcionavimą. Tačiau net ir šiame kontekste aktualumo nepraranda atskirų fermentų detalaus molekulinio veikimo mechanizmų išaiškinimas. Tokios žinios gali palengvinti vaistinių junginių paiešką, esamų vaistų veikimo mechanizmų išaiškinimą, o taip pat atveria galimybes keisti fermentų savybes geriau pritaikant juos praktinėms reikmėms (pvz. asimetrinei sintezei arba biotechnologijos pramonei). Greta praktinių tikslų kiekvieno fermento (ar fermentų grupės) detalaus mechanizmo tyrimas turi ir fundamentinę reikšmę: sukauptos žinios ir patirtis palengvina kitų fermentų tyrimus, tobulinami esami tyrimo metodai ir kuriami nauji.

Viena iš pastaraisiais dešimtmečiais aktyviai tiriamų fermentų klasių – DNR citozino C5-metiltransferazės (C5-MTazės). Tai panašios struktūros fermentai, atpažįstantys 2-8 bp ilgio DNR sekas (taikinius) ir pernešantys metilgrupę nuo kofaktoriaus *S*-adenozil-L-metionino (AdoMet) ant taikinyje esančio citozino (Dryden, 1999). Daugumoje eukariotinių organizmų 5-metilcitozinas yra svarbi epigenetinė žymė, moduliuojanti genome užkoduotos informacijos pasireiškimą (Cedar ir Bergman, 2009; Pogribny ir Beland, 2009; Cheng ir Blumenthal, 2010). Nors priežastinis ryšys ne visada aiškus, DNR metilinimo pokyčiai siejami su tokiais sudėtingomis ligomis kaip šizofrenija, diabetas ir vėžys (Wong ir kt., 2005). Prieš keletą metų DNR C5-MTazių inhibitorius 5-azacitozinas buvo oficialiai patvirtintas kaip vaistas, skirtas mielodisplastiniam sindromui gydyti (Kaminskas ir kt., 2005).

Nepaisant nemažo susidomėjimo, eukariotinių DNR C5-MTazių

enzimologinius tyrimus apsunkina jų dydis ir tai, kad jų aktyvumą reguliuoja sąveika su kitais ląstelės baltymais (Goll ir Bestor, 2005; Cheng ir Blumenthal, 2008). Todėl daug enzimologinių DNR C5-metilinimo tyrimų buvo atlikta su paprastesnės struktūros prokariotų DNR C5-MTazėmis, kurioms būdingas analogiškas katalizės mechanizmas ir didelis sekų bei erdvinių struktūrų panašumas su eukariotinių MTazių kataliniu domenu. Prieš keletą metų susintetinus gamtinio kofaktoriaus analogus, leidžiančius MTazės katalizuojamos reakcijos metu prie DNR prijungti reporterines grupes, prokariotų C5-MTazės įgijo potencialą tapti svarbiais įrankiais genų inžinerijoje (Klimašauskas ir Weinhold, 2007; Lukinavičius ir kt., 2007).

Kaip modelinė sistema DNR citozino metilinimo tyrimuose dažniausiai naudojama ir išsamiausiai charakterizuota prokariotinė MTazė HhaI (M.HhaI) (Sankpal ir Rao, 2002). M.HhaI atpažįsta seką GCGC ir metilina joje pirmąjį citoziną (pabrauktas). Homologiška C5-MTazių struktūra lemia tai, kad M.HhaI tyrimuose sukaupia informacija nesunkiai gali būti pritaikyta kitoms MTazėms. Kristalografiniai M.HhaI tyrimai parodė, kad už katalizę ir specifinę sąveiką su DNR atsakingi baltymo elementai yra atskirti erdvėje (Klimašauskas ir kt., 1994). Didžiajame (katalitiniame) baltymo domene sutelkta dauguma konservatyvių, aktyvų centrą ir kofaktoriaus surišimo kišenę sudarančių aminorūgščių. Dvi paviršinės kilpos iš mažojo (taikinio atpažinimo) domeno sudaro beveik visus specifinius kontaktus su DNR bazėmis. Su kiekviena baze kontaktuoja tik vienai kilpai priklausančios aminorūgštys, taigi taikinio atpažinimo domenui būdinga modulinė struktūra. Tokios organizacijos dėka prokariotų DNR MTazės – patogi sistema specifinei baltymų-DNR sąveikai tirti, nes galima modifikuoti taikinio atpažinimo elementus bei pakeisti fermento specifiškumą, stipriai nepažeidžiant katalitinės funkcijos (Balganesh ir kt., 1987; Klimašauskas ir kt., 1991).

Susidarant M.HhaI kompleksui su DNR stipriai keičiasi tiek baltymo, tiek DNR konformacija: metilinamas citozinas išsukamas iš DNR dvigrandės spiralės o paviršinė didžiojo domeno kilpa (katalitinė kilpa) užsidaro užrakinama surišta DNR ir baigdamą formuoti aktyvų centrą (Klimašauskas ir

kt., 1994). Reakcijos metu citozino žiedas aktyvuojamas susidarant kovalentiniam tarpiniam kompleksui tarp katalitinio cisteino ir citozino žiedo C6-atomo. Nors daugelis metilinimo reakcijos aspektų išsamiai charakterizuoti, iki šiol mažai ištirtinėti greiti procesai, vykstantys iki metilgrupės pernašos – citozino išsukimas, katalitinės kilpos užsidarymas ir citozino kovalentinė aktyvacija. Šių stadijų tyrimus didele dalimi riboja adekvačių metodų nebuvimas – bazės išsukimo dinamika dažniausiai buvo tirama naudojant modifikuotą DNR, kurioje metilinamas citozinas buvo pakeistas fluorescuojančia baze 2-aminopurinu (P) (Vilkaitis ir kt., 2000). Kadangi P:G yra silpna bazių pora, o 2-aminopurinas aktyviame centre surišamas kitaip negu citozinas (Neely ir kt., 2005), lieka neaišku, ar šiuo metodu gauti rezultatai gali būti pritaikyti reakcijai su natūralia DNR aprašyti. Be to iki šiol nebuvo metodo, leidžiančio tiesiogiai stebėti kovalentinę citozino aktyvaciją.

Šiame darbe buvo analizuojami du M.HhaI katalizuojamos reakcijos aspektai. Pirma, pasinaudojant gausia struktūrine ir biochemine informacija, kryptingos evoliucijos būdu M.HhaI atpažįstamas taikinyš GCGC buvo pakeistas į GCG. Taip buvo sukurta naujo, gamtoje iki šiol neaptikto specifiškumo DNR MTazė, galinti būti naudinga įrankiu tiriant aukštesniųjų eukariotų epigenetinius mechanizmus. Gauti rezultatai taip pat suteikė naujų fundamentinių duomenų apie specifinių DNR sekų atpažinimo mechanizmą.

Antroje darbo dalyje buvo toliau tyrinėjami iki šiol mažai suprantami M.HhaI katalitinio mechanizmo aspektai – greiti baltymo ir DNR konformaciniai virsmai, vykstantys prieš metilgrupės pernašą. Šių tyrimų metu buvo sukurtas naujas metodas, leidžiantis tiesiogiai stebėti citozino išsukimą iš DNR spiralės ir kovalentinės jungties su baltymų susidarymą, matuojant šių procesų sukeltą UV absorbcijos pokyčius.

Pagrindiniai darbo tikslai

1. Eksperimentiškai ištirti naują pakeisto specifiškumo katalitiškai efektyvių DNR citozino-5 metiltransferazių kūrimo strategiją:

- a) racionalios baltymų inžinerijos ir kryptingos evoliucijos *in vitro* metodais funkciškai pašalinti antrą M.HhaI atpažinimo kilpą, siekiant pakeisti taikinio specifiškumą iš GCGC į GCG;
 - b) ištirti naujo specifiškumo MTazės variantų katalitines savybes ir taikinio specifiškumą;
 - c) ištirti pakeistų aminorūgščių įtaką MTazės sąveikai su DNR ir kofaktoriumi bei jo analogais.
2. Eksperimentiškai ištirti galimybę tiesiogiai stebėti taikinio citozino išsukimą iš DNR dvigrandės spiralės ir jo kovalentinę aktyvaciją M.HhaI aktyviame centre, matuojant šiuos procesus lydinčius UV absorbcijos pokyčius.
 3. Naudojant naujai sukurtą ir žinomus tyrimo metodus, kinetiškai charakterizuoti citozino išsukimo, jo kovalentinės aktyvacijos, baltymo katalitinės kilpos uždarymo ir metilgrupės pernešimo greičius M.HhaI katalitinio ciklo metu.

Mokslinis naujumas

Šio darbo metu pirmą kartą sukonstruota naujo specifiškumo DNR C5-metiltransferazė, pasižyminti dideliu katalitiniu efektyvumu ir sekos selektyvumu. Pirmą kartą eksperimentiškai patvirtinta efektyvių naujo specifiškumo DNR C5-MTazių kūrimo strategija, pašalinant vieno iš dviejų taikinio atpažinimo elementų funkciją. Taip pat pirmą kartą DNR metiltransferazių pavyzdžiu pademonstruotas bendras DNR-baltymo sąveikos principas, kad specifinių kontaktų su DNR bazėmis praradimas pablogina fermento katalitinį efektyvumą, tačiau tai galima kompensuoti sustiprinant nespecifinius kontaktus tarp baltymo ir DNR fosfodiesterinio karkaso.

Pirmą kartą tiesiogiai realiu laiku stebėtas citozino išsukimas iš DNR dvigrandės spiralės ir jo kovalentinė aktyvacija DNR metiltransferazės katalitiniame centre, registruojant šiuos virsmus lydinčius mažus UV absorbcijos pokyčius. Pirmą kartą parodyta, kad M.HhaI katalizuojamoje

reakcijoje citozinas išsukamas ir katalitinė kilpa užsidaro sinchroniškai. Šio virsmo greitį ženkliai sąlygoja taikinio bazių poros stiprumas. Pirmą kartą nustatytas citozino kovalentinės aktyvacijos greitis ir parodyta, kad metilgrupės pernaša yra vėlesnė katalitinio ciklo stadija.

Praktinė reikšmė

Sukurta DNR C5-MTazė gali tapti naudingu įrankiu eukariotų palaikančiojo metilinimo tyrimuose. Kadangi GCG nėra palindrominė seka, naujo specifiškumo MTazė (DNR hemimetilazė) gali būti naudojama ilgoms CG taikiniuose hemimetilintoms DNR molekulėms gauti *in vitro* arba *in vivo*. Tokia DNR yra pagrindinis palaikančiųjų DNR MTazių substratas eukariotų ląstelėse. Sukonstruota naujo specifiškumo MTazė gali būti pritaikyta mTAG technologijoje funkcinių ir reporterinių grupių įvedimui GCG sekose.

Sukurtas pirmas metodas, suteikiantis galimybę stebėti citozino išsukimą iš DNR dvigrandės spiralės ir kovalentinę aktyvaciją natūralioje DNR, nenaudojant sintetinių nukleotidų. Kadangi hiperchrominis efektas – fundamentali nukleorūgščių molekulių savybė, šį metodą galima pritaikyti daugelio bazę iš RNR arba DNR išsukančių baltymų tyrimui, nepriklausomai nuo bazės prigimties.

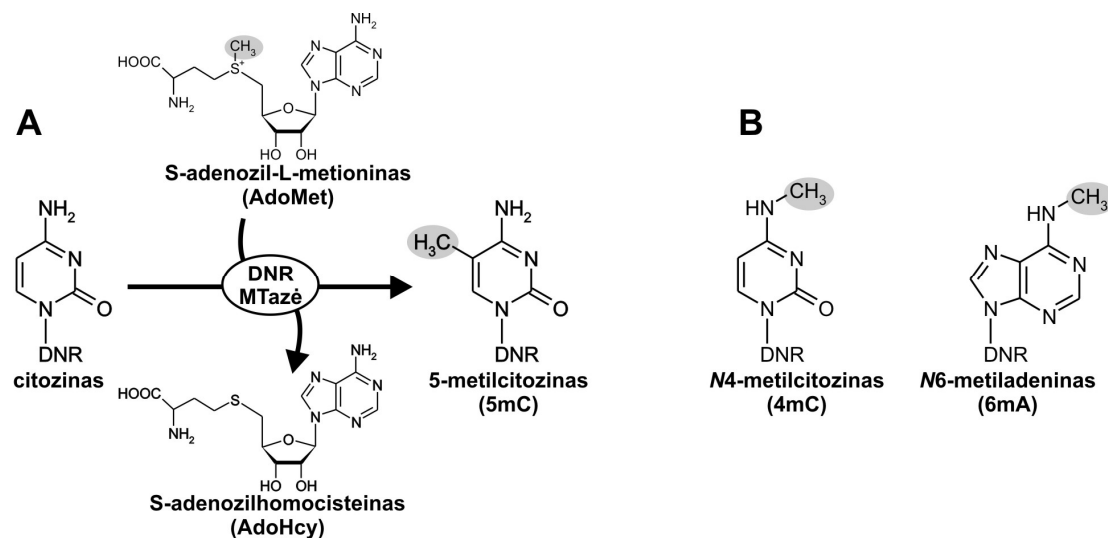
Darbe ginami teiginiai

1. Pademonstruota galimybė (*proof of principle*) kurti naujo specifiškumo DNR citozino-5 metiltransferazes racionalios baltymų inžinerijos ir kryptingos evoliucijos metodais pašalinant vieno iš dviejų taikinio atpažinimo elementų funkciją.
2. Pašalinus taikinio atpažinimo elementą, prarastus specifinius baltymo kontaktus su DNR taikinio bazėmis galima kompensuoti stiprinant nespecifinius kontaktus tarp baltymo ir DNR fosfodiesterinio karkaso.
3. Naujai sukonstruotos GCG taikinį atpažįstančios DNR hemimetilazės katalitinis efektyvumas ir sekos selektyvumas yra palyginami su laukinio tipo MTazėmis.

4. Sukonstruota naujo specifiškumo MTazė katalizuoja didesnių negu metilas grupių pernešimą nuo AdoMet analogų, todėl gali būti naudojama mTAG technologijoje gamtinių DNR žymėjimui.
5. Registruojant mažus UV absorbcijos pokyčius nemodifikuotuose DNR substratuose galima tiesiogiai stebėti M.HhaI sąlygotą citozino išsukimą iš dvigubos spirālės bei citozino kovalentinę aktyvaciją M.HhaI katalitiniame centre.
6. M.HhaI katalizuojamoje reakcijoje citozinas išsukamas ir katalitinė kilpa užsidaro sinchroniškai. Šio virsmo greitį ženkliai įtakoja taikinio bazių poros stiprumas.
7. Kovalentinė citozino aktyvacija ir metilgrupės pernešimas yra kinetiškai netapačios M.HhaI katalitinio ciklo stadijos.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

DNR metiltransferazės (MTazės) atpažįsta specifinę 2-8 bp ilgio DNR seką ir katalizuoja metilo grupės pernešimą nuo kofaktoriaus *S*-adenozil-L-metionino (AdoMet) ant šioje sekoje esančio citozino arba adenino. Pagal metilinamo atomo prigimtį (o kartu ir pagal katalizuojamos reakcijos mechanizmą) DNR metiltransferazės skirstomos į dvi klases. Pirmajai klasei priskiriamos citozino-5 MTazės (C5-MTazės), kurios metilina pirimidino žiedo anglies atomą, susidarant 5-metilcitozinui (5mC) (**1.1 pav. A**). Antrajai klasei – amino metiltransferazėms (N-MTazėms) – priklauso fermentai, modifikuojantys egzociklinę citozino arba adenino aminogrupę, susidarant atitinkamai *N*4-metilcitozinui (4mC) arba *N*6-metiladeninui (6mA) (**1.1 pav. B**) (Wilson ir Murray, 1991; Dryden, 1999). Parodyta, kad kai kurios adenino-6 MTazės sugeba metilinti citozino *N*4 padėtį (Jeltsch ir kt., 1999). Šis faktas byloja apie analogišką N-MTazių veikimo mechanizmą.



1.1 paveikslas. DNR metilinimas. **A** – DNR C5-MTazių katalizuojama reakcija. **B** – N-MTazių katalizuojamos reakcijos produktai. Pernešama metilgrupė pavaizduota pilkame fone.

1.1. DNR metilinimas prokariotuose

Prokariotų DNR aptinkami visos trys metilintos bazės – 4mC, 5mC ir 6mA. Dauguma bakterinių metiltransferazių priklauso restrikcijos-modifikacijos (RM) sistemoms. RM sistemos apima du fermentinius aktyvumus – endonukleazinį ir DNR metiltransferazinį, – kurie gali būti apjungti į vieną multifunkcinį kompleksą arba priklausyti atskiriems savarankiškiems baltymams (Wilson ir Murray, 1991). Abu fermentai specifiškai atpažįsta tą pačią 4-8 bp ilgio DNR seką. Metiltransferazė modifikuoja šioje sekoje esantį citoziną arba adeniną, ir taip apsaugo ląstelės šeimininko DNR nuo tai pačiai RM sistemai priklausančios endonukleazės, skeliančios DNR tik tada, jei jos atpažįstamas taikinytis nėra modifikuotas. Manoma, kad RM fermentai sudaro primityvią bakterijų “imuninę sistemą”, įgalinančią apsisaugoti nuo bakteriofagų infekcijos. Į ląstelę patekusią nemetilintą fago DNR sukarpo endonukleazė, o pačios bakterijos genomą apsaugo atitinkama metiltransferazė (Wilson ir Murray, 1991; Raleigh ir Brooks, 1998).

Egzistuoja ir alternatyvi teorija, teigianti, kad RM sistemos yra savanaudiški genomo parazitai, nesuteikiantys ląstelei jokio pranašumo. Ši nuomonė grindžiama pastebėjimais, kad praradusios kai kurias RM ląstelės žūva. Bakterijai dalijantis, į dukterines ląsteles patenka metiltransferazė ir restrikcijos endonukleazė. Jei dukterinė ląstelė praranda RM koduojančius genus, citoplazmoje likusios metiltransferazės kiekis pasidaro per mažas, kad galėtų pilnai modifikuoti visą genomine DNR (Kobayashi ir kt., 1999).

Bakterijose taip pat aptinkamos neįveikiančios į RM sistemų sudėtį pavienės metiltransferazės, *E.coli* Dam, CcrM ir Dcm (Palmer ir Marinus, 1994; Kossykh ir Lloyd, 2004). Geriausiai ištirta *E.coli* adenino N6-metiltransferazė Dam (atpažįstama seka GATC, metilinamas adeninas pabrauktas reguliuoja daugelio genų ekspresiją, replikacijos iniciaciją, nukleoido struktūrą, transpozonų IS10 ir IS50 transpoziciją. Po DNR replikacijos Dam metilinimas pažymi motininę DNR grandinę ir nukreipia

klaidingai suporuotų bazių reparacijos sistemos aktyvumą į naujai susintetintą DNR grandinę (apžvelgta (Dryden, 1999; Lobner-Olesen ir kt., 2005)). Kai kurie genai, kurių ekspresiją reguliuoja Dam MTazė, yra susiję su patogeniškumu. Nustatyta, kad *S. enterica* dam⁻ mutantai buvo nevirulentiniai ir galėjo būti panaudoti pelėse kaip gyva vakcina (Heithoff ir kt., 1999). Dam⁻ mutantacijos taip pat susilpnino *Haemophilus influenzae* virulentiškumą (Watson ir kt., 2004). Kadangi žinduoliams nėra būdingas adenino metilinimas, Dam MTazė galėtų tapti naujų antibiotikų taikiniu.

Savita DNR metiltransferazių grupė rasta fagų genomuose. Geriausiai apibūdintos *Bacillus* fagų koduojamos multispecifinės DNR C5-MTazės (Noyer-Weidner ir Trautner, 1993). Kiekviena jų atpažįsta 2-4 skirtingus palindrominius DNR taikinius ir gali efektyviai apsaugoti fago DNR nuo infekuojamos bakterijos RM sistemai priklausančios.

1.2. DNR metilinimas eukariotuose

1.2.1. DNR metilinimo funkcijos eukariotuose

Aukštesniųjų eukariotų ląstelėse aptinkamas tik 5-metilcitozinas, kuris sudaro 3-8% visų genome esančių citozinų, ir dažniausiai randamas 5mCpG dinukleotiduose. Žmogaus somatinėse ląstelėse apie 70-80% CpG sekose esančių citozinų yra metilinti (Bird, 1999). Kartu su potransliacinėmis histonų modifikacijomis ir nekoduojančiomis RNR, 5mC yra vienas iš eukariotinės ląstelės epigenetinių žymenų: citozino metilinimas praplečia užkoduotos informacijos kiekį, nekeisdamas DNR sekos. Todėl nei 5mC kiekis, nei jo pasiskirstymas genome nėra atsitiktiniai.

Apie 50% nemetilintų CpG sutelkta 0,5-2 kb ilgio regionuose, vadinamuose CpG salomis, kurios sudaro apie 1% genomo ir kuriose randama ~15% visų genome esančių CpG sekų. CpG salos dažniausiai yra netoli promotorių ar pirmuosiuose genų egzonuose ir jų metilinimas koreliuoja su geno transkripcijos inaktyvacija (Ng ir Bird, 1999). DNR metilinimas įtakoja genų raišką keliais būdais: tiesiogiai blokuoja transkripcijos aktyvatorių

prisijungimą arba tarpininkaujant metilcitoziną surišantiems baltymams pritraukia į metilintą lokusą histonų acetilazės arba metiltransferazės. Taip pat buvo nustatyta, kad DNR metiltransferazės gali sąveikauti tiesiogiai su histonų metiltransferazėmis ir pritraukti į tam tikrą DNR lokusą chromatino permodeliavimo sistemas (Klose ir Bird, 2006). Kovalentinės histonų modifikacijos savo ruožtu keičia chromatino kompaktiškumą ir DNR prieinamumą transkripcijoje dalyvaujantiems baltymams. Tokiu būdu DNR metilinimas iššaukia chromatino kompaktizaciją ir transkripciškai neaktyvaus heterochromatino susidarymą. Ryšys tarp histonų modifikacijų ir DNR metilinimo yra sudėtingas ir iki galo neišaiškintas. Žinoma, kad skirtingose sistemose tiek DNR metilinimas gali iššaukti histonų deacetilinimą ir heterochromatino susidarymą, tiek heterochromatinui būdingos histonų modifikacijos gali sukelti DNR metilinimą (apžvelgta (Cedar ir Bergman, 2009)). Ankstyvoje embriogenezėje sukurtas DNR metilinimo pobūdis išlieka ląstelėms dalijantis mitozės būdu, todėl DNR metilinimas yra vienas iš pagrindinių mechanizmų, užtikrinančių stabilų heterochromatino struktūros palaikymą ir genų nutildimą ląstelių diferenciacijos metu.

Citozino metilinimas svarbus gemalo vystimuisi, ląstelių diferenciacijai, X chromosomos inaktyvacijai, transpozonų ir retrovirusinių elementų transkripcijos represijai, imprintingui. Metilinimo pobūdžio ir lygio pakitimai stebimi vėžio ir kai kurių paveldimų neurodegeneracinių sindromų (Fragile X, ICF) atveju (apžvelgta (Robertson ir Wolffe, 2000; Tycko, 2000)). Daugėja duomenų, kad metilinimo pakitimai gali būti susiję ir su kitomis kompleksinėmis ligomis, pavyzdžiui, diabetu ir šizofrenija (Wong ir kt., 2005; Pogribny ir Beland, 2009). Monozigotinių dvynių tyrimai parodė, kad DNR metilinimo pokyčiai vyksta gyvenimo metu, ir su amžiumi dvyniai vis daugiau skiriasi vienas nuo kito (Fraga ir kt., 2005; Whitelaw ir Whitelaw, 2006). Šiuos skirtumus gali lemti atsitiktiniai arba aplinkos nulemti metilinimo profilio pokyčiai, kurie savo ruožtu gali lemti dvyniams skirtingą tikimybę susirgti viena ar kita liga.

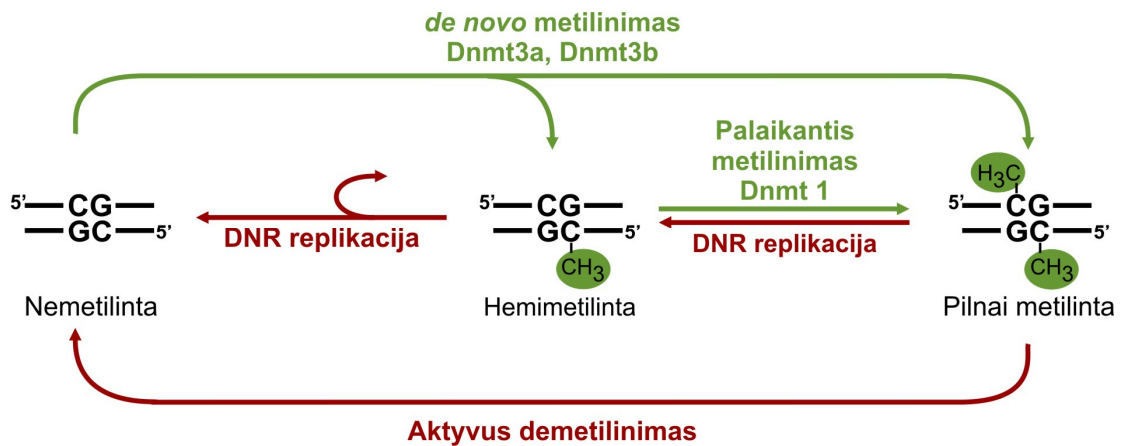
Kadangi DNR metilinimo profilis sukuriamas labai ankstyvoje embriono vystimosi stadijoje, manoma, kad aplinkos poveikis tuo metu gali turėti lemiamos įtakos organizmui. Tai buvo vaizdžiai pademonstruota tiriant peles, turinčias geno, reguliuojančio kailio spalvą, mutacijas. Šiame darbe nustatyta, kad jeigu patelė gaudavo metilgrupės donorais (vitaminas B12, folinė rūgštis, betainas) praturtintą dietą, jos palikuonims buvo būdingas stipresnis tiriamo DNR lokuso metilinimas, kuris pasireiškė geno inaktyvacija ir juoda kailio spalva (Waterland ir Jirtle, 2003). Įdomu, kad šis efektas iš dalies buvo paveldimas: juodos pelės susilaukdavo daugiau tamsaus kailio palikuonių. Neseniai paskelbta žmonių epidemiologinė studija parodė, kad bado metu gimusiems žmonėms net praėjus 60 metų buvo būdingas mažesnis imprintuoto lokuso IGF2 metilinimas negu jų broliams ir seserims, gimusiems ne bado metu (Heijmans ir kt., 2008). Taigi DNR metilinimas gali būti labai svarbus mechanizmas, dar vystimosi metu paruošiantis organizmą jo laukiančioms aplinkos sąlygoms.

1.2.2. Žinduolių DNR metiltransferazės

Eukariotinių C5-MTazių katalizės mechanizmas analogiškas prokariotinėms MTazėms (Cheng ir Blumenthal, 2008). Tai atsispindi ir jų aminorūgščių sekoje – eukariotinių MTazių C-galinėje dalyje aptinkami prokariotiniams fermentams būdingi konservatyvūs amr. motyvai (žiūr. **1.3.1 skyrių**). Tačiau tai žymiai didesni ir sudėtingesnės struktūros baltymai. MTazių aktyvumą ir nukreipimą į tam tikras genomo vietas lemia sudėtinga sąveika su kitais genų raiškos reguliacijoje dalyvaujančiais baltymais. Šioje sąveikoje dalyvauja didelis N-galinis domenai, nebūdingas prokariotiniams fermentams. Žinduolių metiltransferazės skirstomos į tris šeimas, atliekančias ląstelėje skirtingas funkcijas (**1.2 pav.**) (Goll ir Bestor, 2005).

Pirmajai šeimai priklauso DNR MTazė Dnmt1. Tai didžiausia iš visų metiltransferazių, o jos reguliacinis N-galinis domenai ~2 kartus didesnis negu katalitinis. Dnmt1 efektyviau metilina hemimetilintas DNR sekas negu

nemetilintas, todėl jai priskiriamas palaikančiojo metilinimo vaidmuo. Dnmt1 geno inaktyvacija nužudo organizmą ankstyvoje embriogenezėje.



1.2 paveikslas. Žinduolių DNR metilinimas. Žinduolių DNR vyrauja CpG taikinių metilinimas. *De novo* metilinimas sukuria metilintus taikinius nemetilintoje DNR, o palaikantysis metilinimas po replikacijos atsiradusius hemimetilintus taikinius paverčia pilnai metilintais, užtikrindamas epigenetinės informacijos perdavimą dukterinėms ląstelėms. Žaliai pavaizduoti DNR metilinimo keliai, raudonai – keliai, vedantys demetilavimo link.

Antrajai šeimai buvo priskiriamos MTazės, neturinčios ilgo N-galinio domeno ir labai panašios į bakterinius fermentus tiek seka, tiek erdvine struktūra. Nors kai kurioms grupėms pavyko užfiksuoti silpną šios baltymo DNR metiltransferazinį aktyvumą (Hermann ir kt., 2003; Tang ir kt., 2003), vėliau buvo aiškiai pademonstruota, kad šis tai – RNR MTazė, metilinanti tRNR^{Asp} atikodono kilpos citoziną-38 (Goll ir kt., 2006).

Trečiajai šeimai priklauso dvi homologiškos MTazės Dnmt3a ir Dnmt3b bei katalitiniu aktyvumu nepasižymintis baltymas DnmtL. Dnmt3a ir Dnmt3b vienodu efektyvumu metilina nemetilintą ir hemimetilintą DNR, jų ekspresijos lygis didžiausias ankstyvoje vystimosi stadijose, kuomet aktyviausiai vyksta DNR metilinimas iš (Okano ir kt., 1998; Okano ir kt., 1999), todėl manoma, kad jos metilina DNR *de novo*. Nustatyta, kad Dnmt3a *in vivo* ir *in vitro* gali modifikuoti ne tik CpG, bet ir CpT bei CpA sekas. Dnmt3L sąveikauja su nemetilintu histono H3 Lys4 ir DNR MTaze Dnmt3a, taigi yra svarbi aktyvuojant Dnmt3a ir nukreipiant jos aktyvumą į imprintingo reguliuojamus genus (Jia ir kt., 2007).

1.3. DNR citozino-5 metiltransferazių struktūrinė organizacija

1.3.1. DNR C5-MTazių aminorūgščių sekos organizacija

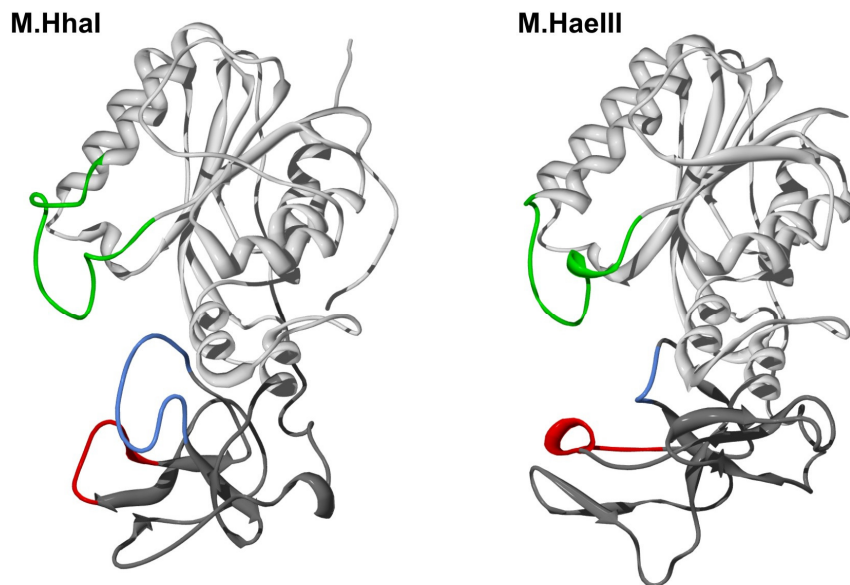
C5-MTazės pasižymi dideliu amr. sekų panašumu ir pastovia pirminės struktūros organizacija. Tai leidžia manyti, kad šiems fermentams būdingi panašūs erdvinės struktūros suformavimo principai ir bent jau kai kurie sąveikos su substratu bei kofaktoriumi ir katalizės aspektai (Lauster ir kt., 1989). DNR C5-metiltransferazių aminorūgščių sekose identifikuojama dešimt nekintama tvarka išsidėsčiusių konservatyvių motyvų (KM), kuriuos vieną nuo kito atskiria neilgi variabilūs regionai (**1.3 pav.**) (Posfai ir kt., 1989; Kumar ir kt., 1994). Šeši KM (I, IV, VI, VIII, IX ir X) apibūdinami kaip labiau konservatyvūs ir aptinkami daugumoje C5-MTazių su nežymiomis konservatyvių aminorūgščių variacijomis. Likusių keturių motyvų (II, III, V ir VII) sekos labiau heterogeniškos, be to kai kuriose metiltransferazėse jie visai neaptinkami. Dauguma konservatyvių pozicijų sutelkta N- ir C-galinėse baltymo dalyse, apimančiose atitinkamai apie 200 ir apie 50 aminorūgščių. Ilgiausias variabilus aminorūgščių sekos regionas aptinkamas tarp VIII ir IX konservatyvių motyvų. Remiantis konservatyvių motyvų sekomis ir C5-MTazėms būdinga jų išsidėstymo tvarka, pagal aminorūgščių palyginius buvo surastos žinduolių metiltransferazės Dnmt3a ir Dnmt3b (Okano ir kt., 1998), augalo *Arabidopsis thaliana* C5-MTazės MET, CMT ir DRM (Cao ir kt., 2000), o taip pat savo seka ir struktūra labai panaši į DNR C5-MTazės, bet tRNR^{Asp} metilinti Dnmt2 (Yoder ir Bestor, 1998; Okano ir kt., 1998).

Dėl didelio panašumo, būtent MTazių sekos naudojamos restrikcijos-modifikacijos sistemų paieškai naujai nustatytose genomų ir metagenomų sekose. Kadangi visus RM sistemų komponentus koduojantys genai dažniausiai yra netoli vienas nuo kito (Roberts ir kt., 2005), pagal KM sekas ir būdingą jų išsidėstymo tvarką identifikavus DNR MTazę (-es), galima nesunkiai surasti ir naujai aptiktos RM sistemos endonukleazę, kai tuo tarpu pačios REazės tarpusavyje dažniausiai nėra panašios. Didelis C5-MTazių giminingumas taip pat suteikia galimybę remiantis amr. sekų palyginiais ir

Įdomu, kad atlikus erdvinių struktūrų analizę, visi, išskyrus IX KM, buvo rasti ir N-MTazėse, tačiau jų išsidėstymo tvarka skiriasi nuo C5-MTazėse stebimo eiliškumo, taip pat N-MTazėse skiriasi katalitinio (IV) motyvo seka. Todėl pagal aminorūgščių sekų palyginius galima aptikti ne tik C5-MTazes, bet ir N-MTazes, o taip pat atskirti jas vienas nuo kitų (Malone ir kt., 1995).

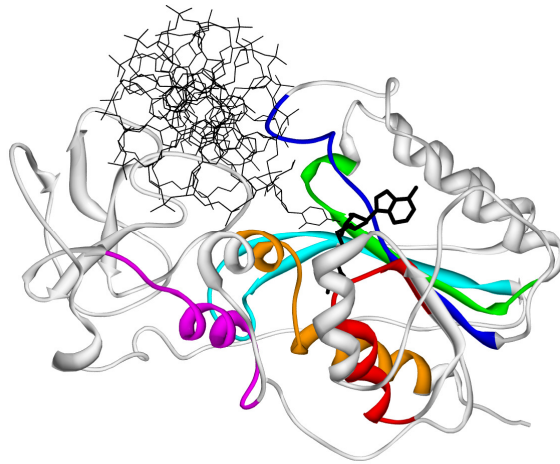
1.3.2. MTazių katalitinio domeno struktūra

Iš M.HhaI (Cheng ir kt., 1993; Klimašauskas ir kt., 1994) ir M.HaeIII (Reinisch ir kt., 1995) kompleksų su DNR erdvinių struktūrų matyti, kad šie baltymai sudaryti iš dviejų nevienodo dydžio domenų, kuriuos skiriančiame plyšyje jungiasi DNR (**1.4 pav.**). Didžiajame domene telkiasi konservatyvūs motyvai, formuojantys katalitinį (IV, VI ir VIII KM) ir kofaktoriaus surišimo (I, II, III, V ir X KM) centrus (**1.5 pav.**). Didžiąją mažojo domeno dalį formuoja variabilus regionas, sudarantis daugumą specifinių kontaktų su atpažįstamos sekos bazėmis. IX KM glaudžiai sąveikauja su variabiliu regionu, sudarydamas mažojo domeno struktūrinį karkasą.



1.4 paveikslas. M.HhaI ir M.HaeIII erdvinės struktūros. Katalitinis domenas šviesiai pilkas, TAD – tamsiai pilkas, katalitinė kilpa žalia, atpažinimo Kilpa-1 raudona, Kilpa-2 – mėlyna. Paveiksle pavaizduotos trinarių kompleksų M.HhaI-DNR-AdoHcy (O'Gara ir kt., 1996a) ir M.HaeIII-DNR-AdoHcy (Reinisch ir kt., 1995) struktūros (PDB kodai 3mht ir 1dct).

Tokia domeninė struktūra aptikta ir kitose DNR MTazių struktūrose: N6-adenino MTazių TaqI (Labahn ir kt., 1994), DpnII (Tran ir kt., 1998) ir RsrI (Scavetta ir kt., 2000) bei N4-citozino MTazės PvuII (Gong ir kt., 1997). Manoma, kad analogiška struktūra būdinga ir kitoms DNR MTazėms. Taigi DNR MTazių katalitinę ir taikinio atpažinimo funkcijas atliekantys baltymo elementai yra atskirti erdvėje.



1.5 paveikslas. Konservatyvūs aminorūgščių sekos motyvai erdvinėje M.HhaI struktūroje. Konservatyvūs amr. sekos motyvai I, IV, VI, VIII, IX ir X KM atitinkamai pažymėti raudona, mėlyna, žalia, žydra, rožine ir oranžine spalvomis (taip pat kaip **1.3 pav.**); DNR pavaizduota juodai, AdoHcy – juodas ir paryškintas. Pveiksle pavaizduota trinario M.HhaI-DNR-AdoHcy komplekso struktūra (PDB kodas 3mht) (O'Gara ir kt., 1996a).

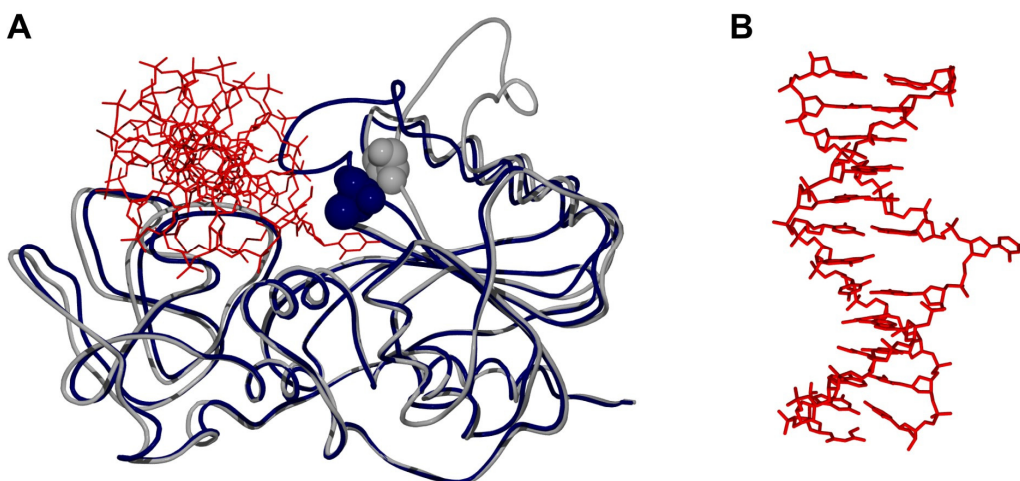
M.HhaI ir M.HaeIII katalitiniam domeniui būdinga mišri $\alpha/\beta/\alpha$ tipo erdvinė struktūra. Iš septynių β -klosčių sudarytą centrinį β -lakštą iš abiejų pusių gaubia penkios α -spiralės (dvi iš viršaus ir trys iš apačios) (Cheng ir kt., 1993; Reinisch ir kt., 1995). Dauguma DNR C5-MTazių nekintamų aminorūgščių, priklausančių konservatyviems motyvams, išsidėstę β -klosčių C-galuose arba kilpose tarp jų ir dalyvauja katalitinio centro sudaryme bei kofaktoriaus AdoMet surišime (Kumar ir kt., 1994; Schluckebier ir kt., 1995). Eukariotinių MTazių Dnmt3a ir Dnmt1 katalitinio domeno struktūra labai panaši (Jia ir kt., 2007; Song ir kt., 2010).

Išanalizavus N-MTazių erdvinės struktūras, nustatyta, kad analogiškas funkcijas atliekančios aminorūgštys N-MTazėse užima ekvivalentišką padėtį

erdvėje ir antrinės struktūros elementų atžvilgiu kaip ir C5-MTazėse (Labahn ir kt., 1994; Schluckebier ir kt., 1995; Gong ir kt., 1997). Įdomu, kad nepaisant skirtingo N- ir C5-MTazių katalitinio mechanizmo, ne tik AdoMet surišančių, bet ir katalitinių aminorūgščių padėtis erdvėje panaši.

1.4. C5-metiltransferazių sąveika su metilinama DNR

M.HhaI sąveikos su DNR metu stipriai keičiasi tiek baltymo, tiek DNR konformacija (**1.6 pav.**) (Cheng ir kt., 1993; Klimašauskas ir kt., 1994). Dvigrandėje B-DNR esančio citozino penkta ir šešta padėtys yra neprieinamos cheminei modifikacijai, todėl tam, kad patektų į aktyvų centrą, metilinamas citozinas yra pilnai išsuktas iš DNR dvigubos spiralinės, o kaimyniniai nukleotidai išlaiko B-DNR būdingas padėtis. Trys erdviškai atskirtos baltymo dalys sąveikauja su DNR: dvi mažajam domeniui priklausančios glicinu turtingos kilpos (233-240 ir 250-257 amr.) bei aktyvaus centro kilpa (80-99 amr.) iš didžiojo domeno. Prisijungiant substratui, aktyvaus centro kilpa juda DNR surišimo plyšio link, priartindama katalitinio Cys81 tiolinę grupę prie metilinamo citozino. Užsidarius katalitinei kilpai, susiformuoja fermento aktyvus centras. Tuo pat metu šiek tiek DNR surišimo plyšio link pasislenka ir mažasis domenas.

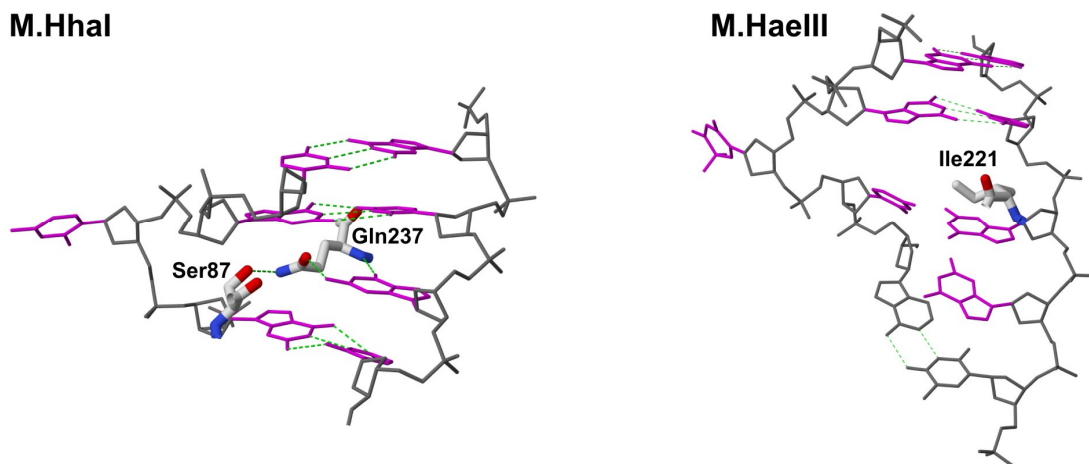


1.6 paveikslas. Baltymo ir DNR konformaciniai pokyčiai M.HhaI-DNR komplekse. A – MTazės konformacijos be DNR (pilka) ir komplekse su DNR (mėlyna); sferomis pavaizduotas katalitinis Cys81; DNR raudona. B – DNR

konformacija trinariame komplekse M.HhaI-DNR-AdoHcy. Paveikslas paruoštas naudojant dvinario M.HhaI-AdoMet (Cheng ir kt., 1993) ir trinario M.HhaI-DNR-AdoHcy (O'Gara ir kt., 1996a) kompleksų struktūras (PDB kodai 1hmy ir 3mht).

1.4.1. Bazės išsukimas – stereocheminė citozino aktyvacija

Išsukus taikinio nukleotidą, baltymas kompensuoja trūkstamus vandenilinius ryšius, kad nebūtų suardyta B-DNR struktūra: M.HhaI atveju išsukto citozino vietą DNR spiralėje užima Gln237 ir Ser87. Gln237 sudaro tris vandenilinius ryšius su likusiu be poros guaninu, o Ser87 sąveikauja su Gln237, stabilizuodamas jo konformaciją (1.7 pav.) (Klimašauskas ir kt., 1994).



1.7 paveikslas. Išsukto citozino stabilizacija M.HhaI ir M.HaeIII kompleksuose su DNR. DNR fosfodiesterinis karkasas ir bazės už taikinio sekos pilkos, taikinio sekos bazės rožinės, vandenilinės jungtys pažymėtos žaliomis punktyrinėmis linijomis. Parodytos aminorūgštys, išsukto citozino vietoje įsiterpiančios į DNR. Šiame ir kituose struktūras vaizduojančiuose paveiksluose atomams pavaizduoti naudojamos standartinės spalvos: anglis – pilka, azotas – mėlynas, deguonis – raudona, siera – geltona, fosforas oranžinis. Paveikslas paruoštas naudojant trinarių kompleksų M.HhaI-DNR-AdoHcy (O'Gara ir kt., 1996a) ir M.HaeIII-DNR-AdoHcy (Reinisch ir kt., 1995) struktūras (PDB kodai 3mht ir 1dct).

M.HaeIII (GGCC) stabilizuoja DNR kitaip: išsuktam citozinui komplementarus guaninas nesudaro vandenilinių ryšių su baltymu, bet suformuoja Watson-Crick bazių porą su išoriniu taikinio citozinu. Likęs be poros 3'-guaninas sudaro vandenilinius ryšius su Arg243. Tokiu būdu DNR

deformuojama labiau nei komplekse su M.HhaI (**1.7 pav.**). Toks bazių porų persitvarkymas įmanomas tik tose sekose, kuriose po metilinamo citozino yra kitas citozinas. Taigi M.HaeIII komplekso su DNR struktūra iliustruoja galimybę, kad specifinį taikinio atpažinimo būdą gali apspręsti nuo sekos priklausomas DNR deformuojamumas (Reinisch ir kt., 1995). Pastebėta, kad fermentai, kurių atpažįstamoje sekoje už metilinamo citozino yra guaninas (pvz. M.HhaI – GCGC), lenkia DNR mažesniu kampu nei tos MTazės, kurių taikinio analogiškoje pozicijoje yra kitas citozinas (pvz. M.HaeIII – GGCC). Šie rezultatai taip pat liudija, kad, priklausomai nuo metilinos sekos, C5-MTazės gali naudoti taikinio atpažinimui skirtingus mechanizmus (Rasko ir kt., 2000).

Įdomu tai, kad pirminiam DNR susirišimui ir modifikuojamo nukleotido išsukimui heterociklinės bazės prigimtis nėra svarbi (Yang ir kt., 1995; Klimašauskas ir Roberts, 1995). Dvinariame komplekse M.HhaI netgi stipriau sąveikauja su DNR substratais, turinčiais klaidingai suporuotą taikinio nukleotidą, negu su natūraliu taikiniu. Šios savybės dėka M.HhaI bazės išsukimo tyrimui gali būti naudojama DNR, turinti fluorescuojantį nukleotidą 2-aminopuriną (P) taikinio citozino vietoje (žiūr. **1.4.2 skyrių**). Tik prisijungus kofaktoriui, užsidarius katalitinio centro kilpai ir pilnai susiformavus aktyviam centrui išryškėja baltymo specifiškumas citozinui, kuris geriausiai (lyginant su uracilu ir reakcijos produktu 5-metilcitozinu) atitinka aktyvaus centro geometriją (Klimašauskas ir Roberts, 1995). Taigi esant kofaktoriumi, M.HhaI pasižymi didžiausiu giminingumu natyviam taikiniui

1.4.2. Bazės išsukimo tyrimas

M.HhaI bazės išsukimas tirtas BMR, fluorescencinės spektroskopijos, cheminės DNR modifikacijos, struktūriniais ir bioinformatiniais metodais (apžvelgta (Klimašauskas ir Liutkevičiūtė, 2009)).

Bazės išsukimo fenomenas buvo atrastas nustačius M.HhaI kovalentinio komplekso su DNR struktūrą (Klimašauskas ir kt., 1994). Šioje struktūroje fermento aktyviame centre buvo aptiktas išsuktas 5-fluorocitozinas, sudarantis

kovalentinę jungtį su katalitiniu Cys81. Vėliau nustatytose struktūrose į M.HhaI aktyvų centrą buvo išsukti citozinas, 5-metilcitozinas (O'Gara ir kt., 1996a), uracilas, o taip pat purinai – adeninas (O'Gara ir kt., 1998) ir 2-aminopurinas (Neely ir kt., 2005). Įdomu, kad metinamo citozino vietoje esant bebaziam taikiniui, jo ribozė taip pat išsukama (O'Gara ir kt., 1998).

Išsuktą bazę galima aptikti pagal didesnę jos cheminį reaktyvumą, lyginat su dvigrandėje spiralėje esančiomis bazėmis. Šiuose eksperimentuose baltymo-DNR kompleksas pirmiausiai veikiamas cheminiais reagentais, selektyviai reaguojančiais su dvigrandėje spiralėje sunkiai prieinamomis heterociklinių bazių pozicijomis. Po to veikiant piperidinu DNR skeliama ties modifikacijos vietomis ir trūkių vietos vizualizuojamos atliekant elektroforezę denatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje. Pavyzdžiui, M.HhaI sąveikaujant su DNR taikinio vietoje turinčia T:G bazių porą, stebimas padidėjęs išsukamo timino reaktyvumas su KMnO_4 (Serva ir kt., 1998). Neseniai aprašytas analogiškas metodas išsukto citozino aptikimui baltymų-DNR kompleksuose, remiantis padidėjusiu išsukto citozino reaktyvumu su chloroacetaldehidu (Daujotyte ir kt., 2008; Liutkevičiūtė ir kt., 2009). Šiuo metodu buvo pademonstruotas MTazių HhaI, SssI, AluI ir REazių PspGI bei Ecl18kI katalizuojamas citozino išsukimas.

Bazės išsukimo tyrimams dažnai naudojami DNR substratai, išsukamos bazės vietoje turintys 2-aminopuriną (P). M.HhaI stipriai suriša tokią DNR ir išsuka 2-aminopuriną į aktyvų centrą. Išsukto ir nebesudarančio sanklodos sąveikų 2-aminopurino fluorescencija išauga ~50 kartų (Holz ir kt., 1998). Taip pat pasikeitus aplinkai, stipriai pasikeičia 2-aminopurino fluorescencijos gesimo profilis, matuojant fluorescencijos signalą laike (*time resolved fluorescence*) (Neely ir kt., 2005), ir tai tiksliausiai nurodo, kad 2-aminopurinas yra išsuktas iš DNR. Tokiu būdu buvo nustatyta, M.HhaI asociacija su DNR yra labai greita, ribojama difuzijos greičio, o 2-aminopurinas išsukamas dviem stadijomis: labai greitą pradinį bazės išsukimą ($>2000 \text{ s}^{-1}$) seka lėtesnis komplekso persitvarkymas ($20\text{-}30 \text{ s}^{-1}$) (Vilkaitis ir kt., 2000). Tačiau P:G yra silpna bazių pora, o 2-aminopurino struktūra skiriasi nuo citozino, todėl

neaišku, kaip gerai gauti rezultatai apibūdina procesus, vystančius M.HhaI reaguojant su natūraliu taikiniu.

Norint patikrinti, ar M.HhaI mutantai neprarado sugebėjimo išsukti bazę, buvo panaudota H5 pakeitimo į deuterį reakcija, galinti vykti tik esant išsuktam taikinio citozinui (**1.8 pav. C**) (Daujotytė ir kt., 2004; Merkienė ir Klimašauskas, 2005). Lyginant su kitais aprašytais metodais šio metodo privalumas yra tai, kad taikinio nukleotido vietoje nenaudojami bazių analogai, todėl galima vienareikšmiškai nustatyti, ar MTazė išsuka citoziną iš natūralaus substrato. Tačiau deuterio apkeitimo reakcija netinkama bazės išsukimo dinamikai tirti, nes tai – sudėtinga suminė reakcija, apimanti bazės išsukimą, kovalentinio komplekso susidarymą, deuterio prisijungimą prie C5 atomo ir po to einančią β -eliminaciją (kovalentinio komplekso iširimą). Taigi bazės išsukimas tiesiogiai nestebimas. Taip pat tokia reakcija nėra tinkama ir katalitinių mutantų, nesudarančių kovalentinės jungties, tyrimui.

Atlikus BMR matavimus, binariame M.HhaI komplekse su 5-fluorocitoziną (5FC) taikinio vietoje turinčia DNR, buvo aptiktos trys dinaminėje pusiausvyroje egzistuojančios taikinio bazės būsenos (Klimašauskas ir kt., 1998). Pirmoji, stebima ir DNR be baltymo atitinka neišsuktą taikinio bazę, antroji – išsuktą, o trečioji – išsuktą ir užrakintą (stabilizuotą) fermento aktyviame centre. AdoHcy prisijungimas stipriai pastumia pusiausvyrą pastarosios konformacijos link.

Šiuo metu dauguma autorių sutaria, kad M.HhaI būdingas aktyvus bazės išsukimas, kuomet sąveikaudamas su DNR fermentas išardo taikinio bazių porą. Tačiau daug šio proceso mechanistinių detalių tebėra neaiškios.

Kadangi specifiniai kontaktai su taikiniu susidaro didžiajame DNR griovyje, buvo padaryta prielaida, kad metilino citozino išsukimas į aktyvų centrą vyksta per DNR didįjį griovį. Nustačius, kad M.HhaI giminingumas DNR ir bazės išsukimo efektyvumas atvirkščiai koreliuoja su bazių poros stiprumu ir ištyrus M.HhaI Glu237 mutantų savybes, buvo pasiūlytas mechanizmas, pagal kurį baltymas aktyviai dalyvauja taikinio bazės išsukime (Daujotytė ir kt., 2004). Pagal šį mechanizmą pirminiame M.HhaI-DNR

komplekse susidaro specifiniai kontaktai su trimis (pirmąja, trečiąja ir ketvirtąja) taikinio bazių poromis. Struktūros modeliavimas parodė, kad tokiam komplekse Glu237 šoninė grandinė priartėja prie taikinio bazės. Manoma, kad dėl nepalankios sąveikos tarp Glu237 šoninės grandinės ir taikinio citozino aminogrupės citozinas išstumiamas iš dvigubos spirалės, o jo vietą užima Glu237, sudarantis vandenilinius ryšius su komplementariu guaninu (**1.7 pav.**). Pagal tokį modelį Glu237 atlieka dvi funkcijas – destabilizuoja neišsuktą taikinio bazę pradiniam komplekse ir stabilizuoja išsuktą citoziną neleidamas jam grįžti į DNR spiralę. Apytikriai įvertinimai rodo, kad sąveika su Glu237 suteikia apie pusę (~7 kcal/mol) pilnam citozino išsukimui reikalingos energijos. Likusią energiją galėtų suteikti dar neidentifikuotos baltymo sąveikos su DNR fosfodiesteriniu karkasu. Tokia sąveika galėtų paaiškinti, kodėl išsukamas bebazis nukleotidas (O'Gara ir kt., 1996a).

Remiantis molekulinės dinamikos skaičiavimais buvo pasiūlytas alternatyvus M.HhaI bazės išsukimo mechanizmas, pagal kurį taikinio citozinas išsukamas užsidarius katalitinei kilpai (Huang ir kt., 2003). Tokiu atveju citozino kelias aktyvaus centro link eina per DNR didįjį griovį, o citozinas juda baltymo viduje sukurtoje bevandenėje aplinkoje. Taikinio bazių porą destabilizuoja tarpinėje būsenoje susidaranti vandenilinė jungtis tarp Ser87 ir išsukamo citozino bei jo partnerio guanino, o taip pat Glu237 sankloda su išsukamu citozinu ir vandenilinė jungtis su jam komplementariu guaninu. Pagal šį modelį specifiniai kontaktai su DNR bazėmis susidaro paeiliui, ir pirminiame komplekse stebimas tik vienas specifinis kontaktas tarp Arg240 ir pirmojo taikinio guanino. Išsukamo citozino judėjimą MTazė skatina sudarydama su išsukamu citozinu daugelį sąveikų, kurios pakeičia suardytas vandenilines jungtis ir sanklodos sąveikas dvigrandėje spirалėje. Taip pat labai svarbi baltymo sukuriama bevandenė aplinka. Išsukamo citozino kelią per didįjį griovį uždaramė komplekse patvirtino ir kitos grupės atlikti skaičiavimai (Luo ir Bruice, 2005). Šiuo atveju buvo padaryta prielaida, kad bazės išsukimui svarbūs mažo dažnio baltyme vykstantys judesiai. Skaičiavimai parodė, kad

katalitinės kilpos aminorūgščių Ser85, ir Ile86 judesiai trinariame komplekse gali išjudinti taikinio nukleotido ribozę ir fosfatą. Pagal šiuos skaičiavimus išardant taikinio bazių porą svarbus Gln237.

Citozino judėjimo trajektoriją per didįjį griovį paremia M.HhaI komplekso konformaciškai suvaržytu bebaziu taikiniu kristalinė struktūra (Horton ir kt., 2004). Šioje struktūroje S (*south*) konformacijoje užfiksuota ribozė matoma DNR didžiajame griovyje, kaip manoma, pusiaukelėje į aktyvų centrą. Tačiau kita vertus tokia ribozės konformacija neįrodo, kad nukleotidas išsukamas tuo pačiu keliu, kadangi jis yra didesnis ir kelyje gali sutikti daugiau kliūčių, pavyzdžiui, konservatyvaus Thr250 šoninę grandinę. Citozino išsukimui per didįjį griovį prieštarauja ir tai, kad tiriant Ser87 mutantų biochemines savybes nebuvo patvirtinta šios amr. svarba bazės išsukimui (Z. Liutkevičiūtė, D. Daujotytė ir S. Klimašauskas, nepublikuoti rezultatai). Taip pat ir visos katalitinės kilpos pašalinimas nepanaikino M.HhaI sugebėjimo išsukti bazę (Daujotytė ir kt., 2004). Vis dėlto kol kas nepakanka duomenų, norint pilnai paaiškinti M.HhaI bazės išsukimo mechanizmą.

1.4.3. Bazės išsukimas – daugelio kitų fermentų katalitinio mechanizmo dalis

Bazės išsukimas – universalus mechanizmas, būdingas daugeliui baltymų, turinčių pasiekti ir modifikuoti heterociklines bazes (apžvelgta (Klimašauskas ir Liutkevičiūtė, 2009)). Bazes iš DNR dvigrandės spiralės išsuka N6-adenino (Goedecke ir kt., 2001) ir N4-citozino MTazės (Gong ir kt., 1997), daug DNR reparacijos fermentų, pavyzdžiui, žmogaus uracil-DNR-glikozilazė (UDG) (Slupphaug ir kt., 1996), *E.coli* endonukleazė IV (Hosfield ir kt., 1999), O6-alkilguanin-DNR alkiltransferazė (AGT) (Duguid ir kt., 2005) ir daugelis kitų. Bazės išsukimas taip pat aptiktas kai kurių restrikcijos endonukleazių (R.Hinp1I, R.Ecl18kI ir R.PspGI) (Bochtler ir kt., 2006; Horton ir kt., 2006b; Tamulaitis ir kt., 2007) sąveikos su DNR metu. Neseniai nustatyta, kad žinduolių UHRF1 baltymas, susirišantis su hemimetilintais CpG dinukleotidais ir svarbus metilinimo profilio išlaikymui, naudoja bazės

išsukimą 5mC atpažinimui (Avvakumov ir kt., 2008; Hashimoto ir kt., 2008). Tai pirmasis pavyzdys, kuomet bazę išsuka specifinę DNR seką atpažįstantis, bet jos nemodifikuojantis baltymas.

1.4.4. Katalitinės kilpos judesys

Palyginus dvinario M.HhaI-AdoMet ir trinario M.HhaI-DNR-AdoHcy kompleksų struktūras aptiktas didelis katalitinės kilpos konformacijos pokytis: kilpos viršūnėje esantis Ser87 pasislenka net per 25 Å. M.HhaI giminingumas kofaktoriui ir DNR yra ~500 kartų didesnis trinariame komplekse negu atitinkamuose dvinariuose kompleksuose. Toks giminingumo substratams padidėjimas siejamas su katalitinės kilpos užsidarymu, užrakinančiu DNR ir kofaktorių fermento aktyviame centre.

Katalitinė kilpa užsidaro ir binariame M.HhaI komplekse su DNR, kadangi nesant kofaktoriaus vyksta reakcijos, kurioms būtina kovalentinė katalizė: H5 pakeitimas į deuterį, citozino deamininimas ir reakcijos su aldehidais (Wu ir Santi, 1987; Yang ir kt., 1995; Liutkevičiūtė ir kt., 2009). Tačiau kofaktoriui tenka svarbus vaidmuo stabilizuojant trinarius kompleksus: jeigu binarinio komplekso gyvavimo laikas yra keliolika sekundžių, tai trinario inhibicinio komplekso su AdoHcy – keletas valandų (Vilkaitis ir kt., 2001). BMR matavimai taip pat parodė, kad pridėjus AdoHcy pusiausvyra pasislenka vienos išsuktos bazės konformacijos link (Klimašauskas ir kt., 1998). Manoma, kad tai atitinka kristalinėje struktūroje matomą trinarį kompleksą su uždara katalitine kilpa (Klimašauskas ir kt., 1994). Nustatyta, kad Trp41, esančio kofaktoriaus surišimo kišenėje, mutacijos ne tik ~100 kartų sumažino M.HhaI giminingumą kofaktoriui (K_D^{AdoMet} , K_M^{AdoMet}), bet ir ~10 kartų pagreitino fermento apsukas (k_{cat}) (Merkienė ir Klimašauskas, 2005). Pagal pasiūlytą kinetinį mechanizmą, bendrą reakcijos greitį limituojanti stadiją – reakcijos produktų komplekso iširimą, – inicijuoja arba katalitinės kilpos atsidarymas, arba kofaktoriaus disociacija. Taigi kofaktoriaus disociacija iš trinario produktų komplekso ir katalitinės kilpos atsidarymas po reakcijos yra stipriai susiję.

Ilgą laiką nebuvo būdų tiesioginiam katalitinės kilpos judesio tyrimui, todėl apie katalitinės kilpos konformaciją buvo sprendžiama iš kristalinių struktūrų ir MTazės-DNR komplekso judrumo poliakrilamidiniame gelyje, kuriame trinaris kompleksas su uždaryta katalitine kilpa yra kompaktiškesnis ir juda greičiau negu binaris, kuriame tikriausiai vyrauja konformerai su atvira kilpa (Klimašauskas ir Roberts, 1995; Klimašauskas ir kt., 1998).

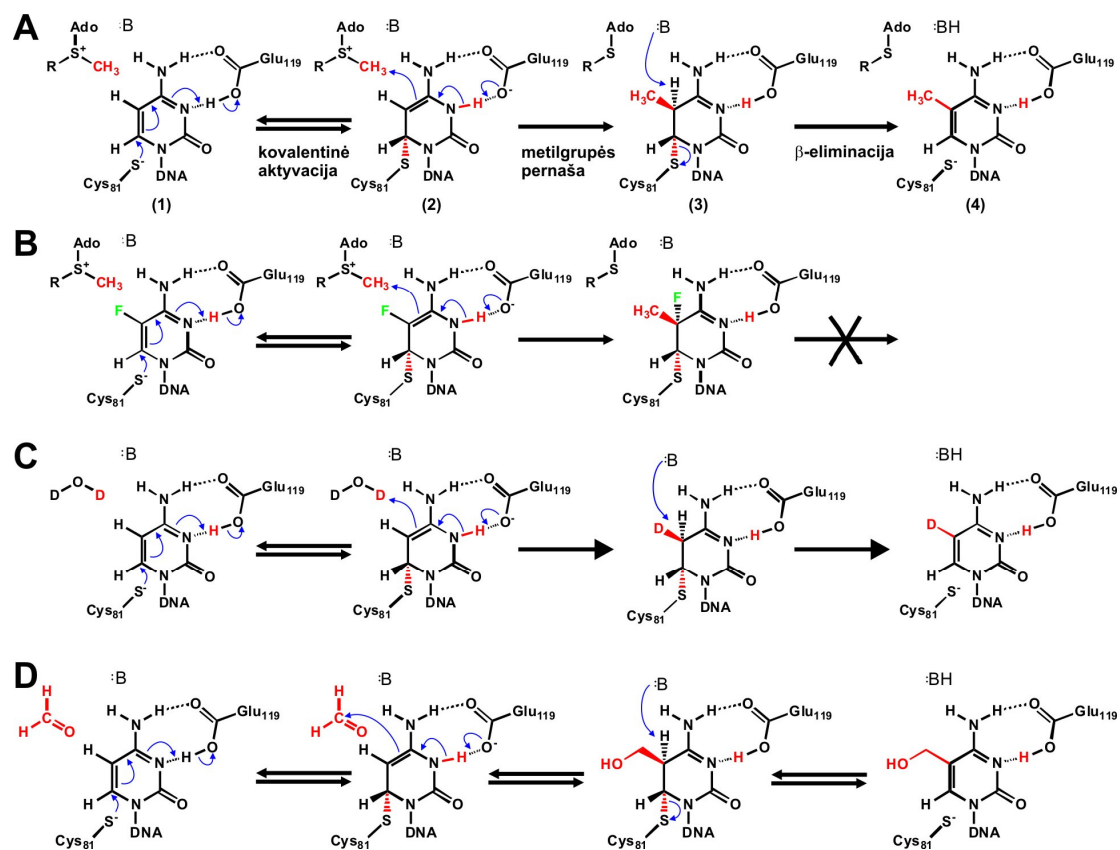
Tiesioginiam katalitinės kilpos konformacijos dinamikos stebėjimui buvo sukonstruoti M.HhaI mutantai E94W/W41F ir K91W/W41F, katalitinėje kilpoje turintys fluorescuojančią aminorūgštį Trp (Estabrook ir Reich, 2006). Tiriant šiuos mutantus, buvo parodyta, kad keičiantis kilpos konformacijai, keičiasi katalitinėje kilpoje esančio Trp fluorescencija. Nustatyta, kad binariniuose kompleksuose katalitinė kilpa užsidaro tik tada, kai fermentas sąveikauja su specifine DNR, o esant reakcijos mišinyje specifinio taikinio neturinčiai DNR, kilpos konformacijos pokytis nevyksta. Keičiant taikinio bazių porą, keičiasi ir kilpos užsidarymo dinamika. Tai rodo, kad bazės judėjimas ir kilpos konformacijos pokyčiai yra stipriai susiję.

1.5. DNR citozino C5-MTazių katalitinis mechanizmas

DNR C5-MTazių katalizuojama metilinimo reakcija yra analogiška kitoms vieno anglies atomo pernešimo į pirimidinų penktą padėtį reakcijoms, kurias katalizuoja timidilatsintazė, dUMP ir dCMP hidroksimetilazės bei RNR C5-metiltransferazės (Wu ir Santi, 1987; Liu ir Santi, 2000). Šie fermentai aktyvuoja pirimidino žiedo C5 padėtį kovalentinės katalizės būdu.

MTazės aktyviame centre vykstančią reakciją sąlyginai galima suskirstyti į tris stadijas (**1.8 pav. A**). Pirmoje stadijoje katalitinio cisteino tiolatas atakuoja metilinamo citozino C6 atomą. Susidariusi kovalentinė cisteino-citozino jungtis didina penktos padėties anglies atomo nukleofiliškumą bei įgalina C5 atomą atakuoti AdoMet metilgrupę. Antroje stadijoje metilgrupė pernešama ant citozino C5 atomo SN2 reakcijos metu, kuomet aktyvuota pirimidino žiedo penkta padėtis atakuoja CH₃ grupės anglies atomą ir išstumia S-adenozil-L-homocisteiną (Ho ir kt., 1991). Trečioje

stadijoje vyksta protono, esančio penktoje padėtyje, β -eliminavimas, kovalentinė jungtis tarp baltymo ir DNR nutrūksta, suyrant MTazės-reakcijos produktų (metilinta DNR ir AdoHcy) kompleksui.



1.8 paveikslas. M.HhaI katalitinis mechanizmas. **A** – citozino metilinimas. **B** – neišyrančio kovalentinio komplekso su 5-fluorocitoziniu susidarymas. **C** – protono prie C5 atomo pakeitimas į deuterį iš tirpiklio. **D** – MTazės katalizuojama skruzdžių aldehido prijungimo reakcija. Ado – adozilas, R – metioninas, B – bazė.

1.5.1. Kovalentinė citozino aktyvacija

Pasiūlyto kovalentinės katalizės mechanizmo patvirtinimui ir C5-MTazių katalitinio cisteino identifikavimui buvo panaudota DNR, turinti 5-fluorocitoziną (5FC) metilintą bazės vietoje. Tokia DNR veikia kaip inhibitorius, negrįžtamai inaktyvuojantis C5-MTazę: reakcijos metu metilgrupė pernešama nuo AdoMet ant 5FC, tačiau negali vykti β -eliminavimas, todėl susidaro stabilus kovalentinis baltymo-DNR kompleksas, nesuyrantis denatūruojant baltymą ureja arba kaitinant su NDS (**1.8 pav. B**) (Osterman ir kt., 1988). Proteolizuojant kovalentinį kompleksą tarp kitos C5-MTazės HaeIII

ir DNR su 5FC, buvo nustatyta, kad katalitinis cisteinas priklauso C5-MTazių šeimoje absoliučiai konservatyviam ProCys dipeptidui (Chen ir kt., 1991) iš IV konservatyvaus motyvo. Pakeitus šį cisteiną MTazėse EcoRII, EcoDcm ir HhaI kitomis aminorūgštimis, mutantiniai baltymai buvo katalitiškai neaktyvūs ir nesudarė kovalentinio komplekso su 5-fluorocitoziną turinčia DNR (Wyszynski ir Gabbara, 1992; Hanck ir kt., 1993; Mi ir Roberts, 1993). Kovalentinių kompleksų tarp M.HhaI (Klimašauskas ir kt., 1994) bei M.HaeIII (Reinisch ir kt., 1995) ir 5-fluorocitoziną turinčių DNR substratų erdvinėse struktūrose buvo vienareikšmiškai matyti kovalentinė jungtis tarp cisteino iš IV konservatyvaus motyvo ir taikinio citozino (abiem atvejais atstumas tarp citozino C5 ir Cys sieros atomo – 1,8 Å).

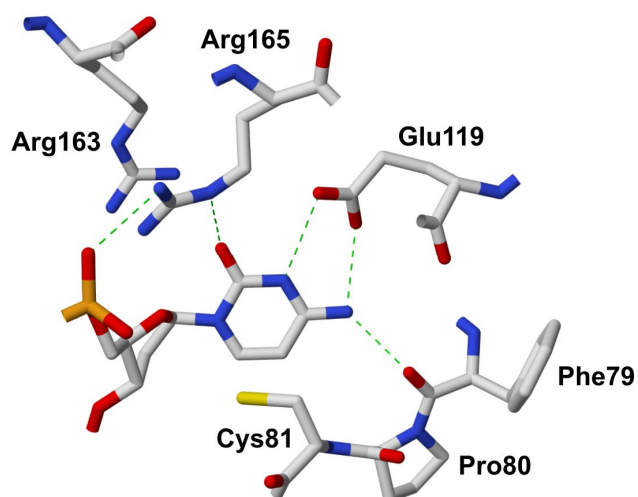
Dėl citozino kovalentinės aktyvacijos DNR C5-MTazės katalizuoja šalutines reakcijas – vandenilio prie C5 atomo apkeitimą su tirpalo vandeniliu (**1.8 pav. C**) (Wu ir Santi, 1987), citozino aminogrupės deamininimą susidarant uracilui (Yang ir kt., 1995) ir neseniai atrastą aldehydų prijungimą prie citozino C5 atomo (**1.8 pav. D**).

Neseniai paskelbtų kvantinės mechanikos skaičiavimų rezultatai rodo, kad citozino C6 padėtį gali atakuoti tik deprotonuotas Cys81 (Zangi ir kt., 2010). Kadangi arti nėra galinčios atlikti bazės, siūloma, kad bazės vaidmenį šiuo atveju atlieka DNR fosfatas, veikdamas per baltymo koordinuotą vandens molekulę.

1.5.2. Tarpinių junginių stabilizavimas

Iki šiol nesutariama, kaip stabilizuojama didelę energiją turinti tarpinė dalelė, susidaranti prie metilinamo citozino prisijungiant katalitiniam cisteinui. Remiantis struktūriniais duomenimis buvo pasiūlyta, kad neigiamas krūvis žiede stabilizuojamas protonizuojant citozino N3 atomą, o tame dalyvauja absoliučiai konservatyvus DNR C5-MTazių šeimoje Glu iš VI konservatyvaus motyvo (M.HhaI – Glu119) (Verdine, 1994), kurio karboksilinė grupė sudaro vandenilinius ryšius su metilinamo citozino N3 ir N4 atomais (Klimašauskas ir kt., 1994; Reinisch ir kt., 1995). Pasiūlyta, kad dėl hidrofobinės aplinkos

baltymo aktyviame centre šis Glu gali būti protonuotas neutralioje terpėje. Detali kelių M.HhaI-DNR kompleksų struktūrinė analizė parodė, kad protonas gali ateiti iš kofaktoriaus NH_3^+ grupės, sąveikaujančios su Glu119 karboksilu per vandens molekulę (O'Gara ir kt., 1996a). Molekulinės dinamikos skaičiavimai nurodė kitą galimą H^+ šaltinį – Arg163 guanidino grupę (Lau ir Bruice, 1999). Citozino N3 protonavimo/deprotonavimo katalitinio akto metu svarbą patvirtino ir pirmieji citozino C5 metilinimo reakcijos kvantiniai skaičiavimai, nagrinėjantys modelinę reakciją tarp 1-metilcitozino (metilinamo citozino modelis), metiltiolato (katalitinio cisteino modelis) ir trimetilsulfonio (AdoMet modelis) (Perakyla, 1998). Panašias išvadas padarė ir dar viena mokslininkų grupė, skaičiuodama reakcijos metu MTazės aktyviame centre susidarančių tarpinių būsenų energijas (Forde ir kt., 2006). Alternatyvus būdas tarpiniam karbanijonui stabilizuoti galėtų būti neigiamo krūvio delokalizacija į O2 padėtį ir sąveika su aktyviame centre esančiais argininais (Arg163 ir Arg165) (Gabbara ir kt., 1995).



1.9 paveikslas. Sąveika su metilnamu citozinu M.HhaI aktyviame centre. Pavaizduotos sąveikaujančios su išsuktu citozinu ir /arba katalizei svarbios aminorūgštys. Vandenilinės jungtys pažymėtos žaliomis punktyrinėmis linijomis. Paveiksle paruoštas naudojant trinario komplekso M.HhaI-DNR-AdoHcy struktūrą (O'Gara ir kt., 1996a) (PDB kodas 3mht).

M.HhaI Glu119, Arg163 ir Arg165 mutantinių baltymų analizė parodė, kad visos šios aminorūgštys svarbios katalizei. Dauguma M.HhaI Glu119

mutantų buvo katalitiškai neaktyvūs. Labai silpną metiltransferazinį aktyvumą išlaikė tik E119D, o taip pat mutantai turintys mažas aminorūgštis 119 pozicijoje (Ser ir Ala), kuriuose Glu119 šoninės grandinės vietą užima vandens molekulė (Shieh ir Reich, 2007). Mutacijas 119 pozicijoje turintys baltymai išlaikė sugebėjimą rišti kofaktorių ir DNR bei išsukti taikinio pozicijoje esantį 2-aminopuriną, tačiau nekatalizavo nei metilinimo, nei vandenilio prie C5 atomo pakeitimo į deuterį reakcijų, nesudarė kovalentinio kompleksu su 5-fluorocitoziną turinčia DNR (Shieh ir Reich, 2007); R. Gerasimaitė, M. Gudeliauskaitė ir S. Klimašauskas, nepublikuoti rezultatai). Nustačius M.HhaI E119A erdvinę struktūrą nebuvo aptikti žymūs aktyvaus centro struktūros pokyčiai. Visi šie duomenys remia prielaidą, kad Glu119 atlieka svarbų vaidmenį stabilizuojant tarpinius junginius katalizės metu.

Pakeitus Arg165 į Ala, mutantinio fermento katalitinis aktyvumas sumažėjo $\sim 10^5$ kartų. Nustačius R165A erdvinę struktūrą paaiškėjo, kad fermento aktyviame centre įvykę žymūs persitvarkymai ir nors MTazė ir neprarado sugebėjimo išsukti ir stabilizuoti aktyviame centre citoziną, pastarojo glikozidinė jungtis yra *anti* konformacijoje, o ne *syn*, kaip kitose M.HhaI kompleksų su DNR struktūrose. Dėl to katalitinis nukleofilas Cys81 atsiduria ne ties C6, o ties citozino O2 atomu. Remiantis šiais duomenimis padaryta išvada, kad Arg165 atlieka svarbų vaidmenį orientuojant metilinamą citoziną aktyviame centre (Shieh ir kt., 2006). Tačiau šis darbas nesuteikė duomenų apie Arg165 vaidmenį tarpinių būsenų stabilizacijoje reakcijos metu. Arg163 mutantų analizė parodė, kad Arg163 iš tiesų svarbus tarpinių būsenų, greičiausiai kovalentinio tarpinio kompleksu, stabilizavimui reakcijos metu (L. Leinartaitė, Z. Staševskij ir S. Klimašauskas, nepublikuoti rezultatai). Taigi gauti rezultatai patvirtina kvantinių skaičiavimų išvadas apie Arg163 svarbą (Lau ir Bruice, 1999). Kita vertus, drastiškai sumažėjęs Glu119 ir Ar163 mutantų fermentinis aktyvumas prieštarauja kitam kvantinių skaičiavimų rezultatui, teigiančiam, kad kovalentinio kompleksu tarp MTazės ir citozino susidarymas ir metilgrupės pernaša vyksta sinchroniškai, nesusidarant

aktyvuotam tarpiniam junginiui (Zhang ir Bruice, 2006), o minėtos amr. katalizėje nedalyvauja.

1.5.3. β -eliminavimas

Kvantinių skaičiavimų duomenimis H5 atplėšimas ir kovalentinės jungties su Cys nutraukimas tikriausiai vyksta sinchroniškai (Perakyla, 1998). Iki šiol negalima vienareikšmiškai įvardinti bazės, atplėšiančios C5-protoną. Iš Rentgeno struktūrų matyti, kad arti citozino C5 atomo nėra aminorūgštis, galinčios atlikti bazės funkciją β -eliminacijos reakcijoje (Klimašauskas ir kt., 1994; Reinisch ir kt., 1995). Todėl buvo pasiūlyta, kad bazės vaidmenį atlieka katalitinio cisteino sieros atomas arba griežtai baltymo koordinuota vandens molekulė (O'Gara ir kt., 1996a). Remiantis struktūriniais duomenimis ir molekulinės dinamikos skaičiavimais aktyviame centre buvo identifikuotas vandens kanalas, sudarytas iš baltymo koordinuotų vandens molekulių, kuriuo atplėštas protonas gali patekti į tirpalą. Manoma, kad konservatyvios aminorūgštys Gln82 (IV konservatyvus motyvas) ir Asn304 (X konservatyvus motyvas) svarbios tinkamai orientuojant šį vandens molekulių tinklą ties išsukto citozino C5-C6 atomais (Reinisch ir kt., 1995; O'Gara ir kt., 1996a; Lau ir Bruice, 1999). Nors nei Asn304, nei Gln82 nėra absoliučiai būtini metiltransferaziniam aktyvumui, Gln82 mutantų biocheminiai tyrimai rodo, kad ši aminorūgštis iš tiesų gali būti svarbi β -eliminacijos stadijai (Z. Staševskij, M. Čaikovskij, E. Merkienė ir S. Klimašauskas, nepublikuoti rezultatai). Tuo tarpu pagal kitus molekulinės dinamikos skaičiavimus vandens molekulės bazingumas nepakankamas C5 protono atplėšimui, todėl tame turi dalyvauti hidroksilo anijonai (Zhang ir Bruice, 2006), galintys patekti į aktyvų centrą iš tirpalo tuo pačiu vandens kanalu.

1.6. Kinetinis M.HhaI mechanizmas

Metilinimo reakcijos metu vyksta dideli M.HhaI ir DNR konformacijos pokyčiai: taikinio citozinas išsukamas iš DNR spiralės, o M.HhaI katalitinė kilpa užsidaro, suformuodama aktyvų centrą. Trinariame komplekse ~1000

kartų padidėja M.HhaI giminingumas tiek AdoMet, tiek DNR. Taigi pilnas M.HhaI kinetinis mechanizmas turėtų apimti visas stadijas: binarinę sąveiką su substratais, komplekso konformacinius pokyčius, cheminę reakciją aktyviame centre ir produktų komplekso iširimą. Nepaisant to, kad M.HhaI veikimo mechanizmas tiriamas jau daugiau kaip 20 metų, daug mechanistinių detalių tebelieka neaiškios. Iš dalies taip yra dėl to, kad nėra metodų, leidžiančių tiesiogiai stebėti aktyviame centre susidarančius tarpinius junginius, bei baltymo ir substrato konformacinius pokyčius. Pvz., iki šiol nėra išaiškintas ryšys tarp taikinio bazės išsukimo ir katalitinės kilpos judėjimo, nebuvo galimybės stebėti citozino išsukimo realiuoju laiku. Daugiausia informacijos surinkta iš M.HhaI ir jos mutantų kristalografinių ir enzimologinių tyrimų.

Pirmieji M.HhaI kinetinį mechanizmą stacionariomis sąlygomis tyrė Wu ir Santi, substratu naudodami DNR polimerą, sudarytą iš pasikartojančių G:C porų – poli[dG-dC]·poli[dG-dC] (Wu ir Santi, 1987). Autoriai pasiūlė, kad reakcija vyksta pagal tvarkingą greitos pusiausvyros bisubstratinį-biproductinį kinetinį mechanizmą: prie baltymo pirmiausia prisijungia DNR, o po to kofaktorius; įvykus reakcijai iš pradžių disocijuoja AdoHcy, o po to metilinta DNR. Nustatyta, kad $K_M^{AdoMet}=15$ nM ir $k_{cat}=0,02$ s⁻¹; Panašūs parametrai gauti ir vėliau, tiriant M.HhaI reakciją su hemimetilintą taikinių turinčiais oligonukleotidais (Vilkaitis ir kt., 2001). Wu ir Santi taip pat nustatė, kad AdoHcy yra stiprus, AdoMet atžvilgiu konkurentinis, inhibitorius ($K_i=2,1$ nM), todėl atliekant kinetinius tyrimus būtina kontroliuoti, kad reakcijoje nesusikauptų didelis kiekis AdoHcy. Taip pat buvo pasiūlyta, kad AdoMet rišasi tik su M.HhaI-DNR kompleksu, bet ne su laisvu baltymu.

Vėliau biocheminiais ir struktūriniais metodais nustatyta, kad M.HhaI vis dėlto sąveikauja su AdoMet, nesant DNR (Kumar ir kt., 1992; Cheng ir kt., 1993; O'Gara ir kt., 1999). Fluorescencinės spektroskopijos metodas įgalino tiesiogiai stebėti metiltransferazės sąveiką su kofaktoriais: vienintelio M.HhaI esančio triptofano (Trp41) – fluorescencija slopinama prisijungiant AdoMet arba AdoHcy. Tokiu būdu nustatyta, kad $K_D^{AdoMet} = 5-12$ μM (Lindstrom ir kt., 2000; Vilkaitis ir kt., 2001), t.y. ~500 kartus didesnė negu K_M^{AdoMet} (15 nM).

Tai paaiškino, kodėl ši sąveika nebuvo užfiksuota pradiniuose tyrimuose. Kinetinių ir pusiausvyrinių M.HhaI sąveikos su AdoMet tyrimų rezultatai rodo, kad tirpale egzistuoja vienos rūšies M.HhaI-AdoMet kompleksas, esantis greitoje pusiausvyroje su laisvais M.HhaI ir AdoMet (Vilkaitis ir kt., 2001). Taip pat buvo patikimai nustatyta, kad 4-5% šio komplekso gali virsti į reakcijos produktus nedisocijuojant kofaktoriui. Taigi buvo pasiūlyta, kad M.HhaI katalizė vyksta pagal dalinai netvarkingą bisubstratinį-biproductinį mechanizmą.

Fiksuojant reakcijos produktų susidarymą laike ikistacionariomis sąlygomis stebima eksponentinė produktų susidarymo fazė, stacionariomis sąlygomis pereinanti į tiesinę (Lindstrom ir kt., 2000; Vilkaitis ir kt., 2001). Toks reakcijos profilis būdingas reakcijoms, kuriose stacionarų greitį k_{cat} riboja stadija, einanti po cheminės reakcijos. Šiame eksperimente vienareikšmiškai nustatyta, kad metilgrupės pernaša yra greitesnė ($0,26 \text{ s}^{-1}$) negu k_{cat} , o bendrą reakcijos greitį riboja susidariusio produktų komplekso iširimas ($k_{off} = 0,045 \text{ s}^{-1}$) (Vilkaitis ir kt., 2001). Tiriant M.HhaI kofaktoriaus surišimo kišenėje esančio Trp41 mutacijų įtaką reakcijai, nustatyta, kad produktų komplekso iširimas gali vykti dviem keliais: 1) pirmiausia disocijuojant AdoHcy, po to atsidarant katalitinei kilpai ir disocijuojant DNR arba 2) pirmiausia atsidarant kilpai, ir po to greitai disocijuojant AdoHcy ir metilintai DNR (Merkienė ir Klimašauskas, 2005).

Nustatyta, kad didžioji dalis binariame komplekse surištos DNR metilinama be papildomo disociacijos žingsnio (Lindstrom ir kt., 2000). Taip pat M.HhaI-DNR komplekso disociacijos greitis ($0,04-0,3 \text{ s}^{-1}$) (Wu ir Santi, 1987; Vilkaitis ir kt., 2001) palyginamas su negrįžtamos metilinimo stadijos greičiu. Taigi M.HhaI yra greitoje pusiausvyroje su kofaktoriu, bet ne su DNR.

Kol kas nežinoma, koks procesas riboja cheminės reakcijos greitį k_{chem} . Remiantis kvantinių skaičiavimų duomenimis, tai galėtų būti kovalentinės jungties tarp baltymo ir citozino susidarymas arba β -eliminacija, kadangi pats metilgrupės pernešimas yra labai energetiškai palankus ir turėtų vykti greitai

(Perakyla, 1998). Tai patvirtino ir M.HhaI Thr250 mutantų tyrimai (Vilkaitis ir kt., 2001). Tačiau kita mokslininkų grupė, remdamasi kinetinio izotopinio efekto priklausomybės nuo pH tyrimais, teigia, kad reakcijos greičio neriboja kovalentinė citozino aktyvacija, o išsuktas ir surištas aktyviame citozinas yra greitoje pusiausvyroje su kovalentiškai aktyvuotu (Svedruzic ir Reich, 2004). Tokią išvadą paremia ir faktas, kad šalutinė H5 apkeitymo reakcija nesant kofaktoriaus vyksta greičiau negu metilinimas, esant AdoMet (Wu ir Santi, 1987; Svedruzic ir Reich, 2004). Taigi norint tiksliai išsiaiškinti, kas apsprendžia M.HhaI katalizuojamos reakcijos greitį ikistacionariomis sąlygomis, reikia papildomų tyrimų.

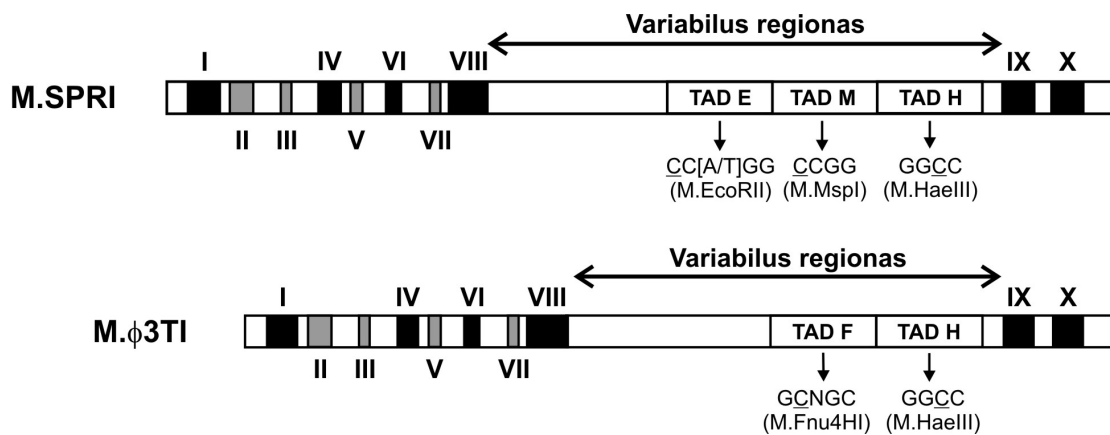
1.7. Metiltransferazių sekos specifiškumas

1.7.1. Taikinio atpažinimo domenas

Už specifinės DNR sekos atpažinimą C5-MTazėse atsakingas ilgiausias variabilus regionas, esantis tarp VIII ir IX KM (Wilke ir kt., 1988; Klimašauskas ir kt., 1991). Jo ilgis koreliuoja su metiltransferazės modifikuojamų skirtingų taikinių skaičiumi ir svyruoja nuo ~80-135 amr. monospecifiniuose iki ~173-267 amr. kelis taikinius atpažįstančiuose multispecifiniuose fermentuose (Trautner ir kt., 1996). Variabilus regionas taip pat lemia, kuris iš kelių taikinyje esančių citozinių bus metilinamas (Mi ir Roberts, 1992). Erdvinėse M.HhaI ir M.HaeIII struktūrose matyti, kad variabilus regionas sudaro mažąjį – taikinio atpažinimo – domeną (TAD) (**1.4 pav.**), sudarantį visus išskyrus vieną kontaktus su taikinio heterociklinėmis bazėmis (Klimašauskas ir kt., 1994; Reinisch ir kt., 1995).

Kalbant apie multispecifines MTazes, terminas „taikinio atpažinimo domenas“ suprantamas kaip baltymo dalis, tiesiogiai atsakinga už konkretaus DNR taikinio atpažinimą. Multispecifinių MTazių variabilaus regiono C-galinėje dalyje vienas paskui kitą išsidėsto už skirtingų taikinių atpažinimą atsakingi 2-4 TAD (**1.10 pav.**) (Balganesh ir kt., 1987; Wilke ir kt., 1988). Jie yra 38-54 amr. ilgio ir vienas su kitu nepersidengia. Gretimi TAD gali būti

atskirti 1-4 amr. arba eiti iš karto vienas po kito. TAD rinkinį variabiliame regione įremina trumpos konservatyvios sekos, kurios fermentiniam aktyvumui nebūtinės. Kadangi iki šiol nežinoma nei vienos multispecifinės MTazės erdvinės struktūros, neaišku, kaip atskiri TAD išsidėsto erdvėje ir kurios amr. kontaktuoja su DNR bazėmis.



1.10 paveikslas. Multispecifinių DNR C5-MTazių aminorūgščių sekos organizacija. Labiau konservatyvūs amr. sekos motyvai juodi, mažiau konservatyvūs – pilki. Variabilaus regiono C-galinėje dalyje išsidėstę nepersidengiantys taikinio atpažinimo domenai pažymėti didžiosiomis raidėmis. Po kiekvienu TAD nurodytas jo apspręstas specifiskumas (metilinamas citozinas pabrauktas), o skliausteliuose pažymėta, su kokios monospecifinės MTazės specifiskumu jis sutampa. Vaizduojant mastelis neišlaikytas.

1.7.2. TAD amino rūgščių sekoje aptinkami dėsningumai

Žymus panašumas tarp skirtingų metiltransferazių TAD pastebimas tik tada, jei abu fermentai atpažįsta tą patį taikinį ir modifikuoja toje pačioje pozicijoje esantį citoziną (Walter ir kt., 1992; Gopal ir kt., 1994; Mi ir kt., 1995). TAD taip pat gali būti panašūs tarp fermentų, atpažįstančių panašias išsigimusias sekas, pvz. M.DsaV (CCNGG), M.EcoRII ir Dcm (CC[A/T]GG) (Gopal ir kt., 1994); M.SinI (GG[A/T]CC) ir M.Sau96I (GGNCC) (Szilak ir kt., 1990); bei M.NgoVII (GC[G/C]GC) ir M.Lsp1109I (GC[A/T]GC). Tačiau tą patį taikinį atpažįstančių monospecifinių ir multispecifinių MTazių TAD nėra homologiški, ir tai tikriausiai atspindi skirtingą šių fermentų grupių struktūrinę organizaciją (Walter ir kt., 1992).

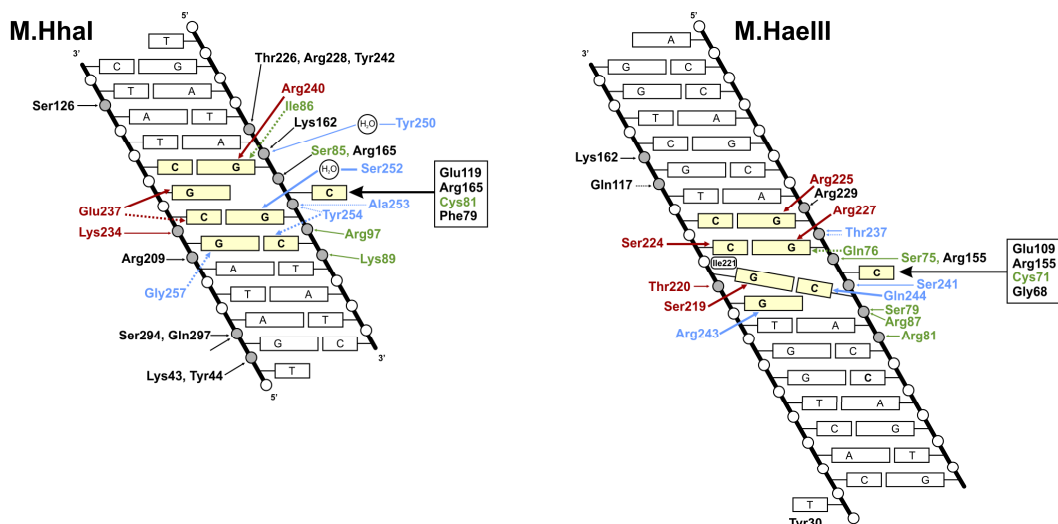
Nepaisant mažo bendro panašumo, daugelio MTazių variabiliuose regionuose aptinkamas konservatyvus dipeptidas T(I/L/V), vadinamas TL motyvu (Lauster ir kt., 1989; Vilkaitis ir kt., 2000). Ištyrus M.HhaI Thr250 iš TL motyvo mutantų savybes nustatyta, kad šios amr. šoninė grandinė yra svarbi palaikant DNR fosfodiesterinio karkaso konformaciją ir orientuojant metilinamą citoziną išsukimo iš dvigubos spiralės metu (Vilkaitis ir kt., 2000). M.HhaI (Klimašauskas ir kt., 1994) ir M.HaeIII (Reinisch ir kt., 1995) kompleksų su DNR erdvinėse struktūrose TL motyvo padėtis erdvėje konservatyvi. Abiejų baltymų treonino šoninės grandinės padėtis visiškai sutampa, o hidroksilo grupė per vandens molekulę sudaro vandenilinę jungtį su metilino citozino 5'-fosfatu. Detalios amr. sekų analizės metu TL motyvo srityje buvo aptiktas silpnai konservatyvus motyvas [Y/F/W]X[R/K]X₅P[S/T/C/A]'TL'[T/A/S/V] X₅₋₁₆H [PYFWL], kur X – bet kuri aminorūgštis (Vilkaitis ir kt., 2000). Nors TL dipeptidą supančios amr. M.HhaI ir M.HaeIII baltymuose skiriasi, dviejų TAD segmentų (240-253 ir 262-265 M.HhaI bei 225-238 ir 243-246 M.HaeIII) peptidinių grandinių erdvinė padėtis sutampa. Šie struktūriniai elementai apima aprašytą *consensus* motyvą ir, manoma, formuoja pagrindą, palaikantį atpažinimo kilpas (Reinisch ir kt., 1995).

Buvo pastebėti keli TAD organizacijos dėsniumai, leidžiantys iš dalies susieti amr. seką su MTazės atpažįstamu DNR taikiniu. Daugumoje 5'..GC..3' sekas atpažįstančių TAD aptinkamas devyniomis amr. nuo TL motyvo nutolęs argininas (Cheng ir Blumenthal, 1996; Lange ir kt., 1996). MTazėse HhaI ir HaeIII šio arginino guanidininė grupė sudaro vandenilinius ryšius su kaimyninio 5'-guanino O6 ir N7 atomais, užtikrindama specifinį šios bazių poros atpažinimą. Tuo tarpu fermentuose, atpažįstančiuose 5'..CC..3' taikinius, analogiškoje pozicijoje dažniausiai sutinkamas glutaminas arba asparaginas (Cheng ir Blumenthal, 1996). Pratešus dėsniumų paiešką, abipus TL motyvo buvo surasti motyvai, pavadinti N-TL ir C-TL, kurių amr. sekos stipriai koreliuoja su MTazės atpažįstamu taikiniu. Pavyzdžiui, GGCC taikinį

atpažįstančiose MTazėse N-TL motyvas beveik visada yra SRN, o C-TL motyvo *consensus* seka GRQ (Neely ir Roberts, 2008)

1.7.3. Metiltransferazių HhaI ir HaeIII kontaktai su taikinio bazėmis

M.HhaI ir M.HaeIII kompleksų su DNR struktūrų analizė parodė, kad su heterociklinėmis bazėmis kontaktuojančios amino rūgštys yra MTazių C-galinėje TAD dalyje. M.HhaI jos išsidėsčiusios dviejose paviršinėse baltymo kilpose (**1.4 pav.**) (Klimašauskas ir kt., 1994). M.HhaI ir M.HaeIII kontaktų su DNR schema pateikta **1.11 pav.**. Pirmoji M.HhaI atpažinimo kilpa (N-galinė, amr. 233-240) sudaro šešis specifinius kontaktus su keturiomis bazėmis ir atpažįsta taikinio 5'-dalį GCG (pabrauktas metilinamas C). Antroji (C-galinė, amr. 250-257) kilpa sudaro tris vandenilines jungtis su atpažįstamomis bazėmis: dvi tiesiogines ir vieną per vandens molekulę, ir yra atsakinga už taikinio 3'-dalies atpažinimą (**1.11 pav.**). Visi atpažinimo kilpoms priklausančių aminorūgščių kontaktai sudaromi DNR didžiajame griovyje. Vienintelė vandenilinė jungtis tarp baltymo ir DNR mažajame griovyje susidaro tarp Ile86 iš katalitinės kilpos pagrindinės grandinės karbonilinio deguonies ir pirmojo taikinio guanino aminogrupės (**1.13 pav.**).



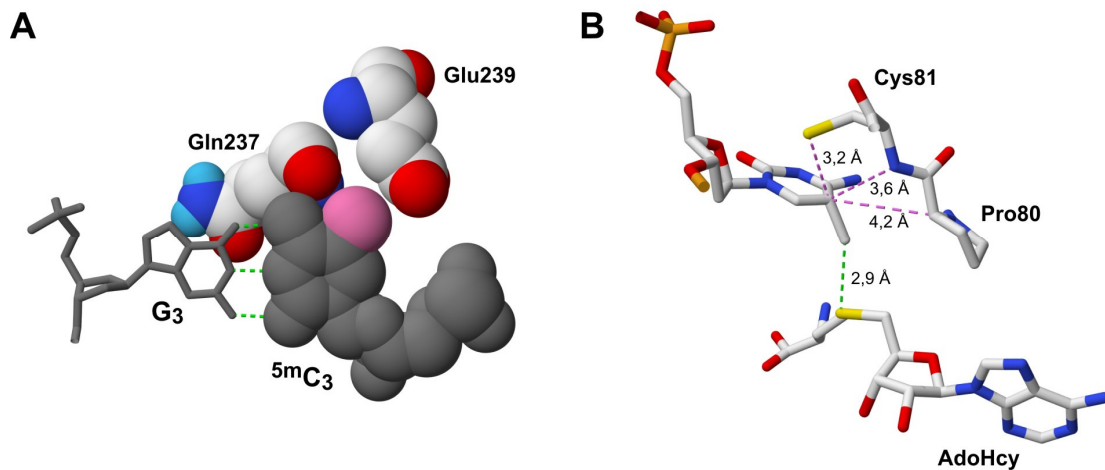
1.11 paveikslas. M.HhaI ir M.HaeIII kontaktai su DNR. Taikinio bazės gelsvos, pilkai pažymėti su MTazė sąveikaujantys fosfatai; fosfatai, su kuriais MTazės nesąveikauja, pavaizduoti kaip balti apskritimai. Katalitinės kilpos amr. nuspalvintos žaliai, atpažinimo Kilpos-1 – raudonai, atpažinimo Kilpos-2 – mėlynai, su DNR sąveikaujantys amr. iš kitų baltymo dalių – juodos;

ištisinės rodyklės žymi amr. šoninės grandinės sąveiką, punktyrinės – pagrindinės grandinės sudaromus kontaktus; paryškintos rodyklės žymi sąveikas su heterociklinėmis bazėmis, lemiančias specifinio taikinio atpažinimą. Paveikslas paruoštas, remiantis trinarių MTazė-DNR-AdoHcy kompleksų struktūromis (Klimašauskas ir kt., 1994; Reinisch ir kt., 1995).

Struktūrų su skirtingais DNR substratais analizė rodo, kad M.HhaI selektyvumą hemimetilintam taikiniui galėtų lemti Van der Valso kontaktas tarp Glu239 karboksilinės grupės ir komplementarioje (nemetilinoje) grandinėje esančio 5-metilcitozino metilgrupės (**1.12 pav. A**) (O'Gara ir kt., 1996b). Tuo tarpu mažą giminingumą pilnai metilintai DNR reakcijos produktų komplekse lemia nepalanki sterinė sąveika tarp išsukto 5mC metilgrupės ir aktyvaus centro aminorūgščių (**1.12 pav. B**).

M.HaeIII struktūriniai elementai, funkciškai atitinkantys M.HhaI atpažinimo kilpas, organizuoti panašiai (**1.4 pav.**) (Reinisch ir kt., 1995). Su 5'-galine atpažįstamos sekos dalimi kontaktuojančios aminorūgštys išsidėsto abipus trumpos α -spiralės, priklausančios baltymo elementui, atitinkančiam pirmąją M.HhaI atpažinimo kilpą. Tuo tarpu aminorūgštys apsprendžiančios 3'-galinės taikinio dalies atpažinimą priklauso atpažinimo elementui, atitinkančiam M.HhaI antrąją kilpą, ir išsidėto polipeptidinės grandinės linkyje. M.HaeIII kaip ir M.HhaI, daugumą specifinių kontaktų formuoja DNR didžiajame griovyje, sudarydama vienintelį kontaktą mažajame griovyje tarp Gln76 peptidinės grupės ir antrojo taikinio guanino (GGCC) aminogrupės (**1.11 pav.**). Taip pat abiems MTazėms bendra tai, kad su kiekviena taikinio baze kontaktuoja tik vienai kilpai priklausančios aminorūgštys, taigi kilpos atpažįsta nepersidengiančias taikinio dalis.

Tačiau aminorūgštys, sudarančios specifinius kontaktus su DNR M.HhaI ir M.HaeIII, nehomologiškos, skiriasi ir pats specifinių kontaktų pobūdis (**1.11 pav.**). Keturis iš aštuonių specifinių kontaktų su heterociklinėmis bazėmis M.HhaI sudaro dalyvaujant peptidinių jungčių atomams, o vieną netiesiogiai, per vandens molekulę. Tuo tarpu M.HaeIII atveju sekos atpažinimą užtikrina sąveika tarp heterociklinių bazių ir aminorūgščių šoninių grandinių.



1.12 paveikslas. M.HhaI sąveika su taikinyje esančiu 5-metilcitozinu. **A** – sąveika su 5mC komplementarioje grandinėje. Trečioji taikinio bazių pora pavaizduota pilkai, metilgrupė rožinė. 5mC metilgrupė sudaro palankius Van der Valso kontaktus su Gln237 ir Glu239. Paveikslas paruoštas naudojant trinario komplekso M.HhaI-hemimetilinta DNR-AdoHcy struktūrą (pdb kodas 5mht, (O’Gara ir kt., 1996b)). **B** – sąveika su išsuktu citozinu aktyviame centre. Metilgrupė nukrypusi nuo žiedo plokštumos dėl nepalankių sąveikų su aktyvaus centro aminorūgštimis (rožinės punktyrinės linijos). Metilgrupę stabilizuoja tik silpna vandenilinė jungtis (žalia punktyrinė linija) su AdoHcy sieros atomu. Paveikslas paruoštas naudojant trinario komplekso M.HhaI-pilnai metilinta DNR-AdoHcy struktūrą (pdb kodas 4mht, (O’Gara ir kt., 1996b)).

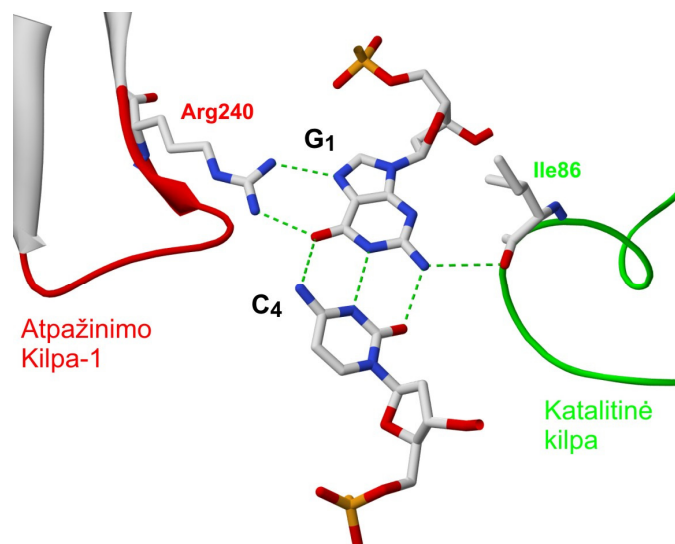
Abi MTazės sąveikauja su DNR fosfodiesteriniu karkasu taikinio srityje ir už jo ribų. Kontaktus su fosfatinėmis grupėmis sudaro amino rūgštys ir iš mažojo, ir iš didžiojo domeno. Sąveika su metilinamos DNR grandinės fosfatais analogiška abiejuose baltymuose ir, manoma, svarbi teisingai orientuojant substratą. Tuo tarpu sąveika su komplementaria grandine skiriasi (Reinisch ir kt., 1995).

Taigi ir M.HhaI, ir M.HaeIII būdinga: 1) specifiniai kontaktai tarp TAD ir DNR bazių didžiajame griovyje; 2) vienas specifinis kontaktas tarp katalitinės kilpos peptidinės grandinės ir guanino aminogrupės mažajame griovyje; 3) atpažinimo kilpų sąveika su nepersidengiančiomis taikinio dalimis; 4) panaši sąveika su metilinamos grandinės fosfatais. Šie panašumai liudija, kad gali egzistuoti specifinės sąveikos su DNR dėsningumai, galbūt būdingi ir kitoms C5-MTazėms. Tačiau nepanašios TAD amr. sekos ir erdvinės struktūros, skirtingas specifinių kontaktų pobūdis ir skirtinga sąveika su

nemetilinos grandinės fosfatais rodo, kad priklausomai nuo atpažįstamos sekos savybių MTazės naudoja skirtingus būdus katalitinei ir taikinio atpažinimo funkcijoms suderinti. Šiuos skirtumus vaizdžiai iliustruoja skirtinga DNR struktūros stabilizacija, išsukus metilinamą citoziną į aktyvų centrą (žiūr. 1.4.1 skyrių).

1.7.4. Taikinio atpažinimo ir katalizės ryšys

DNR MTazių funkcija ne tik susirišti su specifine DNR seka, bet ir katalizuoti taikinio citozino išsukimą bei metilinimą. Taigi matomą metilinimo specifiškumą nulemia ne tik giminingumo specifinei ir nespecifinei DNR skirtumas, bet ir tai, kaip efektyviai skirtingose sekose esantys citozinai gali būti išsukti ir metilinti. Pvz., M.HhaI 60-350 kartų silpniau rišasi su sekomis, besiskiriančiomis nuo taikinio viena bazių pora; tačiau katalitinis efektyvumas (k_{cat}/K_M^{DNR}) nekanoninių taikinių atžvilgiu skiriasi net 3000-80000 kartų (Youngblood ir kt., 2006). Pirminio atpažinimo mechanizmai taip pat turi būti glaudžiai susiję su bazės išsukimu, kadangi dalis kristalinėje struktūroje matomų specifinių kontaktų su DNR bazėmis didžiajame griovyje gali susidaryti tik išsukus metilinamą citoziną.



1.13 paveikslas. M.HhaI sąveika su pirmąja taikinio bazių pora. Vandenilinės jungtys pažymėtos žaliomis punktyrinėmis linijomis. Paveikslas paruoštas naudojant trinario kompleksą M.HhaI-DNR-AdoHcy (O'Gara ir kt., 1996a) struktūrą (PDB kodas 3mht).

Ile86 iš katalitinės kilpos yra viena iš aminorūgščių, dalyvaujančių taikinio atpažinimo ir katalizės suderinime. Ile86 karbonilinė grupė sudaro vandenilinį ryšį su pirmojo taikinio guanino aminogrupe (**1.13 pav.**), o šis kontaktas svarbus katalitinės kilpos fiksavimui uždaroje konformacijoje (Svedruzic ir Reich, 2004). Nesant šio kontakto, M.HhaI reakcija su poli[dI-dC]·poli[dI-dC] (I = inozinas, guanino analogas, neturintis 2-aminogrupės) yra greitesnė negu su poli[dG-dC]·poli[dG-dC], dėl greitesnio produktų komplekso iširimo (Wu ir Santi, 1987; Svedruzic ir Reich, 2004). Tiriant katalitinės kilpos judėjimą buvo nustatyta, kad M.HhaI sąveikaujant su nespecifine DNR, katalitinė kilpa neužsidaro (Estabrook ir kt., 2009). Šiame darbe parodyta, kad katalitinės kilpos užsidarymui gali būti reikalingas specifinis kontaktas tarp Arg240 ir pirmojo taikinio guanino.

Kita vertus buvo parodyta, kad katalitinės kilpos uždaros konformacijos ir išsukto citozino destabilizavimas gali padidinti stebimą M.HhaI specifiškumą *in vitro*, pablogėjusio nekanoninių sekų metilinimo dėka. Tokiomis savybėmis pasižymėjo Phe124, His127 ir Thr132 mutantai. Šios amr. sudaro daugiau sąveikų su užsidariusia katalitine kilpa negu su atvira, ir, manoma, gali stabilizuoti katalitinę kilpą uždaroje būsenoje.

Remiantis vien struktūrine informacija negalima nustatyti visų amr., kurios svarbios specifinio DNR surišimo ir katalizės suderinimui. MTazės HhaI specifiškumui paaiškinti buvo pasiūlyta „energetinio atpažinimo“ hipotezė, pagal kurią nekanoniniame taikinyje esančio citozino išsukimui egzistuoja didesni energetiniai barjerai negu citozino išsukimui iš kanoninio taikinio (Huang ir MacKerell, 2005). Tiesa, šis darbas rėmėsi diskutuotina prielaida, kad citozino išsukimas vyksta per DNR didįjį griovį jau užsidarius katalitinei kilpai (Huang ir kt., 2003; Luo ir Bruice, 2005) (žiūr. **1.4.2 skyrių**). Molekulinės dinamikos skaičiavimai parodė, kad egzistuoja du energetiniai barjerai citozino išsukimui, kuriuos sukuria trumpai gyvuojančių sąveikų tarp baltymo ir DNR tinklas, susidarantis citozino išsukimo metu (Huang ir MacKerell, 2005). Tiesiogiai patikrinti šią hipotezę yra sunku, kadangi

kalbama apie didelės energijos, trumpai gyvuojančias baltymo-DNR komplekso būsenas, kurios negali būti aptiktos eksperimentiškai.

1.8. C5-MTazių specifiškumo keitimas

1.8.1. TAD keitimas tarp skirtingų MTazių

Išskirtinė multispecifinių MTazių savybė – stebėtinai regiono, kuriame išsidėstę TAD, plastiškumas. Pasirodė, kad galima pakeisti vienos metiltransferazės variabilų regioną ar jo dalį analogišku fragmentu iš kito fermento ir gauti funkciškai aktyvų baltymą (Balganesh ir kt., 1987; Trautner ir kt., 1988). Taškinės mutacijos ir insercijos, inaktyvuojančios vieną ar kelis TAD, o taip pat visiškai vieno ar kelių TAD pašalinimas neįtakoja MTazės sugebėjimo metilinti likusių specifiškumą taikinius (Trautner ir kt., 1988; Wilke ir kt., 1988). Stebėtina, bet įvedus papildomą TAD, taip pat gaunami funkciškai aktyvūs baltymai, metilinantys papildomą taikinį (Sethmann ir kt., 1999). Visa tai rodo, kad multispecifinių MTazių TAD yra struktūriškai ir funkciškai nepriklausomi moduliai, o patys fermentai yra prisitaikę nesunkiai įkomponuoti į savo struktūrą naują atpažinimo domeną, sąlygojančią naują specifiškumą.

Tuo tarpu bandant sukeisti TAD ar jo dalis tarp monospecifinių MTazių, iškilo nemažai sunkumų. Dauguma gautų hibridinių baltymų buvo neaktyvūs arba jų aktyvumas žymiai mažesnis nei motininų fermentų (Klimašauskas ir kt., 1991; Mi ir Roberts, 1993; Vilkaitis ir Klimašauskas, 1998). Konstruojant hibridus tarp M.HhaI ir M.HpaII, buvo pastebėta, kad aktyvesni baltymai gaunami tada, kai ir variabilus regionas, ir IX konservatyvus motyvas yra paimti iš to paties fermento (Klimašauskas ir kt., 1991). Erdvinė M.HhaI struktūra paaiškino tokius rezultatus: pasirodė, kad IX KM glaudžiai kontaktuoja su variabiliu regionu, sudarydamas mažojo domeno struktūrinį karkasą (Cheng ir kt., 1993).

Skirtumai tarp mono- ir multispecifinių MTazių tikriausiai atspindi skirtingus mechanizmus, kuriais šioms klasėms priklausantys fermentai

integruoja katalitinę ir taikinio atpažinimo funkcijas. Multispecifiniuose fermentuose būtina lanksti struktūra, užtikrinanti katalitinio centro alternatyvią sąveiką su keletu TAD. Tuo tarpu monospecifinėse MTazėse toks lankstumas nereikalingas ir jos evoliucijos eigoje galėjo sukaupti mutacijas, optimizuojančias katalizę bei sąveiką su vieninteliu TAD (Klimašauskas ir kt., 1991).

1.8.2. TAD dalių keitimas tarp skirtingų MTazių

Pirmieji bandymai sukeisti TAD dalis tarp skirtingų fermentų buvo atlikti su multispecifinėmis MTazėmis M.SPRI ir M. ϕ 3TI (**1.10 pav.**) (Balganesh ir kt., 1987; Lange ir kt., 1996). Pagrindinis šio eksperimento tikslas buvo išsiaiškinti skirtingų TAD dalių vaidmenį specifiniame taikinio atpažinime. Taikinio atpažinimo domenų E (CC[A/T]GG) ir F (GCNGC) dalys buvo sukeistos per abiejuose TAD esantį GL dipeptidą ir gauti du chimeriniai TAD (atitinkamai EF ir FE), kurių N- ir C-galinės buvo kilusios iš skirtingų motininių TAD. Tokiu būdu pavyko gauti dvi aktyvias metiltransferazes, modifikuojančias nei vienam iš motininių baltymų nebūdingus taikinius. Chimerinį TAD FE turintį MTazė efektyviausiai metilino GC[T/C] taikinius, o MTazė su chimeriniu TAD EF – CC[A/T/C] sekas. Taigi šie hibridiniai TAD apsprendė specifiškumą išsigimusioms sekoms, kurių 5'-dalis sutapo su to motininio TAD atpažįstamo taikinio 5'-dalimi, kuris buvo chimerinio TAD N-gale. Gauti rezultatai leido padaryti prielaidą, kad panašiai kaip monospecifiniuose fermentuose, multispecifinėse DNR C5-MTazėse skirtingas atpažįstamos sekos dalis atpažįsta atskiros TAD dalys.

Panašūs darbai buvo atlikti ir su monospecifinėmis MTazėmis. Pastebėta, kad pirmosios atpažinimo kilpos pakeitimai visais atvejais inaktyvuoja motininę MTazę, o keičiant antrąją atpažinimo kilpą galima gauti aktyvų fermentą (Vilkaitis ir Klimašauskas, 1998); S. Kriaučionis, G. Vilkaitis ir S. Klimašauskas, neskelbti rezultatai). Taip sukonstruotos hibridinės MTazės metilino išsigimusias, nei vienos iš motininių MTazių neatpažįstamas sekas, o jų katalitinis efektyvumas paprastai būdavo ženkliai mažesnis negu laukinio

tipo baltymų. Įdomu, kad hibridinių MTazių atpažįstami taikiniai buvo labai panašūs į Kilpos-1 atpažįstamą motininės MTazės taikinio dalį. Pavyzdžiui, hibridinė MTazė L2Bsp:Hha, kurioje M.HhaI (GCGC) Kilpa-2 pakeista numanomu funkciškai analogišku fragmentu iš M.Bsp6I (GCNGC) metilino GCG sekas. Tai rodo, kad perkelta Kilpa-2 tikriausiai nėra funkcionali kitos MTazės struktūriniame kontekste ir tuo pačiu paaiškina, kodėl Kilpos-1 pakeitimai nėra toleruojami. M.HhaI Kilpoje-1 esantis Gln237 yra svarbus bazės išsukimui ir stabilizavimui (Daujotytė ir kt., 2004), taigi teisingas Kilpos-1 funkcionavimas yra kritiškas MTazės katalitiniam aktyvumui. Tuo tarpu Kilpos-2, sąveikaujančios su toliau nuo metilinamo citozino esančia ketvirtąja taikinio bazių pora, funkcija nėra tokia svarbi. Kaip matyti iš M.HaeIII-DNR erdvinės struktūros, ir kaip galima spręsti iš amr. sekų homologijos Kilpos-1 srityje nebuvimo, skirtingos MTazės naudoja skirtingus išsukto citozino stabilizavimo mechanizmus. Tikriausiai todėl perkeltas fragmentas negali funkcionuoti kitos MTazės struktūriniame kontekste ir hibridinė MTazė yra neaktyvi.

1.8.3. Taškinė mutagenezė

Norint identifikuoti multispecifinių C5-MTazių atskirų TAD ribas buvo plačiai taikoma taškinė mutagenezė, tačiau nei vienu atveju nebuvo gauti taikinio specifiškumo pasikeitimai. Tai galėjo būti nulemta nepakankamu naudojamų metodų jautrumu – daugiausia eksperimentų rėmėsi metilintos DNR karpymu keletu 5mC jautrių REazių. Kita vertus, tai gali rodyti, kad C5-MTazių specifiškumą dažniausiai lemia ne vienas, o keletas kontaktų su DNR.

Pirmasis sėkmingas MTazės specifiškumo pakeitimas buvo atliktas su M.HaeIII, taikant kryptingos evoliucijos ir *in vitro* kompartmentalizacijos metodus (Cohen ir kt., 2004). Šiame darbe buvo siekiama atrinkti M.HaeIII variantus, efektyviai metilinančius AGCC taikinį. AGCC skiriasi nuo kanoninio taikinio GGCC tik pirmąja bazių pora ir yra dažniausiai metilinamas M.HaeIII nekanoninis taikiny (Cohen ir kt., 2002). *In vitro* evoliucija vykdyta

dviem etapais: pirmajame mutagenizuotos penkios aminorūgštys iš pirmosios atpažinimo kilpos, lemiančios taikinio 5'-dalies atpažinimą. Visi šiame etape atrinkti mutantai turėjo Arg225, sudarančio vandenilinius ryšius su pirmojo guanino O6 ir N7 atomais, pakeitimus į Ala. Antrajame etape buvo optimizuota R225A mutanto struktūra: mutagenizuotos trys aminorūgštys, erdvėje esančios netoli Arg225 ir galinčios įtakoti jo konformaciją. Efektyviausia mutantinė MTazė be R225A turėjo pakeitimus N260L, L261M, ir N262W, ir 3 kartus efektyviau metilino AGCC taikinius negu GGCC (lyginat k_{cat}/K_M^{DNR}). Įdomu, kad ši mutantinė MTazė pasižymėjo didesniu katalitiniu efektyvumu visiems tikrintiems taikiniams nei laukinio tipo M.HaeIII. Skirtingai negu galima būtų tikėtis iš erdvinės struktūros, optimizuotoje mutantinėje MTazėje kontaktų su pirmuoju G pašalinimas (mutacija R225A) nesumažino giminingumo DNR ir visiškai nepanaikino specifiškumo pirmajai bazių porai.

Įdomu, kad MTazių SinI (GGWCC) ir EcoRII (CCWGG) atveju centrinei A:T bazių porai atskirti nuo G:C bazių poros (nemetilinas taikinis) svarbūs kontaktai DNR mažajame griovyje (Kiss ir kt., 2001). Ši išvada buvo padaryta remiantis tuo, kad abi MTazės panašiu efektyvumu metilino taikinius, centrinėje pozicijoje turinčius bazių porą hipoksantinas:citozinas. Hipoksantinas – guanino analogas, neturintis 2-aminogrupės, todėl ši bazių pora didžiajame griovyje panaši į G:C, o mažajame – į A:T bazių porą. Vėliau evoliucijos *in vitro* būdu buvo gauti relaksuoto specifiškumo M.SinI mutantai, panašiu efektyvumu metilinantys GGWCC ir GGSCC taikinius (Timar ir kt., 2004). Įdomu, kad nei viena iš atrinktų mutantinių MTazių neturėjo mutacijų TAD srityje, kas rodo, kad už centrinės taikinio bazių poros atpažinimą yra atsakingas katalitinis domenas. Didžiausią įtaką specifiškumo pasikeitimui turėjo dvi mutacijos, esančios tarp VI ir VII KM. Lyginant su kitom MTazėm šis variabilus amr. sekos fragmentas M.SinI gana ilgas, todėl, manoma, galėtų sudaryti paviršinę baltymo kilpą ar kitą struktūrą, kontaktuojančią su DNR mažuoju grioviu. Tačiau detali struktūrinė interpretacija negalima, nes nėra nustatyta M.SinI tretinės struktūros.

Paminėti MTazių specifiškumo keitimo pavyzdžiai gerai iliustruoja ribotas galimybes kryptingai keisti MTazių specifiškumą, remiantis tik kompleksų erdvinėmis struktūromis. Netgi tuomet, kada žinoma MTazės-DNR komplekso erdvinė struktūra, su DNR sąveikaujančių amr. mutacijų įtaką ne visada galima numatyti. Dažniausiai kontaktus su DNR bazėmis sudarančių amr. mutacijos sumažina MTazių katalitinį efektyvumą ir relaksuoja specifiškumą, tačiau visiškas specifiškumo tam tikrai taikinio pozicijai praradimas paprastai nestebimas (Cohen ir kt., 2004; Horton ir kt., 2005; Horton ir kt., 2006a). Tai paaiškinama tuo, kad struktūrose dažniausiai matomas tik specifinis MTazės-DNR kompleksas, tačiau jos nesuteikia informacijos, kaip pirminis, nespecifinis baltymo-DNR kompleksas virsta specifiniu ir kurios baltymo dalys yra svarbios taikinio atpažinimo ir katalitinei funkcijoms suderinti.

Kita vertus galingas įrankis baltymų specifiškumo keitimui yra evoliucija *in vitro*. Turima struktūrinė informacija labai padeda pasirinkti baltymo fragmentus, į kuriuos bus nukreipta atsitiktinė mutagenėzė, taip sumažinant reikalingą mutantų bibliotekų dydį ir žymiai padidinant tikimybę atrinkti norima savybe pasižyminčią MTazę.

1.9. DNR metiltransferazės – molekulinės biologijos įrankiai

Daug DNR sintezės ir reparacijos fermentų (DNR polimerazės, atvirkštinės transkriptazės, ligazės, kinazės, uracilglikozilazė, restrikcijos endonukleazės ir kt.) seniai tapo nepakeičiamais šiuolaikinės genų inžinerijos įrankiais, tuo tarpu DNR MTazių pritaikymas ilgai nebuvo plačiai paplitęs ir apsiribodavo pavieniais atvejais fundamentiniuose moksliniuose tyrimuose. DNR MTazių panaudojimą genų inžinerijoje labiausiai riboja tai, kad prie DNR prijungiama metilgrupė minimaliai įtakoja DNR struktūrą, nepasižymi geromis reporterinėmis savybėmis bei nesuteikia DNR naujų cheminių savybių. Kita vertus, sugebėjimas kovalentiškai modifikuoti specifines DNR vietas – vertinga MTazių savybė, galinti būti naudinga genų inžinerijoje ir nanotechnologijoje. Todėl pastaruoju metu publikuojama vis daugiau metodų,

kuriuose DNR MTazės panaudojamos kaip įrankiai biologijos uždaviniams spręsti (apžvelgta (Buryanov ir Shevchuk, 2005; Klimašauskas ir Weinhold, 2007)), taigi tikėtina, kad situacija pasikeis. Svarbų vaidmenį tame vaidina ir keletą dešimtmečių trukę DNR MTazių katalitinio mechanizmo tyrimai.

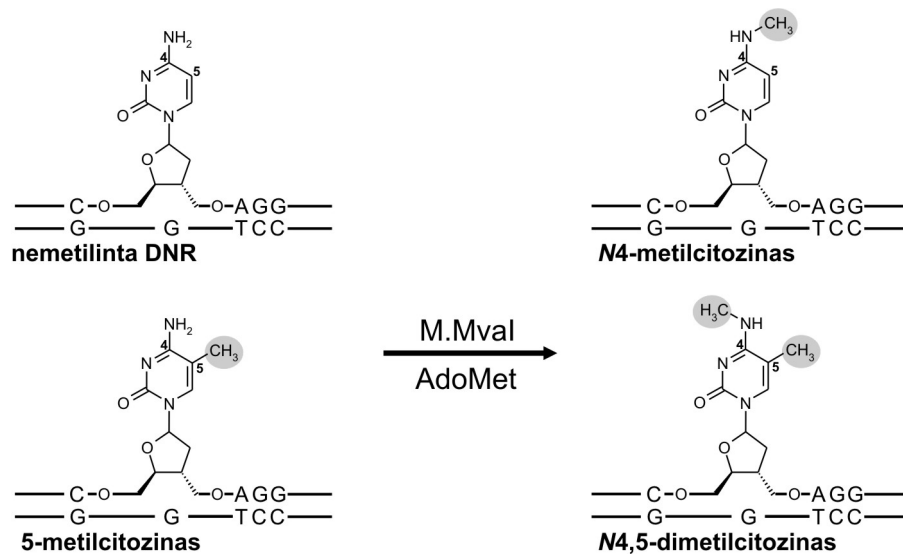
1.9.1. DNR apsaugojimas nuo restrikcijos endonukleazių

Konkrečiam mikroorganizmui pritaikytų genų inžinerijos metodų, prieinamumas – viena iš esminių sąlygų išsamiesiems to mikroorganizmo tyrimams. Dažnai genetinių manipuliacijų galimybes riboja efektyvių transformacijos metodų nebuvimas. Viena iš kliūčių efektyviam DNR įvedimui į ląstelę gali būti restrikcijos modifikacijos sistemos. Panaudojant išgrynintas DNR MTazes arba MTazes ekspresuojančių mikroorganizmų beląstelinius ekstraktus, galima prieš transformaciją DNR metilinti, taip apsaugant nuo restrikcijos nukleazių ir padidinant transformacijos efektyvumą. Tokiu būdu pavyko transformuoti kai kuriuos žmogaus skrandyje parazituojančios bakterijos *Helicobacter pylori* kamienus (Donahue ir kt., 2000), *Bacillus cereus* ir *Bacillus weihenstephanensis*, aptinkamus sugedusiuose maisto produktuose (Groot ir kt., 2008), ir padidinti *Streptomyces griseus* transformacijos efektyvumą (Kwak ir kt., 2002).

1.9.2. Eukariotinių organizmų DNR metilinimo tyrimas

Tiriant eukariotinių organizmų metilinimą dažniausiai naudojama M.SssI (CG), kurios atpažįstamas taikinytis sutampa su eukariotinių MTazių taikiniu. Tiriami DNR metilinami M.SssI, naudojant AdoMet su tričiu žymėta metilgrupe. Įjungtos į DNR radioaktyvios žymės kiekis proporcingas nemetilintų CG dinukleotidų kiekiui genome. Toks eksperimentas nesuteikia duomenų apie konkrečių lokusų metilinimą, bet leidžia įvertinti globalinį DNR metilinimo lygį. Kadangi tokiam eksperimente nėra galimybės turėti tikrą neigiamą kontrolę (visai nemetilintą genomine DNR), o absoliutaus į DNR įjungto radioaktyvumo kiekio matavimas yra labai nepatikimas, šiuo metodu

galima tik palyginti tarpusavyje kelis mėginius, bet sunku lyginti skirtingų eksperimentų rezultatus (Nephew ir kt., 2009).

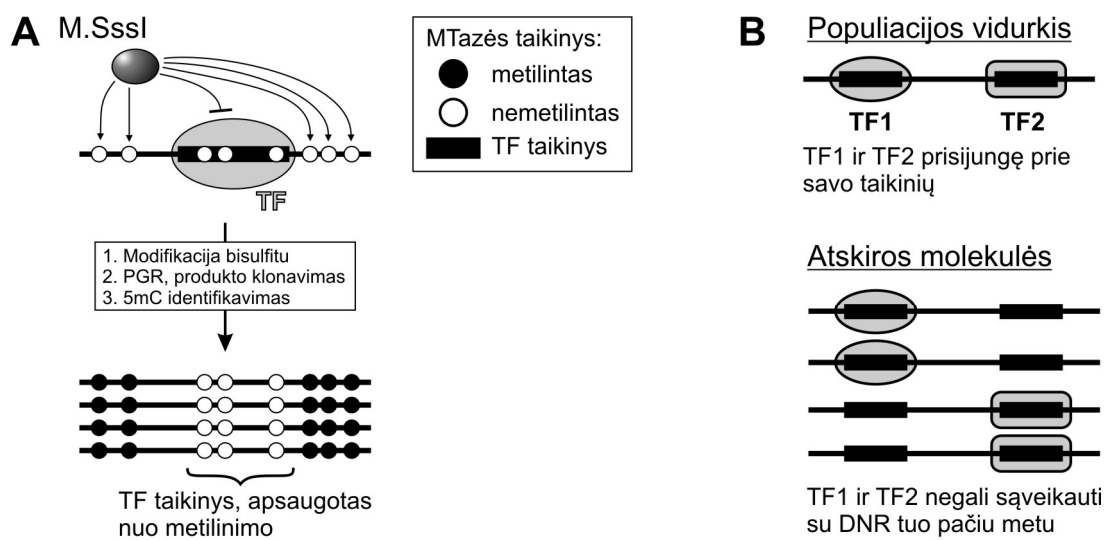


1.14 paveikslas. M.MvaI katalizuojamas citozino dimetilimas. Pernešama metilgrupė pavaizduota pilkame fone, pažymėtos citozino žiedo 4-a ir 5-a padėtys.

Įdomi šio metodo modifikacija pasiūlyta augalams būdingo CNG sekų metilinimo tyrimui, naudojant C5-MTazę EcoRII ir citozino-N4 MTazę BstNI (arba MvaI) (Shevchuk ir Burianov, 1999). Abi šios MTazės metilina antrąją citoziną sekoje CCWGG, susidarant atitinkamai 5mC ir 4mC. Unikali M.BstNI ir M.MvaI savybė ta, kad šios MTazės efektyviai metilina savo taikinių netgi tada, kai metilinamo citozino vietoje yra 5-metilcitozinas. Šioje reakcijoje susidaro N4,5-dimetilcitozinas (4,5mC) – nei gamtinėje DNR, nei RNR neaptinkama bazė (**1.14 pav.**) (Butkus ir kt., 1985). Metilinant tiriamą DNR M.BstNI (arba M.MvaI) nemetilintuose taikiniuose susidaro 4mC, o metilintuose – 4,5mC, kuriuos lengva chromatografiškai atskirti frakcionuojant iki nukleotidų hidrolizuotą DNR. Taip galima tiesiogiai, viename eksperimente nustatyti nemetilintų ir metilintų taikinių santykį. Deja, nėra žinoma kitų specifiškumą citozino-N4 MTazių, kurios efektyviai metilintų jų taikinyje esantį 5mC. Naudojant M.MvaI ar M.BstNI galima tirti tik augalų metilinimą (žinduoliams CNG metilinimas nebūdingas), ir tik taikiniuose, persidengiančiuose su CCWGG sekomis (Shevchuk ir Burianov, 1999).

1.9.3. Chromatino struktūros tyrimas

Eukariotinės DNR supakavimui į nukleosomas ir sąveikai su įvairiais baltymais tirti dažnai naudojamas „kojų atspaudų“ metodas. Kadangi reakcijos su bisulfitu dėka galima identifikuoti 5mC DNR sekoje (Clark ir kt., 2006), DNR C5-MTazės galima panaudoti kaip reagentus atvirų chromatino sričių vizualizavimui.



1.15 paveikslas. MTazių panaudojimas chromatino struktūros ir transkripcijos faktorių sąveikos su DNR tyrimui. A – transkripcijos faktorių sąveikos su DNR tyrimas „kojų atspaudų“ metodu, naudojant M.SssI. B – skirtumai tarp informacijos, gaunamos analizuojant populiaciją ir atskiras molekules.

Veikiant DNR C5-MTazėms atviros chromatino sritys metilinamos, o esančios nukleosomose arba sąveikaujančios su kitais baltymais – ne (1.15 pav. A) (Kladde ir Simpson, 1994). Po metilinimo reakcijos DNR modifikuojama bisulfitu, padauginama PGR būdu ir nustatius seką identifikuojamos metilintos ir nemetilintos DNR pozicijos (apžvelgta (Pondugula ir Kladde, 2008)). DNR metiltransferazės galima naudoti kaip įprastus reagentus *in vitro* arba ekspresuoti tiriamoje ląstelėje, ir tuomet DNR metilinimas vyks *in vivo*. Taip galima stebėti silpnas sąveikas, prarandamas DNR gryninimo metu.

Klasikinis DNR skaldymu paremtas „kojų antspaudų“ metodas nesuteikia informacijos apie heterogenišką chromatiną, nes gaunamas rezultatas atitinka visos molekulių populiacijos vidurkį (**1.15 pav. B**). Todėl jeigu tiriamoje sekoje yra pvz. du skirtingų baltymų sąveikos taikiniai, neįmanoma nustatyti ar baltymai jungiasi prie savo taikinių nepriklausomai (skirtingose ląstelėse užimtas vienas, antras arba abu taikiniai), ar kooperatyviai (vienose ląstelėse užimti abu taikiniai arba abu laisvi), ar antikooperatyviai (skirtingose ląstelėse užimtas arba vienas, arba kitas taikinis, be ne abu). Tokią informaciją galima gauti naudojant DNR MTazes, kadangi klonavus bisulfitu modifikuotą DNR ir analizuojant atskirus klonus gaunama informacija apie individualių molekulių būseną. Chromatino struktūros tyrimui buvo pritaikytos C5-MTazės HhaI (GCGC), SssI (CG) ir CviPI (GC). Kuo trumpesnis MTazės atpažįstamas taikinis, tuo didesnė metodo skiriamoji geba, t.y. tuo tiksliau galima nustatyti nukleosomų ar kitų blokuojančių struktūrų ribas

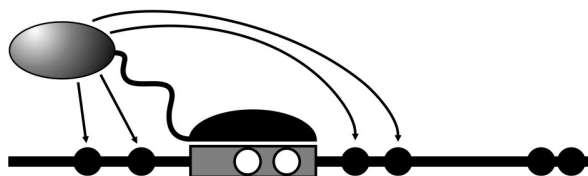
Chromatino struktūros tyrimas C5-MTazėmis ypač patogus organizmuose, kuriems nebūdingas citozino metilinimas (pvz., mielės *S.cerevisiae*). Tačiau šį metodą galima pritaikyti ir aukštesniesiems eukariotams. Pvz., naudojant M.CviPI viename eksperimente galima tirti chromatino struktūrą („kojų antspaudų metodu“ pagal GC taikinių metilinimą) ir analizuojamos DNR endogeninį metilinimą CG sekose. Tokiame eksperimente negalima vienareikšmiškai interpretuoti tik GCG sekų metilinimo (Kilgore ir kt., 2007). Metodo jautrumas gali būti padidintas, jeigu ekspresuojama MTazė nukreipiama į norimą genomo vietą suliejus ją su DNR atpažįstančiu baltymu. Tokiu atveju galima stebėti kitų baltymų sąveiką ar nukleosomų išsidėstymą šalia to baltymo taikinio (Carvin ir kt., 2003a; Jessen ir kt., 2004).

1.9.4. Norimų vietų eukariotų genomuose metilinimas

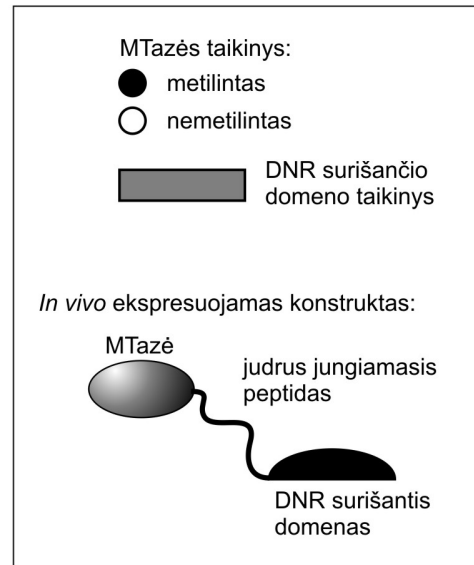
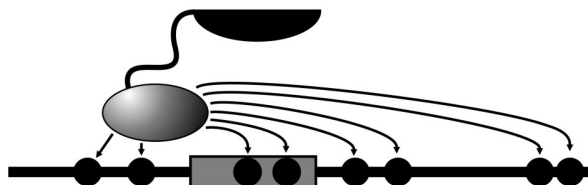
Aukštesniuose eukariotuose citozino metilinimas susijęs su genų ekspresijos nutildymu ir heterochromatino susidarymu. Todėl nukreipus DNR MTazes į konkrečią genomo vietą, jos galėtų būti panaudojamos tiriamų genų

ekspresijos nutildymui. Šis genų nutildymo metodas įdomus dar ir todėl, kad DNR metilinimas vėliau yra stabiliai paveldimas veikiant palaikančiam DNR metilinimui. Kadangi pačios DNR MTazės atpažįsta trumpas DNR sekas ir genome turi daug taikinių, jas nukreipti į norimą genomo vietą galima suliejus su labiau specifiskais baltymais – cinko pirštų motyvais ar eukariotinių transkripcijos faktorių DNR surišančiais domenais (**1.16 pav.**).

Nukreiptas metilinimas



Nenukreiptas metilinimas



1.16 paveikslas. DNR metilinimo nukreipimas į norimą genomo vietą. Nenukreiptą metilinimą lemia pačios MTazės giminingumas jos taikiniams.

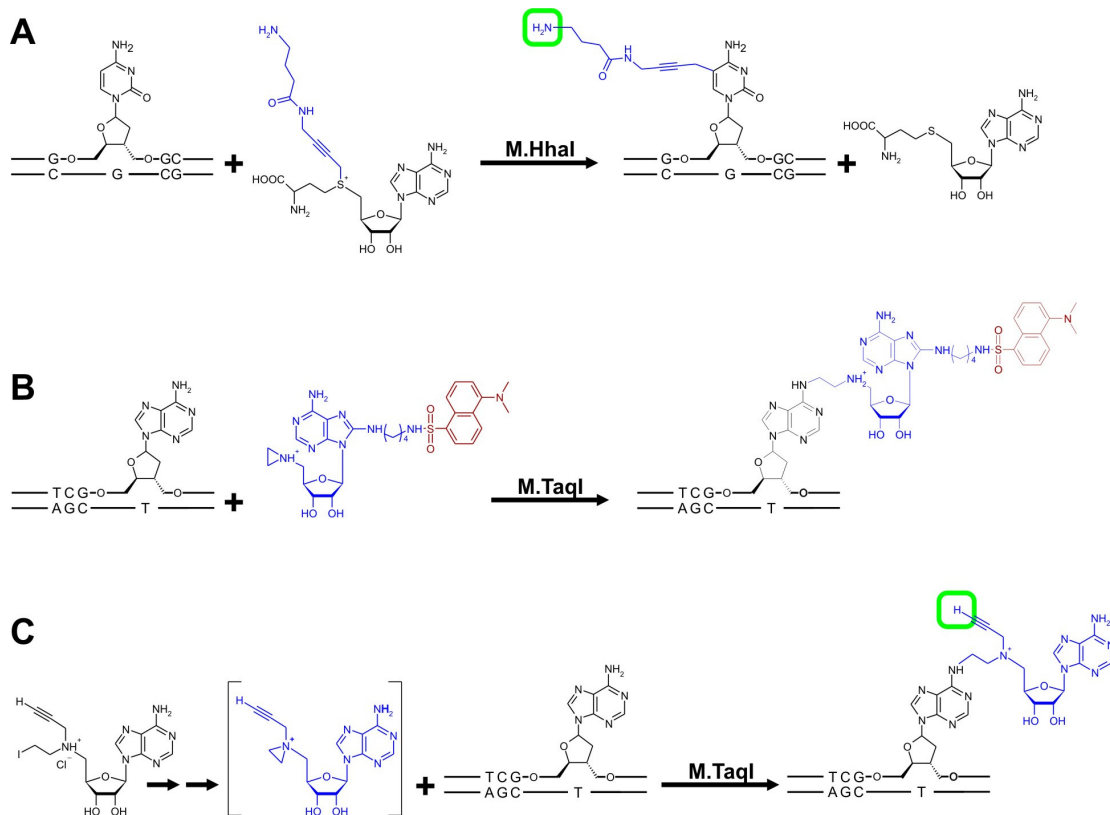
Eukariotinėse ląstelėse ekspresavus pelės DNR MTazių Dnmt3a ir Dnmt3b katalitinius domenus, sulietus su GAL4 DNR surišančiu domenu arba sintetiniu Zn pirštų motyvu, nustatyta, kad tokios chimerinės MTazės metilina reporterinio geno promotorių ir nutildo to geno raišką (Li ir kt., 2007). Tačiau MTazių nukreipimas nėra paprastas uždavinys. Kadangi ne tik nukreipiantysis baltymas, bet ir pati MTazė pasižymi giminingumu DNR, dažna problema yra nenukreiptas metilinimas MTazės taikiniuose (**1.16 pav.**) (Carvin ir kt., 2003b; Meister ir kt., 2008). Tai labai nepageidautina, kadangi tokiu būdu gali būti veikiami ne tik tiriamo, bet ir kitų genų raiška. Norint padidinti nukreipto metilinimo specifiskumą buvo panaudotos mutantinės DNR metiltransferazės, silpniau sąveikaujančios su DNR (Smith ir Ford, 2007).

1.9.5. Funkcinių ir reporterinių grupių įvedimas į specifines gamtinių DNR molekulių vietas

Vienas iš reikšmingiausių pastarųjų metų žingsnių atveriant kelią platesniam DNR MTazių pritaikymui buvo žengtas susintetinus kofaktoriaus AdoMet analogus ir nustatčius, kad jie gali dalyvauti DNR MTazių katalizuojamose reakcijose. Buvo susintetinti dviejų klasių AdoMet analogai, kuriuose 1) sulfonio centras pakeistas į aziridino žiedą, arba 2) didesnė grupė prijungta pernešamos metilgrupės vietoje. Naudojant šiuos AdoMet analogus DNR MTazės buvo pritaikytos didesnių ir chemiškai įvairesnių grupių prijungimui specifinėse didelių gamtinių DNR molekulių sekose (apžvelgta (Klimašauskas ir Weinhold, 2007)).

Aziridinio kofaktoriuose AdoMet aminorūgštis liekana pakeista aziridino žiedu (**1.17 pav. B**). Vandeniniuose tirpaluose aziridino žiedas protonuojamas ir lengvai reaguoja su palankiai orientuotu nukleofilu MTazės aktyviame. Reakcijos metu atsidaroma aziridino žiedas ir prie adenino egzociklinės aminogrupės kovalentiškai prijungiamas visas kofaktorius. Pastebėta, kad po reakcijos MTazės ir modifikuotos DNR kompleksas neišyra, tikriausiai todėl, kad negali disocijuoti prie DNR prijungtas kofaktorius. Taigi fermentas atlieka tik vieną apskuką ir veikia kaip reagentas, o ne kaip katalizatorius (Pljevaljic ir kt., 2003). Nustatyta, kad tokią reakciją katalizuoja visų trijų klasių DNR MTazės, bet daugiausia darbų atlikta su N6-adenino MTaze TaqI. AdoMet analogai su aziridino žiedu buvo sėkmingai pritaikyti DNR žymėjimui, prie kofaktoriaus adenino žiedo C8 atomo prijungus fluorescuojantį dažą dansilą arba biotiną (Pljevaljic ir kt., 2004). Taip pat aprašytas kofaktorius, kuriame prie adenino N6 padėties prijungtas fluoroforas Cy3 (Schmidt ir kt., 2008). Tokia DNR žymėjimo technologija pavadinta SMILing (*sequence-specific methyltransferase-induced labelling*). Panaudojus biotiną turintį kofaktoriaus analogą, prie kelių šimtų bp ilgio DNR fragmento specifinėse sekose (M.TaqI arba M.BseCI taikiniuose) buvo prijungtas streptavidinas, o per jį – su biotinu konjuguotos aukso nanodalelės. Likusi DNR dalis elektrostatinės sąveikos dėka buvo padengta kvantiniais taškais.

Potencialiai tokios struktūros galėtų būti naudingos molekulinėje elektronikoje (Braun ir kt., 2008).



1.17 paveikslas. DNR žymėjimas specifinėse sekose naudojant MTazes ir AdoMet analogus. **A** – AdoMet analogas su ilgesne pernešama grupe (Lukinavičius ir kt., 2007); **B** – kofaktoriaus su aziridino žiedu (Pljevaljic ir kt., 2004); **C** – AdoMet analogas N-alkilhalogenidas (Weller ir Rajska, 2005). Prie DNR prijungiama kofaktoriaus dalis mėlyna, fluorescuojanti dancilo grupė raudona, žaliai apibraukta reaktyvi grupė, prie kurios galima prijungti reporterinę grupę.

Kaip alternatyva labai reaktyviems aziridino kofaktoriaus buvo aprašyti N-alkilhalogenidų dariniai (**1.17 pav. C**) (Weller ir Rajska, 2005). Manoma, kad šių analogų atveju reaktyvus aziridino žiedas yra tarpinis junginys, susidarantis reakcijos metu. Nustatyta, kad reakcijas su tokiais kofaktoriais katalizuoja dvi adenino N6-MTazės TaqI ir EcoRI. Šių reakcijų metu kartu su visa kofaktoriaus molekule prie DNR prijungiama terminalinė alkino grupė, galinti dalyvauti ciklo prijungimo reakcijose su azidais, kurių metu prie DNR galima prijungti reporterinę grupę.

Susintetinus stabilus AdoMet analogus, turinčius pirminę aminogrupę pernešamame radikale (**1.17 pav. A**), šie analogai buvo sėkmingai pritaikyti specifinių DNR sekų žymėjimui MTazių katalizuojamose reakcijose (Lukinavičius ir kt., 2007). Toks DNR žymėjimo būdas buvo pavadintas mTAG (*methyltransferase-directed transfer of activated groups*). Šiuo atveju atliekamas dviejų stadijų DNR žymėjimas: pirmiausia MTazės katalizuojamoje reakcijoje prie DNR prijungiama pirminė aminogrupė, prie kurios kitame žingsnyje chemiškai prijungiamos reporterinės grupės – fluorescuojantys dažai arba biotinas. Reporterinių grupių prijungimui naudojami gerai žinomi prekyboje esantys NHS esteriai. Žymėjimas dviem stadijom nėra trūkumas, kadangi naudojant tą patį kofaktorių galima DNR pažymėti skirtingomis žymėmis (pvz. fluorescuojančiu dažu ir biotinu) ir tą pačią DNR panaudoti skirtingiems eksperimentams. Skirtingai nuo SMILing technologijos, mTAG atveju DNR MTazės ir modifikuotos DNR kompleksas po reakcijos išyra ir MTazė veikia kaip katalizatorius (Dalhoff ir kt., 2006). Taip pat pažymėtina, kad naudojant mTAG prie DNR prijungiama mažesnė grupė, taigi mažiau keičiamos DNR savybės. Panaudojant mTAG technologiją, buvo pademonstruota galimybė sukurti „DNR fluorokodą“ (Neely ir kt., 2010), suteikianti galimybę atpažinti konkrečias DNR molekules pagal tik joms būdingą fluorescuojančių žymių išsidėstymą. Šiuo atveju DNR žymėjimas MTazės taikiniuose „perskaitomas“ superskiriamosios gebos mikroskopijos metodais (*superresolution microscopy*).

Tiriant MTazių katalizuojamas reakcijas su tokiais kofaktoriaus analogais buvo pastebėta, kad ilginant pernešamą grupę reakcijos efektyvumas stipriai mažėja ir dėl erdvinių trukdžių kofaktoriaus surišimo centre laukinio tipo MTazės dažniausiai neperneša daugiau negu trijų anglies atomų. Norint pritaikyti MTazes efektyviam ilgesnių grupių prijungimui prireikė ne tik surasti tinkamą pernešamos grupės struktūrą, bet ir modifikuoti MTazių aktyvų centrą. M.HhaI komplekso su DNR struktūros analizė parodė, kad labiausiai ilgesnes pernešamas grupes turinčių kofaktorių surišimui trukdo Gln82 ir Asn304, kurių šoninės grandinės formuoja kofaktoriaus surišimo centro sieną.

Šias aminorūgštis pakeitus į alaniną, pavyko praplėsti kofaktoriaus surišimo kišenę, ir tai žymiai pagerino reakciją su ilgą pernešamą grandinę turinčiais kofaktoriais (Lukinavičius ir kt., 2007). Gln82 ir Asn304 priklauso atitinkamai IV ir X konservatyviems motyvams, taigi lengvai identifikuojamos kitose C5-MTazėse, kas leidžia tikėtis, kad reakcijoms su kofaktoriaus analogais bus galima nesunkiai pritaikyti įvairių specifiškumų MTazes (G. Lukinavičius ir S. Klimašauskas, nepublikuoti rezultatai).

1.9.6. Kitos DNR MTazių pritaikymo sritys

Gerai ištyrinėtas DNR MTazių veikimo mechanizmas suteikia galimybę pritaikyti šiuos fermentus daugeliui tikslų. Pavyzdžiui, DNR C5-MTazių sugebėjimus sudaryti negrįžtamą kovalentinį kompleksą su 5-fluorocitoziną turinčia DNR buvo panaudotas konstruojant polivalentinį nanodarinį. Šio konstrukto karkasą sudarė fluoresceinu žymėtas Y formos sintetinis DNR karkasas, trijuose M.EcoRII taikiniuose turintis 5FC. Prie šių taikinių buvo prijungtas su metiltransferaze EcoRII konjuguotas tioredoksinas. Nustatyta, kad toks nanodariny s sąveikauja su eukariotinių ląstelių paviršiuje esančiais tioredoksino receptoriais ir nevienodu efektyvumu žymi skirtingas ląstelių linijas (Singer ir Smith, 2006), taigi galėtų būti panaudotas greta įprastų imunologinių metodų skirtingoms ląstelėms atskirti.

MTazių reakciją su 5FC buvo pasiūlyta panaudoti kaip būdą susieti baltymą su koduojančia DNR baltymų atliekant baltymų evoliuciją *in vitro* emulsijoje (Bertschinger ir Neri, 2004). Šiuo atveju modifikuojamas baltymas suliejamas su M.HaeIII ir vykdoma *in vitro* transkripcija ir transliacija emulsijoje. Emulsija sudaroma taip, kad daugumoje ląstelių būtų tik viena DNR molekulė. Susintetinus baltymą, M.HaeIII kovalentiškai prisijungia prie jos taikiniuose esančio 5FC, taigi modifikuojamas baltymas prijungiamas prie jį koduojančios DNR. Suardžius emulsiją ir atrinkus norima savybe pasižyminčius baltymus, galima padauginti juos koduojančią DNR.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

Darbe naudoti tik didžiausio švarumo reagentai iš *Sigma-Aldrich*, *Roth*, *Oxoid*, *Millipore*, *Whatman*, *Merk*, *Fluka*, *Amersham Pharmacia Biotech*, *Fisher*, *Amresco* firmų.

2.2. Radioaktyvios medžiagos

Pirktos iš *Amersham Pharmacia Biotech*.

γ -³³P]ATP – savitasis aktyvumas 3000 Ci/mmol (1 mCi/ml);

[γ -³²P]ATP – savitasis aktyvumas 6000 Ci/mmol (1 mCi/ml);

[*metil*-³H]AdoMet:

- savitasis aktyvumas 70-84 Ci/mmol (1 mCi/ml);
- savitasis aktyvumas 15-16,1 Ci/mmol (1 mCi/ml);
- savitasis aktyvumas 0,5 Ci/mmol (0,5 mCi/ml).

2.2.1. Kofaktorius ir jo analogai

AdoMet

- **S-(5'-adenozil)-L-metionino chloridas**, 70% grynumas (*Sigma Aldrich*).
- **S-(5'-adenozil)-L-metionino p-toluensulfonatas**, 91% grynumas (*Sigma Aldrich*).

Prieš naudojimą komercinis AdoMet grynintas kaip aprašyta 2.11.1 skyriuje.

AdoHcy – *Sigma Aldrich*.

AdoPentin – S izomeras, >90% grynumas; gautas iš dr. G. Lukinavičiaus.

AdoHxGABANH₂ – raceminis mišinys, >90% grynumas; gautas iš dr. G. Lukinavičiaus.

2.2.2. Terpės *E.coli* auginimui

LB terpė 10 g/l peptono, 5 g/l mielių ekstrakto, 10 g/l NaCl, pH ~7,5.

M9 terpė 1× M9 druskų mišinys, 2 mM MgSO₄, 100 μM CaCl₂, 0,02 g/l aminorūgščių (Trp, His, Met), 0,0006 % tiamino, 0,4 % gliukozės.

5×M9 druskų mišinys 42,6 g/l Na₂HPO₄·2H₂O, 15 g/l KH₂PO₄, 2,6 g/l NaCl, 5 g/l NH₄Cl.

Agarizuota LB arba M9 terpė atitinkama terpė su 12 g/l agaru.

2.2.3. Bakterijų kamienai

ER1727 – F' *lac proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 / fhuA2 Δ(lacZ)r1 glnV44 trp-31 mcrA1272::Tn10 (Tc^r) his-1 rpsL104 (Str^r) xyl-7 mtl-2 metB1 Δ(mcrC-mrr)102:: Tn10 (Tc^r)* (Dila ir kt., 1990).

ER2267 – F' *proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 zzf::mini-Tn10 (Km^r) / e14⁻(McrA⁻) endA1 supE44 thi-1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 Δ(argF-lac)U169 recA1* (New England Biolabs).

ER2566 lacI^q – F' *proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 zzf::mini-Tn10 (Km^r) / fhuA2[lon] ompT lacZ:T7 genas1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10—TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1[dcM]*. Šis kamienas sukonstruotas į ER2566 kamieną (New England Biolabs) įterpiant episomą iš ER2267 kamieno. Episomoje esantis *lacI^q* genas užtikrina stipresnę tikslinio geno raiškos represiją (Goda Mitkaitė, nepublikuoti rezultatai).

2.2.4. Baltymų preparatai

BSA – 2 mg/ml (Pierce).

Mutantiniai M.HhaI baltymai:

M.HhaI C81S – gautas iš dr. G. Lukinavičiaus.

M.HhaI W41F (W41F) – gautas iš dr. E. Merkienės.

2.3. DNR preparatai

Komerciniai DNR preparatai

Fago λ DNR (dam^- , dcm^-), **pUC19** (Ap^r , pMB1 replikonas), **pUC19/SmaI** (pUC19 sukirtas su R.SmaI), **pBR322** (Ap^r , Tc^r , pMB1 replikonas) – *Fermentas*.

Poli[dG-dC]·poli[dG-dC] (*Sigma-Aldrich*); poli[dG-dC]·poli[dG-dC] koncentracija nustatyta spektrofotometriškai kaip bendra nukleotidų koncentracija, naudojant publikuotą $\epsilon_{254} = 8,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Wells ir kt., 1970). Dvigrandžių M.HhaI taikinių koncentracija apskaičiuota išmatuotą koncentraciją dalinant iš keturių (Wu ir Santi, 1987).

DNR modifikacijos tyrimų laboratorijoje sukonstruotos plazmidės

pHH553 – M.HhaI ekspresijos vektorius, sukonstruotas pUHE25-2 pagrindu: Ap^r Cm^r , pMB1 replikonas. Šioje plazmidėje MTazės geno transkripciją kontroliuoja *LacI* represuojamas fago T7 ankstyvasis promotorius $P_{A1-04/03}$ (H.Bujard, nepublikuoti duomenys). *hhaIM* gene nekeičiant koduojamo baltymo aminorūgščių sekos, sukurti unikalūs REazių Acc65I, Ecl136II, Cfr9I (SmaI), BspTI, Eco91I, BpiI taikiniai (Merkienė ir Klimašauskas, 2005).

pHH553 pagrindu sukonstruotos plazmidės:

- **pHH Δ 324G** – ekspresijos vektorius, koduojantis didesnio tirpumo M.HhaI variantą Δ 234G, kuriame C-galinis hidrofobinis tetrapeptidas FKPY pakeistas glicinu (Daujotytė ir kt., 2003).
- **pL2Bsp** – plazmidė, koduojanti hibridinę MTazę L2Bsp:Hha. Joje M.HhaI atpažinimo Kilpa-2 pakeista fragmentu iš M.Bsp6I (atpažįstama seka GCNGC, metilinamas citozinas pabrauktas). Plazmidė gauta dr. G. Vilkaičio.

pHKRM – M.HhaI W41F/I86W koduojanti plazmidė, sukonstruota pUHE25-2 pagrindu: Ap^r Cm^r , pMB1 replikonas, *hhaIM* geno raišką kontroliuojantis $P_{A1-04/03}$ promotorius; unikalūs REazių Acc65I, Cfr9I (SmaI), BspTI, Eco91I, BpiI taikiniai. Plazmidė buvo gauta iš dr. E. Merkienės.

Sintetiniai DNR oligonukleotidai

Darbe naudoti firmose *Fermentas*, *MWG-Biotech* ir *Integrated DNA Technologies* susintetinti DNR oligonukleotidai. Mutantinių genų konstravimui ir sekoskaitai naudoti oligonukleotidai po sintezės gryninti pašalinant druskas. Biocheminiams eksperimentams naudoti arba nudruskinti, arba HPLC gryninti oligonukleotidai. Prieš pradedant darbus oligonukleotidų kokybė buvo tikrinama pažymint jų 5'-galą ^{32}P ir frakcionuojant 15% denatūruojančiame PAA. Kinetiniuose eksperimentuose naudoti oligonukleotidų preparatai, turintys ne mažiau kaip 80% teisingo ilgio produkto.

2.1 lentelė. Pradmenys bisulfitu modifikuotos DNR padauginimui.

Fragmentas	Pradmuo	Pradmens seka	Analizuojama grandinė	Fragmento ilgis*, nt	Pozicija pBR322 molekulėje**
I	NG-VP1	GTTGTGTAGATAATTATGATATGGGAGGG	viršutinė	237	3369-3364
	NG-VA7	AAACCAAACTAAATAAAACCATAACCAAAC			
II	NG-AP2	TTTCATTCATCCATAATTACCTAACTCCCC	apatinė	294	3339-3695
	NG-AA8	GGGGGATTATGTAATTTGTTTTGATTGTTGGGA			
III	NG-VP5	GTTGTTGTTATTGTTATAGGTATTGTGGTG	viršutinė	312	3594-3967
	NG-VA3	CATTTTCCAATAATAAACACTTTTAAAAATTCT			
IV	NG-AP6	CAACATTATTACCATTACTACAAACATC	apatinė	309	3590-3958
	NG-AA4	ATGATGATGATTTTTAAAGTTTTGTTATGTGG			
V	MV-VP1	TTAGGGGATAATGTAGGAAAGAATATGTGAG	viršutinė	257	2451-2768
	MV-VA2	AACAACCTACACCAAACTAAAATACCTACA			
VI	MV-AP3	CTCAAAAACAATAATACAATTATCCACAAAATC	apatinė	223	2420-2707
	MV-AA4	GAAGGGAGAAAGGTGGATAGGTATTTGGTAAG			

* neįskaitant pradmenų hibridizacijos vietas.

** amplifikuojamo fragmento pozicija pBR322 molekulėje, apimant pradmenų hibridizacijos vietas.

Pradmenys sekoskaitai ir mutacijų įvedimui

Mutacijų vietos pabrauktos, išsigimusios pozicijos paryškintos.

H5	TTTTCGCAATGATCTCAATATTC
V2	ATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGC
1040	AGGCGTATCACGAGGCC
S7H	AACTATCTGGGTAGC
M13/pUC rev (-46), 24-mer	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
M13/pUC dir (-46), 22-mer	GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA
HH-L2-Δ5	ATTAC <u>CTTAAGT</u> GCT NNSNNS GG ANNSNNS GGTTACCTAGTAAACGGG
HH-ΔHisTag	<u>TTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCCATTTAATGATGAAC</u>

2.2 lentelė. Dvigrandžiai oligonukleotidai biocheminiams M.HhaI tyrimams.

M.HhaI taikiny	Taikinio bazių pora	Oligonukleotido seka
G <u>C</u> GC/GMGC*	C:G	5' -TACAGTATCAGG <u>C</u> GC TGACCCACAA TGTCATAGTCC <u>G</u> MGACTGGGTGTTG-5'
G <u>C</u> GC/GMTC	C:T	5' -TACAGTATCAGG <u>C</u> GC TGACCCACAA TGTCATAGTCC <u>T</u> MGACTGGGTGTTG-5'
G <u>C</u> GC/GMCC	C:C	5' -TACAGTATCAGG <u>C</u> GC TGACCCACAA TGTCATAGTCC <u>C</u> MGACTGGGTGTTG-5'
G <u>s</u> GC/GMGC*	s:G	5' -TACAGTATCAGG <u>s</u> GC TGACCCACAA TGTCATAGTCC <u>G</u> MGACTGGGTGTTG-5'
G <u>P</u> GC/GMTC*	P:T	5' -TACAGTATCAGG <u>P</u> GC TGACCCACAA TGTCATAGTCC <u>T</u> MGACTGGGTGTTG-5'
G <u>F</u> GC/GMGC*	F:G	5' -TACAGTATCAGG <u>F</u> GC TGACCCACAA TGTCATAGTCC <u>G</u> MGACTGGGTGTTG-5'
G <u>P</u> GC/GMGC*	P:G	5' -TACAGTATCAGG <u>P</u> GC TGACCCACAA TGTCATAGTCC <u>G</u> MGACTGGGTGTTG-5'
TCGA	-	5' -TACAGTATCAGT <u>C</u> GATGACCCACAA TGTCATAGTCA <u>G</u> CTACTGGGTGTTG-5'
G <u>F</u> GC/G <u>F</u> GC-13*	F:G	5' -TGATAG <u>F</u> GC TATC CTAT <u>C</u> G <u>F</u> GATAGT-5'

* modifikuotų nukleotidų žymėjimai: M – 5-metilcitozinas, s – bebazis taikiny (*sugar*), P – 2-aminopurinas, F – 5-fluorocitozinas.

2.3.1. Buferiniai tirpalai MTazių tyrimui *in vitro*

Metilinimo buferis I: 50 mM Tris·HCl pH 7,4, 15 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA, 2 mM β-merkaptioetanolis.

Metilinimo buferis II: 50 mM MOPS pH 7,4, 15 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA, 2 mM 2-merkaptioetanolis.

Reakcijos buferis: 10 mM Tris·HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 2 mM 2-merkaptioetanolis.

2,5^x pavyzdžio buferis (denatūruojančiai baltymų elektroforezei): 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 12% glicerolio, 2% NDS, 1,5% DTT, 0,0005% bromfenolio mëlis, 286 mM 2-merkaptioetanolis.

2.4. Manipuliacijos su DNR

2.4.1. DNR gryninimas ir koncentracijos nustatymas

DNR gryninta naudojant anksčiau aprašytas metodikas (Sambrook ir Russel, 2001). Plazmidinė DNR gryninta šarminės lizės metodu, RNR pašalinta išsodinant su LiCl. RNR likučiai pašalinti inkubuojant su RNAze A, DNR deproteinizuota fenolio-chloroformo-izoamilo alkoholio mišiniu (50:49:1), fenolis pašalintas ekstrahuojant chloroformu, DNR išsodinta izopropanoliu arba etanoliu ir tirpinta dejonizuotame vandenyje.

2.4.2. DNR elektroforezė

DNR mėginiai sumaišyti su $\frac{1}{6}$ tūrio $6\times$ pavyzdžio tirpalo (*Fermentas*) ir frakcionuoti 0,8-1,5% agarozės geliuose boratiniame buferyje (100 mM H_3BO_3 -NaOH, pH 8,2, 2 mM EDTA, 15 mM CH_3COOH) esant 10 V/cm elektrinio lauko stipriui. Po elektroforezės DNR geliuose dažyta 5-10 min. 2 μ g/ml etidžio bromido tirpalu ir stebėta UV šviesoje.

2.4.3. DNR koncentracijos nustatymas

Sintetinių DNR oligonukleotidų koncentracija buvo nustatoma spektrofotometriškai, matuojant 260 nm bangos ilgio šviesos sugertį. Oligonukleotidų sugerties koeficientai ir lydimosi temperatūra PGR reakcijoje apskaičiuoti programa OligoAnalyzer (*Integrated DNA Technologies*). Plazmidinės DNR ir didelių DNR fragmentų koncentracija buvo nustatoma atlikus elektroforezę agaroziniame gelyje ir vizualiai lyginant etidžio bromidu nudažytų elektroforetinių zonų intensyvumą su žinomos koncentracijos DNR standartais, išfrakcionuotais tame pačiame gelyje. Plazmidinės DNR koncentracijai nustatyti naudota pBR322 (0,05 μ g/ μ l; *Fermentas*), linijinių DNR fragmentų koncentracijai – molekulinės masės standartas MassRuler™ DNA Ladder Mix (0,08-10 kbp; *Fermentas*).

2.5. Genų inžinerijos metodai

Mutantinių genų konstravimas buvo atliekamas naudojant standartines metodikas (Sambrook ir Russel, 2001). Jeigu nenurodyta kitaip, PGR, DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis, defosforilinimas, DNR fragmentų susiuvimas, oligonukleotidų fosforilinimas ir žymėjimas radioaktyvia žyme buvo atliekami naudojant *Fermentas* fermentus ir rinkinius pagal gamintojo pateikiamas rekomendacijas. DNR sekoskaita buvo atliekama naudojant ³³P-žymėtą pradmenį ir DNR sekoskaitos rinkinį Cycle Reader™ DNA Sequencing Kit (*Fermentas*) arba DNR seka buvo nustatoma Biotechnologijos instituto DNR Sekvenavimo Centre.

2.6. Mikrobiologiniai metodai

2.6.1. *E.coli* transformacija cheminiu metodu

E. coli ląstelės augintos 250 ml selektyvios LB terpės ir augintos 16°C temperatūroje, intensyviai aeruojant iki OD_{600nm} = 0,6 (apie 2 paras). Ląstelės surinktos centrifuguojant 4°C temperatūroje 10 min. 1500×g, terpė nupilta, ląstelės resuspenduotos 80 ml šalto transformacijos buferio (10 mM Hepes, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂) ir 10 min. inkubuotos ledo vonioje. Antrą kartą nucentrifugavus, ląstelės suspenduotos 20 ml buferio, į jas pridėta 1,5 ml DMSO (iki 0,7%) ir painkubavus 4°C 10 min. suspensija išpilstyta po 200 μl ir užšaldyta panardinant mėgintuvėlius į skystą azotą. Taip paruoštos ląstelės saugotos -70°C temperatūroje 6-8 mėnesius, o jų transformacijos efektyvumas paprastai siekdavo ~5·10⁶ kolonijų/μg DNR (įvertintas transformuojant 1 ng pBR322 DNR).

Prieš transformaciją ląstelės inkubuotos su DNR 20 min. leduose, 40 s 42°C temperatūroje, po to užpiltos 1 ml LB terpės, inkubuotos dar 1-2 val. 37°C temperatūroje ir išsėtos ant selektyvios agarizuotos terpės.

2.6.2. *E.coli* elektroporacija

Į 2× 800 ml LB terpės su 30 µg/ml kanamicino užsėta 10 ml stacionarios fazės ER2566 *lacI^f* kultūros ir ląstelės augintos 37°C temperatūroje iki OD_{600nm} = 0,5-0,6. Ląstelės atšaldytos ir surinktos centrifuguojant 2500×g 10 min. 4°C temperatūroje. Tolesniuose etapuose centrifuguota tomis pačiomis sąlygomis, ląstelės visuomet laikytos ledo vonioje ir joms resuspenduoti naudoti atšaldyti tirpalai. Ląstelės plautos keturis kartus po 500 ml sterilaus vandens ir vieną kartą 190 ml 10% (v/v) sterilaus glicerolio. Tuomet ląstelės resuspenduotos 1,6 ml 10% glicerolio, išpilstytos po 150 µl ir užšaldytos -80°C. Taip paruoštos ląstelės saugotos -80° temperatūroje ~6 mėn. Paprastai viename mėgintuvėlyje būdavo ~3·10⁹ gyvų ląstelių, iš kurių 20-50% galinčių transformuotis (įvertinta elektroporuojant 1 µg pBR322 DNR).

Elektroporacijai ląstelės atšildytos ledo vonioje, ir pridėjus 0,5-1 µg transformuojamos DNR mišinys supiltas į atšaldytą elektroporacijos kiuvetę (atstumas tarp elektrodų 0,2 cm, *Bio-Rad*). Elektroporacija vykdyta naudojant 2,5 kV įtampą, esant iškrovos trukmei 5,1-5,4 ms. Po elektros šoko ląstelės resuspenduotos 5 ml LB terpės, inkubuotos purtyklėje 37°C 1 val. ir išsėtos ant selektyvios agarizuotos arba į selektyvią skystą terpę.

2.6.3. Bakterijų auginimo sąlygos

Transformantų atrankai ląstelės augintos selektyvioje terpėje su 100 µg/ml ampicilino arba karbenicilino (atsparumas, koduojamas plazmidėje) ir 30 µg/ml kanamicino (atsparumas, koduojamas kamienuose ER2267 ir ER2566 *lacI^f*) arba 10 µg/ml tetraciklino (atsparumas, koduojamas kamiene ER1727).

Plazmidinės DNR, naudojamos mutantinių genų konstravimui, skyrimui *E.coli* ląstelės augintos selektyvioje LB terpėje 37°C temperatūroje per naktį.

L2Bsp specifškumo *in vivo* analizei hibridinė MTazė superekspresuota ER1727 kamiene: į 200 ml selektyvios LB terpės užsėta 8 ml stacionarios fazės *E.coli* kultūros, turinčios plazmidę pL2Bsp. Ląstelės augintos 37°C

temperatūroje intensyviai aeruojant iki $OD_{600\text{ nm}} = 0,5-1,0$ (paprastai 4-5 val.). Tada į auginimo terpę pridėta IPTG iki 0,4 mM ir ląstelės kultivuotos 37°C temperatūroje dar dvi valandas. Po to biomasė surinkta centrifuguojant ir iš jos išgryninta plazmidinė DNR.

Mutantinių MTazių bibliotekos konstravimas ir atranka, MTazių aktyvumo *in vivo* tyrimas esant baziniam genų raiškos lygiui, atliktas auginant ER2267 arba ER2566 *lacI^q* ląsteles su reikiama plazmide selektyvioje skystoje arba agarizuotoje M9 terpėje 37°C per naktį.

Baltymų gryninimui, MTazės ekspresuotos *E.coli* ER 2267 kamiene. Į 3×1 l selektyvios M9 terpės užsėta po 40 ml naktinės kultūros ir ląstelės augintos 37°C temperatūroje iki $OD_{600\text{ nm}} \sim 0,6$. Tuomet ląstelės perkeltos į 16°C temperatūrą, baltymo sintezė indukuota pridedant 0,4 mM IPTG ir ląstelės inkubuotos šiomis sąlygomis per naktį.

2.7. Mutantinių *hhaIM* genų konstravimas

2.7.1. Didesnio tirpumo M.HhaI su C-galiniu His₆ fragmentu konstravimas

pΔ324GH₆ konstruota PGR mutagenezės būdu, naudojant pΔ324G kaip matricą ir pradmenis H5 bei HH-ΔHisTag. Gautas 484 bp PGR produktas deproteinizuotas, išsodintas etanoliu ir sukirptas R.BpiI. Išgrynintas 179 bp fragmentas klonuotas į pHH553 per R.BpiI ir R.HindIII taikinius: pHH553 sukirpta R.HindIII, gauti lipnūs galai užbukinti inkubuojant su T4 DNR polimeraze, po to sukirptas R.BpiI. Reikiamos struktūros plazmidę turintys transformantai atrinkti atlikus plazmidinės DNR restrikcinę analizę ir nustačius modifikuojamo regiono nukleotidų seką.

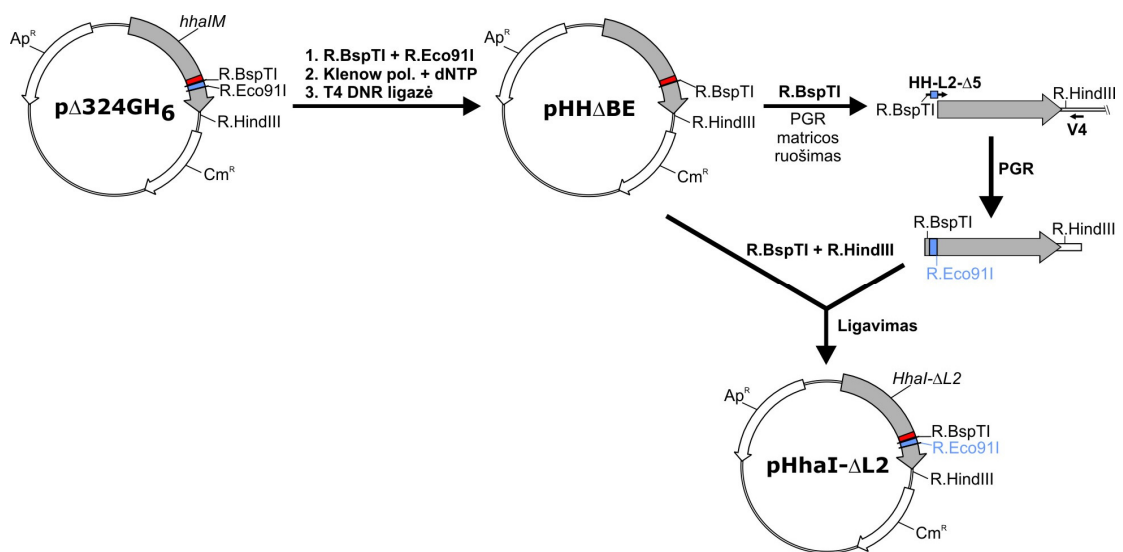
2.7.2. Didesnio tirpumo pL2Bsp-Δ324GH₆

Plazmidės pL2Bsp ir pΔ324GH₆ sukirptos R.Eco81I ir R.Eco91I. Karpant pΔ324GH₆ gauti fragmentai defosforilinti inkubuojant su krevečių šarmine fosfataze. Sukirptos plazmidės išfrakcionuotos agaroziniame gelyje ir

išgrynintas didesnysis (3700 bp) p Δ 324GH₆ fragmentas, bei mažesnis (600 bp) pL2Bsp fragmentas, apimantis modifikuotą atpažinimo Kilpą-2. Šie fragmentai susiūti naudojant T4 DNR ligazę ir transformuoti į ER2267 kamieną. Reikiamos struktūros plazmidę turintys transformantai atrinkti atlikus plazmidinės DNR restrikcinę analizę ir nustatius modifikuojamo regiono nukleotidų seką.

2.7.3. pHH Δ BE konstravimas

Konstravimo schema pavaizduota 2.1 pav.. p Δ 324GH₆ sukirpta R.BspTI ir R.Eco91I, lipnūs galai užbukinti inkubuojant su T4 DNR polimeraze ir dNTP, po to reakcijos mišinys praskiestas iki 0,005 μ g/ μ l DNR koncentracijos T4 DNR ligazės buferiu ir didysis plazmidės fragmentas reciklizuojamas inkubuojant su T4 DNR ligaze. Po reakcijos šiuo mišiniu transformuotas *E.coli* ER2267 kamienas. Taip gauta plazmidė, turinti 36 nt skaitymo rėmelio nekeičiančią deleciją, apimančią atpažinimo Kilpą-2. Reikiamos struktūros plazmidę turintys transformantai atrinkti atlikus plazmidinės DNR restrikcinę analizę (pHH Δ BE išnyksta vienas R.SsiI taikiny) ir nustatius modifikuojamo regiono nukleotidų seką. pHH Δ BE koduoja neaktyvią metiltransferazę, neturinčią atpažinimo Kilpos-2.



2.1 paveikslas. pHH Δ BE ir mutantinių Δ L2-MTazių bibliotekos konstravimas. Pilka rodyklė – *hhaIM* genas; raudonai pažymėtos geno dalys,

koduojančios Kilpa-1, mėlynai – koduojančios Kilpa-2; nurodyti konstravime naudoti REazių taikiniai.

2.7.4. pHhaI- Δ L2 bibliotekos konstravimas

Konstravimo schema pavaizduota **2.1 pav.** pHH Δ BE linearizuota kerpant R.BspTI ir naudota kaip matrica mutageniškam PGR su pradmenimis HH-L2- Δ 5 ir V2. R.BspTI sukirpta pHH Δ BE neturi komplementarių mutuojamai sričiai sekų, o tai sumažina tikimybę, kad po PGR gautame banke vyraus kurios nors sekos. pHH Δ BE taip pat leido išvengti WT *hhaIM* geno naudojimo mutagenezės metu ir tikėtino bibliotekos užteršimo laukinio tipo genu. PGR reakcijoje padaugintas 0,3 kbp fragmentas, apimantis *hhaIM* geno dalį nuo atpažinimo Kilpos-2 iki geno galo. Gautas PGR fragmentas deproteinizuotas fenolio-chloroformo mišiniu ir chloroformu, DNR išsodinta etanoliu. Fragmentas su mutuojama Kilpa-2 įsiūtas į pHH Δ BE vektorių per R.HindIII ir R.BspTI taikinius. Ligavimo mišinys deproteinizuotas chloroformu, DNR išsodinta etanoliu, ištirpinta vandenyje ir ~1 μ g (12 μ l) DNR elektroporuota į 150 μ l *E.coli* ER 2566 *lacI^q* ląstelių. 50 μ l 10^2 ir 10^3 kartų atskiestų ląstelių suspensijos išsėta ant šešių lėkštelių su selektyvia agarizuota M9 terpe transformantų skaičiaus įvertinimui. Likusi kultūra užsėta į skystą selektyvią M9 terpę, ląstelės augintos 37°C per naktį ir išskirta suminė banko DNR. Šios auginimo sąlygos buvo pasirinktos todėl, kad taip auginat ląsteles L2Bsp tik labai nežymiai apsaugo ją koduojančią plazmidę nuo metilimumi jautrių REazių. Tai suteikė galimybių ieškoti efektyvesnių negu L2Bsp pakeisto specifiškumo MTazių.

Atlikus banko DNR restrikcinę analizę (R.Eco91I ir R.VspI) nustatyta, kad gautoje bibliotekoje vyrauja teisingos struktūros plazmidės, nustatčius mutuoto rajono nukleotidų seką įsitikinta, kad mutuojamose pozicijose nevyrauja jokia seka.

2.7.5. HhaI- Δ L2 bibliotekos selekcija

4 μ g suminės DNR 60 μ l reakcijos tūryje karpyta R.Bsh1236I (CGCG) ir R.Hin6I (GCGC) (po 15 akt. vnt.) mišiniu 4 val., po to reakcijos mišinys

deproteinizuotas ekstrahuojant chloroformu ir ~0,5 µg sukirtos DNR elektroporuota į 40 µl *E.coli* ER 2566 *lacI^f* ląstelių. Ląstelės išsėtos ant penkių lėkštelių selektyvaus M9 agarą ir augintos per naktį 37°C. Iš 9 transformantų išskirta plazmidinė DNR karpyta R.Bsh1236I ir nustatyta, kad tik 4 klonai koduoja aktyvias MTazes. Todėl likusios kolonijos nuplautos nuo lėkštelių, išskirta suminė DNR ir pakartota biocheminė selekcija. R.Bsh1236I ir R.Hin6I sukarpyta bibliotekos DNR cheminiu metodu transformuota į ER2267 kamieną ir auginta ant M9 agarą lėkštelių 37°C per naktį. Iš atsitiktinai pasirinktų 28 klonų išskirta plazmidinė DNR, jos koduojamų MTazių aktyvumas tikrintas karpant R.Bsh1236I ir nustatyta mutuo to fragmento nukleotidų seka.

2.8. Baltymų metodai

2.8.1. Denatūruojanti baltymų elektroforezė

Prieš elektroforezę į mėginius pridėta ¼ tūrio 2,5^x pavyzdžio buferio ir mėginiai kaitinti 5 min. 99°C temperatūroje. Baltymai frakcionuoti pagal Laemli metodiką (Ausubel, 1995), naudojant 4% koncentruojantį ir 10% frakcionuojantį PAA gelius su NDS (poliakrilamido : bisakrilamido santykis 37,5:1). Elektroforezė vykdyta „MiniProtean II“ (*Bio-Rad*) baltymų elektroforezės aparate 65×85×0,75 mm matmenų gelyje, esant 5 mA/cm srovės tankiui. Po elektroforezės baltymai geliuose dažyti Kumasi brilantinio mėlio tirpalu (50% etanolis, 10% CH₃COOH, 0,05 % Kumasi brilantinis mėlis R-250).

2.8.2. MTazių gryninimas giningumo chromatografijos būdu

Šiuo metodu gryninti C-galinį His₆ fragmentą turintys baltymai. Biomasė, gauta iš 1 l kultūros, resuspenduota 20 ml buferio A (20 mM Na-PO₄ pH 7,4, 1 M NaCl) su 0,5 mM PMSF ir ardyta ultragarsu 3 kartus po 10 min. pulsiniu režimu (1 s impulsas ir 1 s pauzė), esant ~30 W galingumui ir < 10°C temperatūrai (dezintegratorius *Vibra cell™* (*Sonics & Materials Inc.*)). Ląstelių nuolaužos pašalintos centrifuguojant 20000×g 30 min. 0°C temperatūroje.

Centrifugatas filtruotas per PVDF filtrą (porų skersmuo 0,2 μm) ir frakcionuotas 5 ml Ni²⁺ chelatuojančioje kolonėlėje HiTrap Chelating (*Pharmacia*). Baltymas eliuotas linijiniu buferio B (buferis A su 300 mM imidazolu) gradientu nuo 1% iki 100%, gradiento tūris 80 ml. Apjungus frakcijas su tiksliniu baltymu, imidazolas pašalintas dializuojant 7°C temperatūroje 2 kartus prieš 50 tūrių 20 mM Na-PO₄ pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA 2 mM 2–merkaptioetanolio. Vėliau dializė nuo kofaktoriaus AdoMet vykdyta 19°C temperatūroje dar 4 paras iki 8·10¹¹-4·10¹² praskiedimo, keičiant dializės buferį 2 kartus per parą. Gauti baltymai sukonzentruoti Ultrafree-15 ultrafiltraciniuose mėgintuvėliuose (*Pierce*; molekulinės masės *cut off* 10 kDa), po to per naktį dializuoti prieš tokį patį buferį su 50% glicerolio ir saugoti -20°C.

2.8.3. Natyvų C-galą turinčios M.HhaI gryninimas

Sustabdytos srovės kinetiniams eksperimentams naudoti nemodifikuoti WT M.HhaI ir W41F/I86W baltymai, turintys laukinio tipo C-galinį hidrofobinį tetrapeptidą. Baltymai gryninti pagal anksčiau aprašytą gryninimo schemą (Kumar ir kt., 1992): iš pradžių MTazė selektyviai išsodinta mažos joninės jėgos buferyje, po to ištirpinta padidinus joninę jėgą ir gryninta jonų mainų chromatografijos būdu.

M.HhaI gryninimas keičiant tirpalo joninę jėgą

15 g šlapios biomasės suspenduota ardymo buferyje (10 mM Hepes pH 7,2, 5 mM EDTA, 10%glicerolio, 2 mM 2-merkaptioetanolio ir 1 mM PMSF) ir ardyta ultragarsu 3 kartus po 10 min. pulsiniu režimu (1 s impulsas ir 1 s pauzė), esant ~30 W galingumui ir <10°C temperatūrai (dezintegratorius *Vibra cell™* (*Sonics & Materials Inc.*)). Po ardymo mišinys centrifuguotas 20000×g 30 min. 0°C (tolimesni centrifugavimai vykdyti taip pat). Mažos joninės jėgos buferyje M.HhaI netirpi ir lieka nuosėdose su ląstelės nuolaužomis, o dauguma tirpių ląstelės baltymų pašalinami su supernatantu. M.HhaI ištirpinta nuosėdas resuspenduojant didesnės joninės jėgos Fosfatiniame buferyje (10 mM K-PO₄ pH 7,4, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA,

2 mM 2-merkaptoetanolio ir 10% glicerolio), ląstelių nuolaužos ir netirpūs baltymai atskirti centrifuguojant. Nukleorūgštys iš centrifugato pašalintos lėtai pridedant $\frac{1}{3}$ tūrio 10 mg/ml protamino sulfato (*Sigma-Aldrich*) tirpalo tame pačiame buferyje. Tirpalas maišytas kambario temperatūroje 30 min., po to nuosėdos pašalintos centrifuguojant. Centrifugatas su M.HhaI dializuotas nuo AdoMet prieš Fosfatinį buferį su 100 mM NaCl 19°C temperatūroje ~4 paras iki $8 \cdot 10^{11}$ - $4 \cdot 10^{12}$ praskiedimo, keičiant dializės buferį 2 kartus per parą. Paskutinės dializės metu į dializės buferį pridėta 10% glicerolio.

Jonų mainų chromatografija

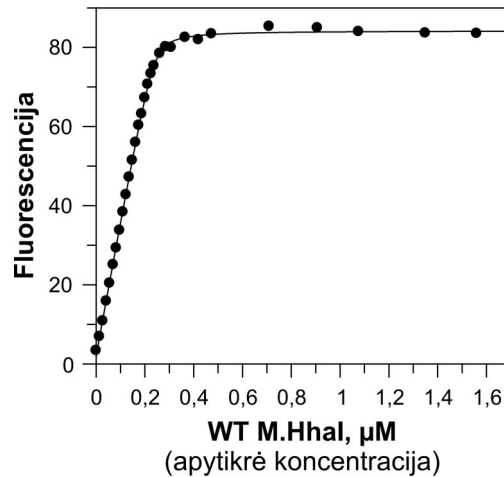
Nudializuotas nuo AdoMet M.HhaI preparatas užneštas ant 34 ml Sepharose Q kolonėlės, nuosekliai sujungtos su 34 ml Sepharose SP kolonėle. Ant Sepharose Q kolonėlės sulaikoma dauguma priemaišinių baltymų, tuo tarpu M.HhaI nėra adsorbuojama, todėl iš karto patenka ant Sepharose SP kolonėlės. Kolonėlės plautos 170 ml buferio A, tada Sepharose Q kolonėlė atjungta, o baltymai frakcionuoti ant Sepharose SP sorbento keičiant eliuento joninę jėgą (0,1-0,5 M NaCl linijinis gradientas Fosfatiname buferyje, gradiento tūris 300 ml). Frakcijos su tiksliniu baltymu atrinktos pagal denatūruojančios elektroforezės rezultatus, apjungtos ir baltymai koncentruoti Ultrafree-15 ultrafiltraciniose mėgintuvėliuose (*Pierce*; molekulinės masės *cut off* 10 kDa), dializuoti per naktį prieš koncentravimo buferį (10 mM K-PO₄ pH 7,4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% 2-merkaptoetanolio, 50% glicerolio) ir toliau saugoti -20°C temperatūroje. Gautų MTazių preparatų grynumas >95% (įvertintas išfrakcionavus baltymų preparatus denatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje).

2.8.4. Baltymų koncentracijos nustatymas

Pakeisto specifiškumo mutantinių MTazių koncentracija nustatyta Bredfordo metodu, naudojant komercinį Bredfordo reagentą (*Roth*) pagal gamintojo rekomendacijas, standartu naudojant BSA.

WT M.HhaI, HhaΔGH₆ ir jos taškinių mutantų koncentracija nustatyta atliekant aktyvaus centro titravimą naudojant fluorescuojantį dvigrandį

oligonukleotidą GPGC/GMGC. Žinoma, kad su tokiu substratu WT M.HhaI rišasi labai stipriai ($K_D \sim 1$ nM), o fluorescuojanti bazė 2-aminopurinas išsukamas iš DNR į fermento aktyvų centrą ir dėl to ~ 50 kartų išauga jo fluorescencija (Holz ir kt., 1998).



2.2 paveikslas. WT M.HhaI koncentracijos nustatymas, titruojant aktyvų centrą. Ant abscisių ašies – apytikrė M.HhaI koncentracija, gauta Bredfordo metodu.

Fluorescencija matuota Perkin-Elmer LS50B liuminescenciniu spektrometru su ksenono lempa 4×4 cm kvarcinėje kiuvetėje 25°C temperatūroje. Žadinimo $\lambda^{\text{ex}} = 320$ nm, $\lambda^{\text{em}} = 370$ nm, spektrinis plotis atitinkamai 2,5 ir 5 nm. Dvigrandis $0,2 \mu\text{M}$ GPGC/GMGC oligonukleotidas Reakcijos buferyje titruotas tokiu pačiu tirpalu su $\sim 2 \mu\text{M}$ tiriamos MTazės (Bredfordo metodu nustatyta apytikrė koncentracija), kol fluorescencijos lygis nebekito. Fluorescencijos priklausomybė nuo pridėtos MTazės koncentracijos aproksimuota lygtimi (1) naudojant programą GraFit 5.0.6 (*Erithacus Software*). Pagal aproksimuojant nustatytą DNR koncentraciją apskaičiuojama tikroji aktyvios MTazės koncentracija. Titravimo rezultatų pavyzdys pateiktas **2.2 pav.**

$$F = F_{\min} + (p + L + K - \sqrt{(p + L + K)^2 - 4p \cdot L}) \cdot \frac{(F_{\max} - F_{\min})}{2p} + c \cdot L \quad (1)$$

F – išmatuotas fluorescencijos intensyvumas esant MTazės koncentracijai L , F_{\min} ir F_{\max} – eksperimento metu išmatuota minimali ir maksimali fluorescencija, L – pridėtos MTazės koncentracija, p – DNR koncentracija, K – MTazės-DNR komplekso disociacijos konstanta, c - tiesinio nario krypties

koeficientas. Tiesinis narys buvo įvedamas tais atvejais, kai buvo stebėtas papildomas, nuo 2-aminopurino nepriklausantis, fluorescencijos intensyvumo kitimas.

2.8.5. Išgrynintų baltymų molekulinės masės nustatymas

Išskirtų baltymų molekulinės masės išmatuotos HP 1100 serijos vieno kvadrupolio masių spektrometru su elektoišpurškimo jonizatoriumi. Koncentruotas baltymo tirpalas (~30 µl) dializuotas prieš 0,1% acto rūgštį per naktį 8°C temperatūroje. Po to tirpalas centrifuguotas stalinėje centrifugoje maksimaliu greičiu 10 min, supernatantas perpiltas į švarų mėgintuvėlį ir 10 µl tirpalo įnešta į masių spektrometrą. Mėginys eliuotas į elektoišpurškimo jonizatorių 50% izopraponolio ir 1% acto rūgšties tirpalu 30 µl/min. greičiu. Jonizacijos kameros parametrai matavimo metu: kapiliaro įtampa 5000 V, fragmentacijos įtampa 120 V, kvadrupolio temperatūra 350°C, džiovinančių dujų srautas 10 l/min., temperatūra 300°C. Masių spektras matuotas m/z intervale 700-2000, 0,1 tikslumu. Gautas spektras analizuotas programa HP Chemstation (versija A.05.01). Visų tirtų baltymų molekulinė masė paklaidų ribose sutapo su teoriškai apskaičiuota.

2.8.6. AdoMet kiekio išgrynintų baltymų preparatuose nustatymas

Endogeninio AdoMet kiekio nustatymas fermentinio DNR metilinimo būdu

Šiuo metodu tirti WT M.HhaI, M.HhaΔGH₆ ir M.HhaI W41F/I86W baltymai, atpažįstantys ir metilinantys laukinio tipo taikinį GCGC. Norint nustatyti kofaktoriaus kiekį išgrynintų MTazių preparatuose, λ DNR inkubuota su tiriamą MTazę be AdoMet, ir tikrintas DNR apsaugojimas nuo karpymo 5-metilcitozinui jautria REaze Hin6I (GCGC). Reakcijos vykdytos 150 µl Metilinimo buferio I 37°C temperatūroje per naktį. Reakcijos mišinyje buvo 3 µg λ DNR (*dam*⁻, *dcm*⁻) (0,13 µM GCGC taikinių) ir tiriamos MTazės moliniu santykiu 1:1, 1:10, 1:50 ir 1:100. Kontrolinė reakcija atlikta taip pat, tik pridėjus 100 µM AdoMet. Po inkubacijos didelis baltymų kiekis pašalintas inkubuoiant su proteinaze K: į reakcijos mišinį pridėta 1 µl proteinazės K (20 g/ml) ir 3 µl 10% NDS ir mėginiai inkubuoti 55°C temperatūroje 30 min..

Po to reakcijos mišinys ekstrahuotas fenolio-chloroformo mišiniu ir chloroformu, DNR išsodinta etanoliumi, ištirpinta 30 µl dejonizuoto vandens ir karpyta R.Hin6I. AdoMet kiekis baltymo atžvilgiu (molinė dalis) apytikriai įvertinta pagal tai, kiek MTazės reikia pilnam apsaugojimui nuo R.Hin6I pasiekti papildomai nepridėjus AdoMet. Pavyzdžiui, jeigu pilnas apsaugojimas pasiekiamas esant 100× MTazės pertekliui, laikoma, kad baltyme yra 1% AdoMet. Nustatyta, kad WT M.HhaI ir M.HhaΔGH₆ preparatuose buvo < 4 mol % AdoMet, o W41F/I86W preparatuose – << 1 mol % AdoMet.

Tiesioginis AdoMet nustatymas skysčių chromatografijos būdu

Šiuo metodu analizuotos pakeisto specifškumo MTazės ir kontrolinis M.HhaΔGH₆ preparatas. 20 µl baltymo (1,4-2,8 pmol) sumaišyta su 20 µl H₂O ir baltymas denatūruotas pripylus 4 µl 5,5 M HCl. Mišinys centrifuguotas 10 min maksimaliu greičiu stalinėje centrifugoje 4°C temperatūroje. 35 µl centrifugato sumaišyta su 140 µl H₂O ir denatūruotas baltymas iš gauto mišinio pašalintas centrifuguojant per pusiaupralaidžią membraną (molekulinės masės *cut off* 3 kDa; *Pierce*). Gautas tirpalas padalintas į dvi dalis po 55 µl. Į vieną dalį pridėta 10 µl H₂O, į kitą – 5 µl H₂O ir 5 µl 18 µM AdoMet (vidinis standartas). Po 60 µl kiekvieno mėginio frakcionuota HPLC katijonitinėje Nucleosil 100-5SA kolonėlėje (4×150 mm; *Macherey-Nagel*). Atskyrimas vykdytas izokratinėmis sąlygomis, eliuicijos buferis 100 mM TEA-HCOOH pH 4,0, tekėjimo greitis 0,9 ml/min., kolonėlės temperatūra 25°C. Šiomis sąlygomis AdoMet sulaikymo trukmė 6,5 min. AdoMet kiekis baltymo preparate apskaičiuotas pagal AdoMet smailės plotą be pridėto AdoMet ir su pridėtu AdoMet pagal formulę (2).

$$x = \frac{a \cdot S_x}{S_{x+a} - S_x} \quad (2)$$

x – AdoMet koncentracija mėginyje, a – vidinio standarto AdoMet koncentracija, S_x – AdoMet smailės plotas tiriamame mėginyje, S_{x+a} – AdoMet smailės plotas į tiriamą mėginį pridėjus žinomą kiekį vidinio standarto).

Pakeisto specifškumo MTazių preparatuose AdoMet priemaišų neaptikta, o kontroliniame M.HhaΔGH₆ preparate buvo ~4 mol % AdoMet.

2.9. Metiltransferazių specifškumo ir aktyvumo tyrimai

2.9.1. MTazių specifškumo ir aktyvumo tyrimas naudojant restrikcijos endonukleazes

Tiriant mutantinių baltymų specifškumą, pastovus λ DNR kiekis inkubuotas su skirtingais tiriamos MTazės kiekiais. Metilinimo reakcijos (20 μ l) komponentai (išpilstomi 4°C): 300 μ M AdoMet (arba sintetinis kofaktoriaus analogas), 1,2 μ g λ DNR (3,1 μ M GCG taikinių), ir 3,1 μ M – 6 nM MTazės Metilinimo buferyje II. Tokiu būdu reakcijose MTazė ir GCG taikiniai buvo moliniais santykiais: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 ir 1:512. Metilinimas vykdytas 1 val. 37°C, po to MTazė inaktyvuota 15 min. kaitinant 80°C temperatūroje. Reakcijos produktai 2 val. karpyti metilinimui jautriomis REazėmis (3 vnt./reakcijai) (2.3 lentelė), į reakcijos mišinį papildomai pridėjus MgCl₂ iki 6,6 μ M koncentracijos. Po to į reakcijos mišinį pridėta 0,5 μ l 10% NDS ir 0,5 μ l proteinazės K (20 mg/ml), ir baltymai pašalinti inkubuojant 0,5 val. 55°C temperatūroje. Hidrolizės produktai frakcionuoti 0,8% agarozės gelyje ir nustatytas minimalus MTazės : GCG molinis santykis, reikalingas pilnam apsaugojimui pasiekti. Šis santykis atitinka matomų fermento apsukų skaičių per valandą.

2.3 lentelė. 5mC-jautrios REazės Δ L2-MTazių specifškumo tyrimui.

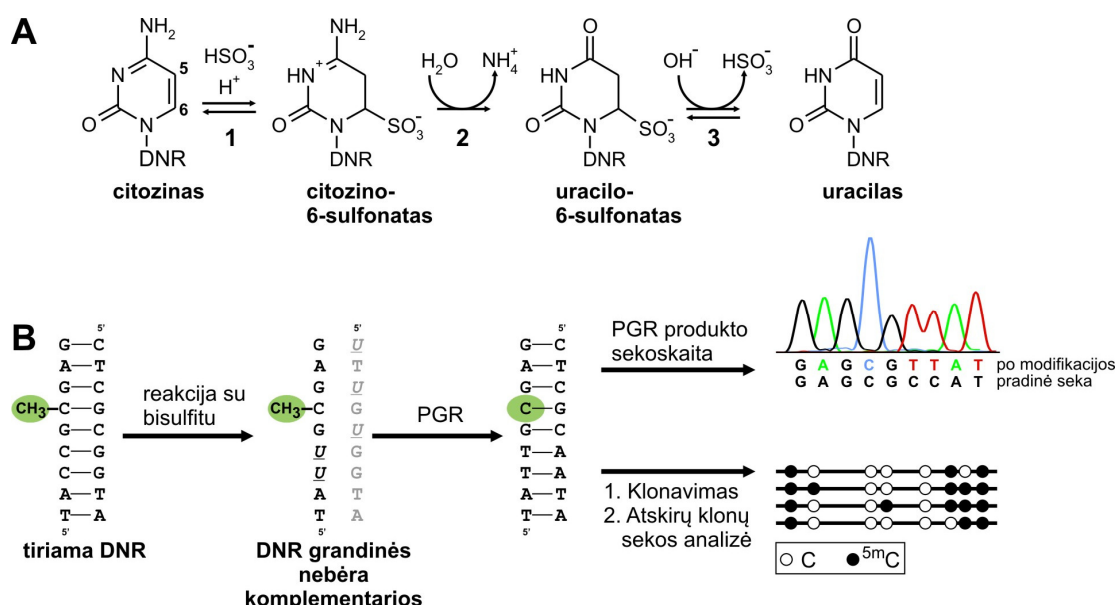
REazė	Taikinys	REazės taikinių skaičius λ DNR	Tikrinamas MTazės taikinys	Potencialių MTazės taikinių skaičius λ DNR
R.Hin6I	GCGC	215	GCGC	215
R.MluI	ACGCGT	7	GCGT	403
R.Bsh1236I	CGCG	157	GCGN	1730
R.BseXI	GCWGC	199	GCW (nekanoninis)	3724

2.9.2. MTazių savitojo aktyvumo nustatymas

DNR metiltransferazės aktyvumo vienetas – tai toks MTazės kiekis, kuris per 1 val. 37°C temperatūroje 50 μ l tūryje pilnai apsaugo 1 μ g λ DNR nuo hidrolizės tokio paties arba persidengiančio specifškumo restrikcijos endonukleaze. Norint nustatyti pakeisto specifškumo MTazių savitąjį aktyvumą 1 μ g λ DNR inkubuota su skirtingais kiekiais tiriamų MTazių 1 val.

37°C Metilinimo buferyje II, esant 100 μ M AdoMet. Toliau viskas atlikta taip, kaip aprašyta **2.9.1 skyriuje**. Nustatant pakeisto specifiškumo MTazių savitąjį aktyvumą, metilinta DNR karpyta R.Bsh1236I (CGCG), kadangi ja galima patikrinti daugiausia GCGN taikinių (žiūr. **2.3 lentelę**). Palyginimui nustatant M.Hha Δ GH₆ (WT) savitąjį aktyvumą, naudota R.Hin6I (GCGC).

2.9.3. 5-metilcitozinų identifikavimas DNR sekoje, naudojant reakciją su bisulfitu



2.3 paveikslas. 5-metilcitozinų identifikavimas DNR sekoje naudojant reakciją su bisulfitu. **A** – citozino reakcija su bisulfitu. Citozino sulfoninimas (1) ir deamininimas (2) vyksta silpnai rūgštiniame terpėje (pH 5,5); pusiausvyrai į dešinę pastumti naudojama didelė natrio bisulfito koncentracija (~5 M). Uracilo sulfonatas desulfoninamas inkubuojant su 0,2 N NaOH (3). **B** – 5mC identifikavimo DNR sekoje metodinė schema. Juodai pavaizduota ta DNR grandinė, kurios pavyzdžiu iliustruojamas 5mC nustatymas. Prieš modifikaciją DNR denatūruojama šarmu, nes bisulfito jonai efektyviai reaguoja tik su viengrandėje DNR esančiais citoziniais. Įvykus reakcijai DNR grandinės nebėra komplementarios, todėl gali būti padaugintos naudojant skirtingas PGR pradmenų poras ir analizuojamos atskirai. Schemoje nekomplementarios bazių poros modifikuotoje DNR pasvirusios ir pabrauktos. Citozinai, likę DNR po modifikacijos atitinka 5-metilcitozinius nemodifikuotoje DNR grandinėje.

5mC identifikavimas DNR sekoje paremtas skirtingu citozino ir 5-metilcitozino reaktyvumu su bisulfito jonais (Frommer ir kt., 1992; Clark ir kt., 2006). Pirmajame etape, inkubuojant DNR silpnai rūgštiniame bisulfito

tirpale, nemetilinti citozinai selektyviai sulfoninami ir paverčiami uracilais (2.3 pav. A), o 5-metilcitozinai su bisulfitu nereaguoja. Antrajame etape (2.3 pav. B) modifikuotas DNR fragmentas padauginamas PGR būdu, naudojant modifikuotai DNR komplementarius pradmenis ir įprastiniu būdu nustatoma PGR produkto nukleotidų seka. Po modifikacijos citozinai sekoje matomi tik ten, kur buvo 5-metilcitozinas, o nemetilinti citozinai virsta timiniais. Jeigu PGR produktas klonuojamas į *E.coli* vektorių ir analizuojamos atskirų klonų sekos, galima kiekybiškai charakterizuoti kiekvienos pozicijos metilinimą. Pažymėtina, kad tokiu atveju kiekvienas klonas yra kilęs iš atskiros DNR molekulės, taigi analizuojamas 5mC pasiskirstymas individualiose DNR molekulėse.

DNR mėginio paruošimas

Norint užtikrinti maksimalią modifikuojamos DNR denatūraciją, prieš reakciją analizuojama plazmidinė DNR sukarchyta R.Alw44I arba R.PagI. Sukirpta DNR du kartus deproteinizuota ekstrahuojant lygiu tūriu chloroformo, išsodinta etanoliu ir ištirpinta dejonizuotame vandenyje. L2Bsp specifiškumo *in vivo* analizei buvo naudota plazmidinė DNR, išskirta iš *E.coli* ER1727 ląstelių, produkuojančių didelį kiekį tiriamos MTazės. Kontrolinei reakcijai naudota analogiškai paruošta plazmidė, nekoduojanti aktyvios MTazės.

MTazių specifiškumo *in vitro* tyrimui 4,9 µg pBR322 DNR metilinta 775 nM arba 48 nM tiriamos MTazės (MTazė : GCG molinis santykis atitinkamai 1:4 ir 1:64) 120 µl Metilinimo buferio II, esant 300 µM AdoMet 1 val. 37°C temperatūroje. MTazė iš reakcijos mišinio pašalinta 1 val. inkubuojant su 0,2 mg/ml proteinazės K, esant 0,25% NDS. Po to reakcijos mišinys ekstrahuotas fenolio-chloroformo-izoamilo alkoholio mišiniu, chloroformu ir DNR išsodinta etanoliu, ištirpinta dejonizuotame vandenyje ir naudota reakcijai su bisulfitu.

Bisulfito tirpalo paruošimas

Bisulfito tirpalas buvo ruošiamas prieš pat naudojimą 7,74 g natrio metabisulfito tirpinant 7,5 ml vandens ir 1,5 ml 2 N NaOH. Druska tirpinta

intensyviai maišant magnetine maišykle 50-60°C vandens vonioje apie 10 minučių. Po to pripilta 1,5 ml 1 M hidrochinono tirpalo (0,22 g hidrocinono tirpinama 2 ml vandens šildant 50-60°C temperatūroje prieš pat naudojimą) ir inkubuota intensyviai maišant, kol druska pilnai ištirpo. pH iki 5,0 koreguotas pridedant 10 N NaOH.

DNR reakcija su bisulfitu

~0,5-0,75 µg paruoštos DNR denatūruota 0,3 M NaOH 37°C temperatūroje 30 min. Tirpalo tūris šioje stadijoje 20 µl. Po to į kiekvieną mėginį pridėta 500 µl šviežiai paruošto bisulfito tirpalo, gerai išmaišyta ir inkubuota 55°C temperatūroje 5 valandas, kiekvieną valandą įterpant 3 min trukmės denatūracijos žingsnį (95°C).

Po inkubacijos DNR mėginiams leista atvėsti iki kambario temperatūros. Nesureagavęs bisulfitas pašalintas panaudojant DNR valymo rinkinio *DNA Extraction Kit (Fermentas)* komponentus: į atvėsusį reakcijos mišinį pridėta 6 µl stiklo miltelių suspensijos, sumaišyta ir inkubuota kambario temperatūroje 10 min. Adsorbuota DNR praplauta tris kartus po 300 µl plovimo tirpalo, desorbuota 2×50 µl vandens (pirmą kartą užpylus ant stiklų vandens sumaišyta ir inkubuota 10 min kambario temperatūroje). Į 100 µl gauto tirpalo pripilta 11 µl 2 N NaOH (galutinė koncentracija 0,2 N) ir inkubuojant 10 min kambario temperatūroje įvykdytas desulfoninimas. Po to į reakcijos mišinį pridėta 55 µl 7,5 M amonio acetato (pH 7,0) ir 420 µl etanolio. Tirpalas užšaldytas skystame azote ir DNR išsodinta centrifuguojant 20800×g, 10 min kambario temperatūroje. Išsodinta DNR praplauta 200 µl šalto 75% etanolio, džiovinta 10 min 37°C ir tirpinta 50 µl vandens.

Bisulfitu modifikuotos DNR padauginimas ir sekos nustatymas

Bisulfitu modifikuotos DNR padauginimui naudoti modifikuotai DNR komplementarūs pradmenys (**2.1 lentelė**) ir *Fermentas* produktai, skirti PGR reakcijai. Reakcijos mišinio sudėtis (50 µl): 1^x reakcijos buferis su amonio sulfatu, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 µM modifikuotai DNR komplementarių pradmenų, 2,5 vnt. rekombinantinės *Taq* DNR polimerazės,

2,5 µl bisulfitu modifikuotos matricinės DNR. PGR temperatūrinis režimas: 94°C – 3 min.; 25× 94°C – 1 min., 48°C – 1 min., 72°C – 1 min.; 72°C – 5 min.

Pasibaigus PGR, į reakcijos mišinį pridėta papildomai dNTP iki 0,1 mM ir 2,5 vnt. T4 DNR polimerazės ir mėginiai inkubuoti 20 min. 11°C. Po to pagrindinis (tikslinis) PGR produktas išgrynintas atlikus elektroforezę 1,2% agaroziniame gelyje ir naudojant T4 DNR ligazę įsiūtas į pUC19/R.SmaI. Ligavimo mišiniu transformuotos *E.coli* ER2267 ląstelės išsėtos ant selektyvios agarizuotos LB terpės. Transformantų, turinčių plazmidę su įklonuotu fragmentu identifikavimas atliktas baltų-mėlynų kolonijų atrankos metodu (Sambrook ir Russel, 2001): sėjant transformuotas ląsteles į lėkštelės su agarizuota terpe paviršių buvo įtrinama 40 µl X-Gal (20 mg/ml tirpalas formamide) ir 25 µl 100 mM IPTG.

Iš atsitiktinai pasirinktų 16-20 baltų kolonijų buvo išskirta plazmidinė DNR ir nustatyta bisulfitu įklonuoto fragmento nukleotidų seka, naudojant pradmenis M13/pUC rev (-46), 24-mer ir/arba M13/pUC dir (-46), 22-mer. Gautų rezultatų analizė atlikta programa BiQ Analyzer v0.91 beta (Bock ir kt., 2005). L2Bsp specifiškumo *in vivo* charakterizavimui analizuoti visi šeši **2.1 lentelėje** nurodyti fragmentai, apimantys 1577 nt ilgio DNR seką, turinčią 134 GCN sekas. Tiriant mutantinių MTazių specifiškumą *in vitro*, analizuotas tik vienas 599 nt ilgio fragmentas, amplifikuotas naudojant NG-VP1 ir NG-VA3 pradmenis.

Tiesioginiam PGR produkto sekos nustatymui 8 µl PGR mišinio (24 µl reakcijos tūryje) inkubuota su 1 vnt. krevečių šarminės fosfatazės ir 0,2 vnt. egzokleazės III 1 val. 37°C temperatūroje. Fermentai inaktyvuoti kaitinant 15 min. 72°C. Tokiu būdu iš PGR mišinio pašalinti likę dNTP ir pradmenys, o gauto PGR produkto seka nustatyta naudojant NG-VP1 pradmenį Biotechnologijos instituto DNR Sekvenavimo Centre. Metilinti citozinai DNR sekoje buvo identifikuoti analizuojant gautas elektroforeogramas ir kiekviena pozicija buvo kokybiškai apibūdinta kaip nemetilinta, dalinai metilinta arba pilnai metilinta.

2.10. Enzimologiniai tyrimo metodai

2.10.1. Giminingumo AdoMet ir AdoHcy tyrimas

Mutantinių MTazių giminingumas AdoMet ir AdoHcy buvo tirtas matuojant kofaktoriaus surišimo kišenėje esančio Trp fluorescencijos gesinimą prisijungiant kofaktoriui (Vilkaitis ir kt., 2000). 1 μM tiriamos MTazės tirpalas Reakcijos buferyje buvo titruojamas tokiu pačiu tirpalu, papildomai turinčiu 50-2500 μM AdoMet arba 50-200 μM AdoHcy. Fluorescencija matuota 25°C temperatūroje 4×4 cm kvarcinėje kiuvetėje Perkin-Elmer LS50B liuminescenciniu spektrometru su ksenono lempa. Žadinimui naudota 295 nm bangoilgio šviesa (spektrinis plotis 2,5 nm), emisijos bangoilgis 350 nm (5 nm). Kiekviename titravimo taške fluorescencijos signalas stebėtas 60 s registruojant jį kas 2 s ir skaičiavimams naudotas šių duomenų vidurkis. MTazės-kofaktoriaus komplekso disociacijos konstanta apskaičiuota aproksimuojant fluorescencijos intensyvumo priklausomybę nuo kofaktoriaus koncentracijos pagal grįžtamą vieno ligando surišimo mechanizmą (3). Matavimai kartoti 2-3 kartus, duomenų aproksimacija atlikta programa Dynafit (versija 3.28.059) (Kuzmic, 1996).



M – MTazė, K – kofaktorius, M·K MTazės ir kofaktoriaus kompleksas.

2.10.2. DNR radioaktyvumo matavimas

Kinetiniai DNR MTazių tyrimai buvo atliekami naudojant AdoMet su tričiu žymėta metilgrupe ($[\text{metil-}^3\text{H}]\text{AdoMet}$). Metilinta DNR nuo nesureagavusio $[\text{metil-}^3\text{H}]\text{AdoMet}$ buvo atskiriama naudojant Whatman DE-81 popierinius filtriukus. Whatman DE-81 popierius – silpnai bazinis anijonitas, pagamintas iš DEAE (diethylaminoethyl-) celiuliozės, todėl prie jo prikimba neigiamai įkrauta DNR, o nesureagavęs $[\text{metil-}^3\text{H}]\text{AdoMet}$ nuplaunamas buferiu

Ant 2,3 cm skersmens filtriuko buvo užlašinama 20-120 μl sustabdytos reakcijos mišinio. Paprastai mėginys iš vieno reakcijos mišinio buvo dalijamas pusiau ir užlašinamas ant dviejų filtriukų. Norint mėginį sukcentruoti, ant

vieno filtriuko per kelis kartus buvo užnešta iki 300 µl reakcijos mišinio. Mišiniui susigėrus, filtriukai plauti keturis kartus po 7-10 min plovimo tirpalu. Atliekant reakcijas su poli[dG-dC]·poli[dG-dC], plovimui naudotas 0,2 M Na₂HPO₄, atliekant reakcijas su sintetiniais DNR dupleksais – 0,05 M Na-PO₄ pH~7,4. Po to filtriukai 2 kartus plauti vandeniu ir 1 kartą acetonu. Ištraukus iš acetono, filtriukai džiovinti po kaitrine lempa ir sudėti į kiuvetes su 3 ml scinciliacinio skysčio Rotiszint® eco (*Roth*). Į DNR įjungto tričio radioaktyvumas matuotas 0,5-5 min Beckman LS 1801 scintiliaciniu spektrometru. Lygiagrečiai analizuojamai reakcijai visuomet buvo atliekama kontrolinė reakcija su inaktyvuota MTaze (į reakcijos mišinį pradžioje pridedamas HCl, o tik po to baltymas) ir tokia pačia kaip tiriamoje reakcijoje [*metil*-³H]AdoMet koncentracija. Šioje reakcijoje išmatuotos prie filtriukų prikibusio radioaktyvumo reikšmės buvo atimtos iš tiriamoje reakcijoje išmatuotų reikšmių, panaikinant nuo metiltransferazinio aktyvumo nepriklausantį foną, atsirandantį dėl nepilnai nuo filtriuko nuplauto AdoMet arba AdoMet cheminės reakcijos su DNR. Kadangi filtriukai gesina ³H radioaktyvumą, išmatuotos radioaktyvumo reikšmės koreguotos padauginant iš 1,6 – anksčiau laboratorijoje nustatyto daugiklio (Merkienė ir Klimašauskas, 2005).

2.10.3. MTazių charakterizavimas stacionarios kinetikos sąlygomis

Metilinimo reakcijos vykdytos Metilinimo buferyje I 37°C temperatūroje, naudojant poli[dG-dC]·poli[dG-dC] ir [*metil*-³H]AdoMet. Reakcijos sąlygos parinktos taip, kad sureaguotų ne daugiau negu 15% DNR ir ne daugiau negu 10% [*metil*-³H]AdoMet.

Matuojant ΔL2-MTazių K_M^{AdoMet} reakcijos mišinyje buvo 4 nM MTazė, 1,5 µM poli[dG-dC]·poli[dG-dC] (dvigrandžių GCGC taikinių koncentracija), o [*metil*-³H]AdoMet (0,5 Ci/mmol) koncentracija varijuota nuo 0,1 iki 50 µM. Po 10 min. tiriant ΔL2-14 MTazę ir 25 min. tiriant L2Bsp, ΔL2-6 ir ΔL2-9 MTazes reakcijos stabdytos pridedant ¹/₁₀ tūrio 5,5 N HCl (iki 0,5 N) ir matuotas į DNR įjungtos radioaktyvios žymės kiekis kaip aprašyta

2.10.2 skyriuje. Matuojant Hha Δ GH₆ (WT) K_M^{AdoMet} reakcijos mišinyje buvo 50 pM MTazė, 50 nM poli[dG-dC]·poli[dG-dC], o [metil-³H]AdoMet (15 Ci/mmol) koncentracija varijuota nuo 2,5 iki 240 nM. Reakcija vykdyta 10 min. ir stabdyta 0,5 N HCl.

Matuojant K_M^{DNR} reakcijos mišinyje buvo pastovi MTazės ir [metil-³H]AdoMet koncentracija, o varijuota DNR koncentracija. Hha Δ GH₆ (WT) atveju naudota 10 pM MTazė, 100 nM [metil-³H]AdoMet (70 Ci/mmol) ir reakcija vykdyta 10 min.; L2Bsp atveju atveju naudota 1 nM MTazė, 10 μ M [metil-³H]AdoMet (0,5 Ci/mmol) ir reakcija vykdyta 40 min.; Δ L2-MTazių atveju naudotos 25-50 pM MTazės ir 500-750 nM [metil-³H]AdoMet, o reakcijos vykdytos 30-60 min..

Reakcijos kartotos 3-5 kartus, gautų rezultatų aproksimacija į Michaelis-Menten mechanizmą atlikta programa Dynafit (versija 3.28.059) (Kuzmic, 1996) ir nustatytos k_{cat} bei K_m reikšmės.

2.10.4. Cheminės reakcijos greičio nustatymas ikistacionariomis sąlygomis

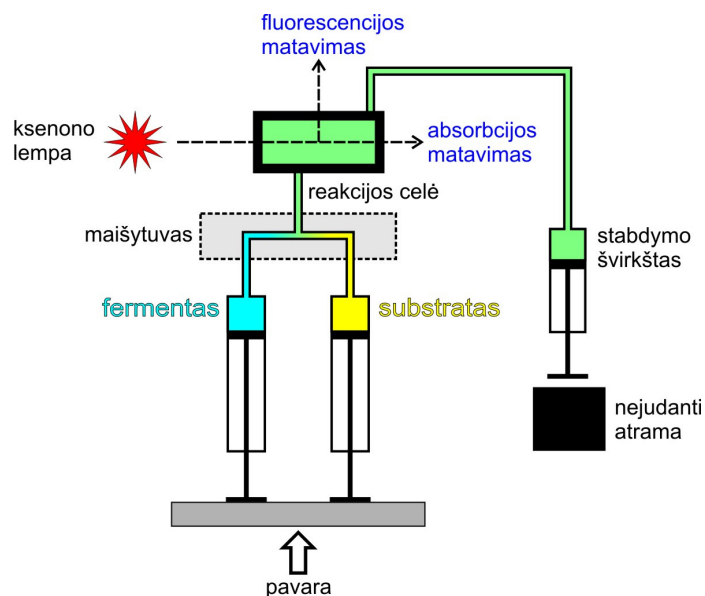
Vienos apskotos reakcijos vykdytos Metilinimo buferyje I 25°C temperatūroje greito stabdymo aparate RQF-3 (*KinTek Corp.*). 1 μ M W41F/I86W ir 0,5 μ M dvigrandžio oligonukleotido GCGC/GMGC tirpalas greitai sumaišytas su 30 μ M [metil-³H]AdoMet (1,62 Ci/mmol) ir po 0,1-300 s reakcija stabdyta 0,7 N HCl. 1,62 Ci/mmol specifinio aktyvumo [metil-³H]AdoMet buvo gautas sumaišius 16,1 Ci/mmol specifinio aktyvumo [metil-³H]AdoMet ir 5 mM neradioaktyvų AdoMet tūrių santykiu 9:1. WT M.HhaI reakcijai naudota 200 nM MTazės, 100 nM GCGC/GMGC ir 2,5 μ M [metil-³H]AdoMet (16,1 Ci/mmol). Įjungtos į DNR žymės kiekis matuotas, kaip aprašyta **2.10.2 skyriuje**. Gauti duomenys aprašyti vienos eksponentės lygtimi naudojant programą GraFit 5.0.6 (*Erithacus Software*).

2.10.5. Pradinio susidarymo produktų šuolio tyrimas

Reakcijos mišinys Metilinimo buferyje I, turintis 4 nM Δ L2-14 arba WT M.HhaI, polidG-dC]·poly[dG-dC] DNR (500 M dvigrandžių GCGC taikinių)

ir 100 μM [*metil*- ^3H]AdoMet (0,5 Ci/mmol) inkubuotas 37°C temperatūroje. Praėjus 0,5-10 min. nuo reakcijos pradžios buvo imami mėginiai, kuriuose reakcija stabdyta pridodant HCl iki 0,5 N. Įjungtos į DNR žymės kiekis matuotas, kaip aprašyta 2.10.2 skyriuje.

2.10.6. Reakcijos eigos matavimas realiu laiku, naudojant sustabdytos tėkmės aparatūrą



2.4 paveikslas. Sustabdytos tėkmės aparatūros principinė schema. Reaguojančių medžiagų tirpalais užpildomi du švirkštai. Pneumatinė pavara dideliu greičiu stumia šių švirkštų stūmoklius, reagentai susimaišo maišytuve ir patenka į matavimo celę. Stūmimas sustoja, kai stabdymo švirkšto stūmoklis atsiremia į nejudančią atramą, tuomet pradedamas matavimas. Reakciją galima pradėti stebėti praėjus 1-2 ms po reagentų sumaišymo, kadangi per tokį laiką tirpalas iš maišytuvo patenka į matavimo celę.

Sustabdytos tėkmės aparatūros principinė schema pateikta 2.4 pav.. Tyrimai atlikti naudojant *Applied Photophysics* sustabdytos tėkmės aparatūrą SX.18MV su ksenono lempa ir dvigubos detekcijos priedu, leidžiančiu vienu metu registruoti absorbcijos ir fluorescencijos signalus. Reakcijos celės tūris 20 μl , vienos reakcijos metu buvo sunaudojama po $\sim 60 \mu\text{l}$ abiejų maišomų tirpalų. Žadinančios šviesos bangailgis 280 nm nustatytas monochromatoriumi (plyšio plotis 1 mm, spektrinis plotis 4,65 nm). Triptofano fluorescencija matuota naudojant 335 nm (*cut-off*) emisijos filtrą. Dauguma matavimų atlikta naudojant 10 mm optinį kelią. Matavimų serijose, kuriose buvo varijuota

kofaktoriaus koncentracija, optinis kelias buvo 2 mm. Pastaruoju atveju fluorescencijos kreivės buvo koreguotos pagal formulę (4), siekiant kompensuoti didelės mėginio absorbcijos sukeltą vidinio filtro efektą.

$$F_0 = F_{stebima} \cdot 10^{\frac{A_{280}}{2}} \quad (4)$$

$F_{stebima}$ ir F_0 – atitinkamai, stebimas ir koreguotas fluorescencijos intensyvumas, A_{280} – išmatuota mėginio absorbcija.

Reakcijos vykdytos Reakcijos buferyje 25°C temperatūroje. Reakcijos mišinyje buvo 3 μM MTazės, 2,5 μM DNR ir 7,5-200 μM AdoMet arba AdoHcy (reagentų maišymo tvarka nurodyta aprašant kiekvieną eksperimentą). Kiekviena reakcija kartota 3-7 kartus ir gautos kreivės suvidurkintos programa KinetAsyst 2 (*Hi-Tech*). Duomenų rinkimo režimai nurodyti 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. Matavimo režimai greito maišymo eksperimentuose.

Duomenų rinkimo trukmė	Slėgio palaikymas sistemoje matavimo metu	Registruojamas signalas
10 s (logaritminė skalė)	taip	absorbcija
20 s (logaritminė skalė)	ne	absorbcija ir fluorescencija
100 s (logaritminė skalė)	ne	absorbcija ir fluorescencija
0,1 s (tiesinė skalė)	taip	absorbcija ir fluorescencija

Duomenų analizė

Pirminė analizė atlikta aproksimuojant gautas kreives dviejų, trijų arba keturių eksponenčių lygtimis, naudojant programą KinetAsyst 2 (*Hi-Tech*).

Kadangi absorbcijos ir fluorescencijos amplitudės stipriai skyrėsi, prieš atliekant globalią analizę išmatuoti signalai buvo normuoti. Išmatuotos absorbcijos vertės visais atvejais buvo dalinamos iš 0,029, t.y. iš ΔA_{280} amplitudės, gautos katalitiškai neaktyvaus mutanto C81S reakcijoje su natyvia DNR (GCGC/GMGC) ir AdoHcy. Išmatuotos fluorescencijos vertės buvo dalinamos iš matomos ΔF amplitudės. Globali absorbcijos ir fluorescencijos kreivių aproksimacija trijų eksponenčių lygtimi buvo atlikta programa Origin 8.1 SS2 (*OriginLab*).

2.11. Kiti metodai

2.11.1. AdoMet gryninimas

AdoHcy priemaišos iš komercinio AdoMet buvo pašalintos atvirkščių fazių chromatografijos būdu. Gryninimo metu didelį teigiamą krūvį turintis AdoMet nesulaikomas kolonėlėje, o dalinai įkrautas AdoHcy lieka prikibęs prie sorbento. 4 g atvirkščios fazės C-18 silikagelio (dalelių dydis 0,040-0,063 mm; *Fluka*) resuspenduota acetonitrile ir supilta į chromatografinę kolonėlę. Sorbentas plautas 25 ml 25 mM amonio formiato pH 3,5. Tuomet ant kolonėlės užnešta 1,5 ml 23 mM vandeninio AdoMet tirpalo ir kolonėlė plauta tuo pačiu buferiu, renkant 1 ml tūrio frakcijas. 2 µl iš kiekvienos frakcijos užlašinti ant fluorescuojančios TLC plokštelės ir identifikuotos UV absorbuojančios (turinčios AdoMet) frakcijos. Keturios daugiausiai AdoMet turinčios frakcijos apjungtos ir sukoncentruotos iki ~1,5 ml nugarinat tirpiklį. AdoMet koncentracija nustatyta matuojant 260 nm šviesos absorbciją ($\epsilon_{260} = 15400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Gautas 20,8 mM AdoMet tirpalas.

Kinetiniams eksperimentams AdoMet buvo grynintas per katijonito Dowex 1 kolonėlę, eliuojant 0,1 mM HCOOH. AdoMet turinčios frakcijos identifikuotos ir sukoncentruotos kaip aprašyta aukščiau.

2.11.2. MTazių reakcija su 5-fluorocitoziną turinčia DNR

5 µM tiriamos MTazės inkubuota su 5 µM GFGC/GFGC-13 DNR ir 200 µM AdoMet 20 µl Metilinimo buferio I kambario temperatūroje per naktį. Po to į reakcijas pridėta 10 µl 2,5^x pavyzdžio buferio, mėginiai pakaitinti 95°C temperatūroje 5 min. ir išfrakcionuoti 10% denatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje.

2.11.3. Plazmidinės DNR žymėjimas GCG taikiniuose

5 µg pUC19 plazmidinės DNR (6,3 µM GCG taikinių) inkubuota Metilinimo buferyje II su 1,55 µM ΔL2-14 ir 300 µM AdoHxGABANH₂ 37°C temperatūroje 1 val. Reakcija sustabdyta ekstrahuojant fenoliu, du kartus fenolio-chloroformo mišiniu (1:1), tris kartus chloroformu, DNR išsodinta

etanoliu ir tirpinta 25 μ l dejonizuoto vandens. 3,6 μ g modifikuotos (su įvestomis reaktyviomis aminogrupėmis) pUC19 DNR inkubuota su 105 mM reaktyvaus dažo (Cy5-NHS, 6-(fluoresceino-5(6)-carboksamido)heksanoinės rūgšties-NHS) 1 val. kambario temperatūroje 50 μ l 150 mM NaHCO₃ pH 9,0. Po to DNR išsodinta pridėjus ¼ tūrio 3 M natrio acetato (pH 7,0) ir lygų tūrį izopropanolio. DNR nuosėdos dar du kartus plautos 75% etanolio, ištirpintos vandenyje ir DNR gryninta naudojant *QIAquick* rinkinį DNR gryninimui (*Qiagen*). ~0,5 μ g DNR karpyta R.BamHI ir R.PagI mišiniu, gauti fragmentai frakcionuoti agaroziniame gelyje ir vizualizuoti gelių dokumentacijos sistema Fuji FLA-5100, naudojant 635 nm lazerį. Prie fragmento prijungtos žymės santykinis kiekis įvertintas densidometriškai programa Multi Gauge (*Fuji*).

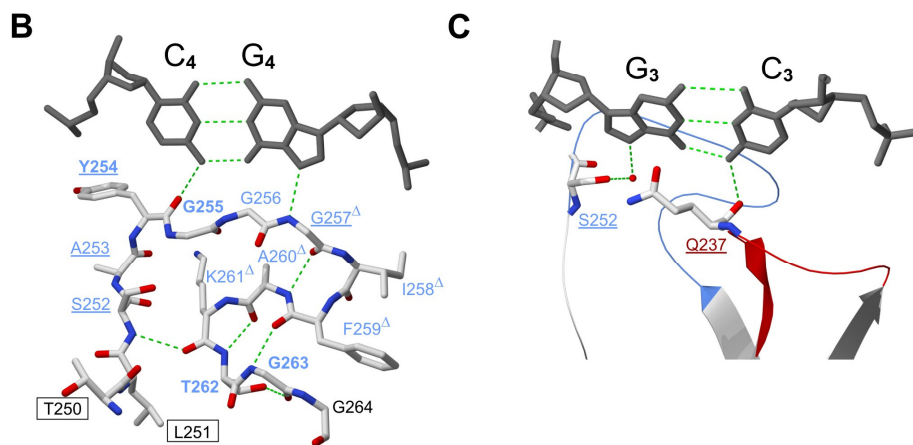
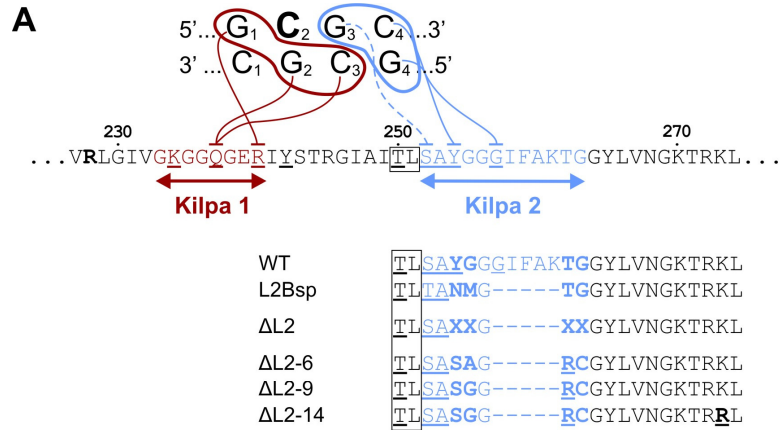
3. REZULTATAI

3.1. Naujo specifiškumo DNR metiltransferazių konstravimas ir charakterizavimas

Šiuo metu žinoma daugiau kaip 200 2-8 bp ilgio sekų, kurias specifiškai atpažįsta ir metilina DNR metiltransferazės (Roberts ir kt., 2010). Tačiau tai – tik maža dalis įmanomų tokio ilgio sekų variantų. Plečiant DNR metiltransferazių panaudojimą biotechnologijoje, atsiras ir naujų, gamtoje kol kas neaptiktų, specifiškumų poreikis. Vienas iš būdų šiai problemai spręsti – nauju specifiškumu pasižyminčių DNR metiltransferazių konstravimas baltymų inžinerijos metodais.

DNR citozino-5 MTazė HhaI atpažįsta taikinį GCGC dviem paviršinėmis baltymo kilpomis (**3.1 pav. A**). Pirmoji (233-240 amr.) kilpa sudaro šešis specifinius kontaktus su keturiomis bazėmis ir apsprendžia taikinio 5'-dalies atpažinimą. Antroji (252-263 amr.) kilpa sudaro tris vandenilines jungtis su atpažįstamomis bazėmis: dvi tiesiogines ir vieną per vandens molekulę, ir yra atsakinga už taikinio 3'-dalies atpažinimą. Su konkrečia baze kontaktuoja tik vienai kilpai priklausančios aminorūgštys, taigi kilpos atpažįsta nepersidengiančias taikinio dalis. Ankstesnių darbų metu (Vilkaitis ir Klimašauskas, 1998) pastebėta, kad antrąją M.HhaI atpažinimo kilpą pakeitus numanomais analogiškais elementais iš kitų MTazių, galima gauti funkciškai aktyvų hibridinį fermentą. Viena iš tokių MTazių, kurioje M.HhaI antroji atpažinimo kilpa pakeista trumpu fragmentu iš M.Bsp6I (GCNGC), ženkliu efektyvumu metilino WT M.HhaI neatpažįstamas GCG sekas. Įdomu, kad šios hibridinės MTazės HhaI-L2Bsp (toliau vadinama L2Bsp) taikiny sutapo su Kilpos-1 atpažįstama M.HhaI taikinio dalimi. Tai rodo, kad iš M.Bsp6I perkelta Kilpa-2 tikriausiai nėra funkcionali M.HhaI struktūriniame kontekste. Taigi norint keisti atpažinimo kilpas tarp skirtingų MTazių ir gauti naujus taikinius atpažįstančius baltymus, reikia naujai įterptą atpažinimo elementą priderinti prie motininio baltymo struktūrinio konteksto. Kadangi GCG – asimetriška seka, L2Bsp suteikė galimybę gauti hemimetilintą

DNR, kuri buvo panaudota pelės MTazės Dnmt1 veikimo mechanizmo tyrimui (Vilkaitis ir kt., 2005). Galimybė pritaikyti šią hibridinę MTazę praktiniams tikslams paskatino tolimesnius tyrimus.



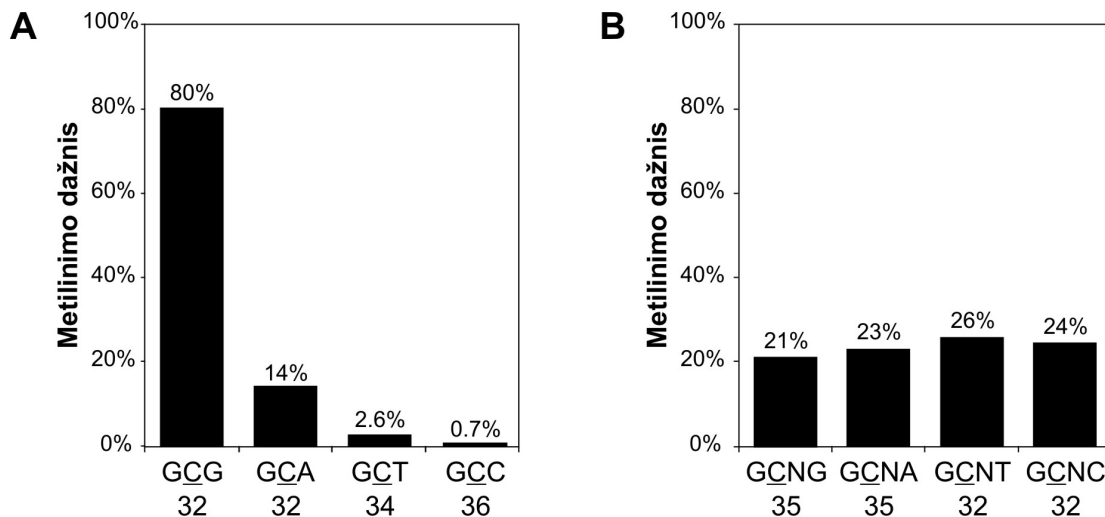
3.1 paveikslas. M.HhaI specifinė sąveika su taikiniu GCGC. **A** (viršuje) – kontaktų tarp M.HhaI taikinio atpažinimo kilpų ir taikinio bazių schema; Kilpa-1 – raudona, Kilpa-2 – mėlyna; amr., sudarančios kontaktus su DNR pabrauktos; linijos vaizduoja tiesioginius kontaktus tarp amr. ir DNR bazių; punktyrinė linija vaizduoja kontaktą per vandens molekulę; konservatyvus TL dipeptidas apibrauktas; metilinas citozinas C2 padidintas ir paryškintas. **A** (apačioje) – WT M.HhaI ir pakeisto specifiškumo mutantų Kilpos-2 amr. sekų palyginys; ΔL2 – mutantų biblioteka; mutuojamos pozicijos (X) paryškintos; vienoje iš atrinktų MTazių rasta papildoma mutacija IX KM paryškinta ir pabraukta. **B** ir **C** – M.HhaI sąveika su ketvirtąja ir trečiąja bazių poromis trinariame komplekse M.HhaI-DNR-AdoHcy (PDB kodas 3mht) (O'Gara ir kt., 1996a); Δ žymi amr., pašalintas mutantuose su trumpesne Kilpa-2, kiti žymėjimai tokie patys kaip **A** dalyje.

Šiame darbe pateikiama detali hibridinės MTazės L2Bsp specifiškumo ir fermentinio aktyvumo analizė. Taip pat buvo siekiama M.HhaI pavyzdžiu

išbandyti naują pakeisto specifiškumo MTazių konstravimo strategiją: M.HhaI specifiškumą sekai pakeisti iš GCGC į GCG, pašalinant atpažinimo Kilpos-2 funkciją ir taip panaikinant specifinius kontaktus su ketvirtąja taikinio baze (GCGC).

3.1.1. L2Bsp specifiškumo *in vivo* analizė

Norint detaliai charakterizuoti L2Bsp specifiškumą, buvo analizuota plazmidinė DNR, išskirta iš *E.coli* ER1727 ląstelių, sintetinančių didelį kiekį tiriamos MTazės. Ši DNR buvo modifikuota bisulfitu ir analizuota kaip aprašyta 2.9.3 skyriuje. Buvo tirti trys DNR fragmentai iš pMB1 replikono ir β -laktamazės geno, kurių viršutinė ir apatinė grandinės padaugintos atskirai, naudojant modifikuotai DNR komplementarių pradmenų poras (2.1 lentelė). Analizuojamas regionas apėmė 1577 nt, jame buvo 32 GCG taikiniai.



3.2 paveikslas. Trečiosios ir ketvirtosios taikinio pozicijos įtaka MTazės L2Bsp metilinimo *in vivo* efektyvumui. **A** – vidutinis GCX taikinių metilinimo dažnis. **B** – vidutinis GCNX taikinių metilinimo dažnis. Metilinamas citozinas pabrauktas, po kiekviena seka nurodytas individualių taikinių skaičius. Iš didelį kiekį L2Bsp produkuojančių *E.coli* ląstelių išskirtos plazmidinės DNR metilinimas buvo tirtas ją modifikavus bisulfitu. Individualaus taikinio metilinimo dažnis (%) įvertintas nustačius 16-32 klonų DNR seką. Kiekvieno taikinio metilinimo dažnis apskaičiuotas kaip klonų, kuriuose buvo užfiksuotas citozino signalas šiame taikinyje (atitinkantis 5mC nemodifikuotoje sekoje), procentinė dalis nuo bendro analizuotų klonų, turinčių šį taikinį, skaičiaus. Analizuotame regione (1577 nt) buvo 134 potencialūs taikiniai GCN.

Kontrolinėje DNR, išskirtoje iš L2Bsp nesintetinančių ląstelių, 5mC buvo aptiktas tik trijuose kamieno koduojamos EcoDcm MTazės taikiniuose CCWGG. Kaip ir tikėtasi iš pirminių rezultatų (Vilkaitis ir Klimašauskas, 1998), pagrindinis L2Bsp taikinis buvo GCG (3.2 pav. A). Nukleotidas ketvirtoje taikinio pozicijoje metilinimo efektyvumo neįtakoją (3.2 pav. B). Individualių GCG taikinių metilinimo efektyvumas variavo nuo 40 iki 100%, nors jokio dėsningumo, siejančio GCG taikinio apsuptį ir metilinimo efektyvumą, aptikti nepavyko. Taip pat buvo stebėtas ir ne GCG sekų metilinimas: kai kurie GCA taikiniai buvo metilinami netgi 40% efektyvumu. GCC ir GCT taikinių metilinimas stebėtas retai; šių taikinių metilinimo dažnis niekada neviršijo 25%. Remiantis gautais rezultatais L2Bsp specifiškumas aprašomas kaip GC[G/a], pažymint, kad efektyviausiai metilinamas taikinis yra GCG, tačiau ženkliai metilinami ir GCA taikiniai. Išsigimęs L2Bsp specifiškumas ir palyginti mažas katalitinis efektyvumas (žiūr. toliau) akivaizdžiai riboja šios MTazės pritaikymą praktiniams tikslams. Todėl buvo nutarta sukonstruoti efektyvesnę ir specifiškesnę GCG taikinį metilinančią MTazę.

3.1.2. Efektyvesnių GCG taikinius metilinančių MTazių konstravimas

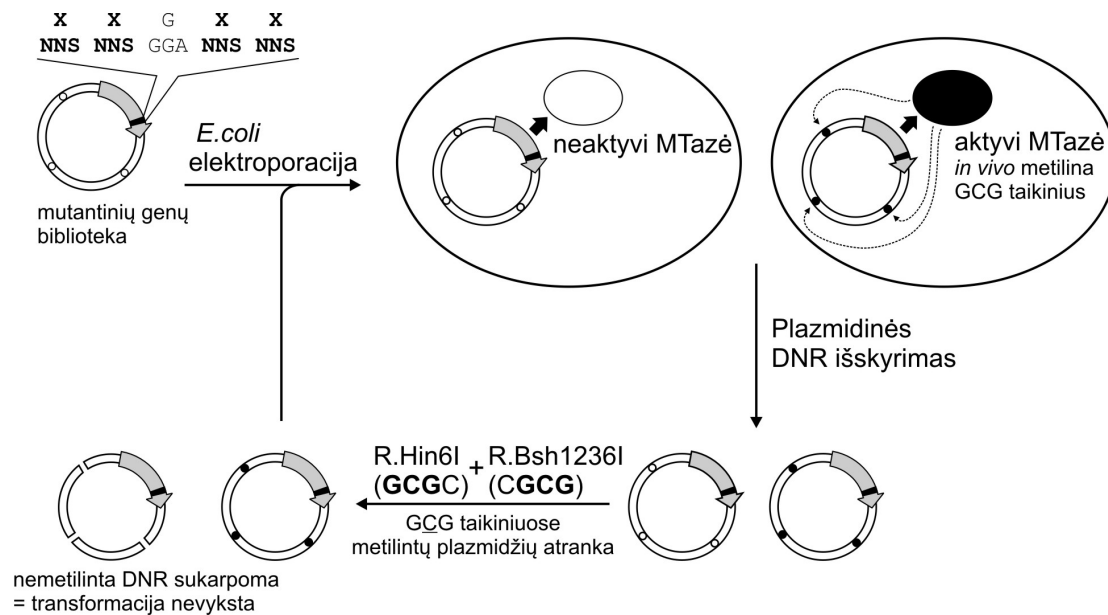
Kadangi kontaktus su ketvirtąja taikinio bazių pora sudaro ne šoninių grandinių, o peptidinių jungčių atomai (3.1 pav. B), šių kontaktų panaikinimas įvedant taškines mutacijas buvo mažai tikėtinas. Tai patvirtino ir Kilpos-2 evoliucijos *in vitro* eksperimentai, kurių metu M.HhaI specifiškumas nebuvo pakeistas (Lee ir kt., 2002). Kita vertus, norimas specifiškumo pasikeitimas buvo stebėtas hibridinėje MTazėje L2Bsp. Konstruojant hibridinę MTazę L2Bsp ne tik buvo pakeista M.HhaI antrosios atpažinimo kilpos seka, bet ir pati Kilpa-2 sutrumpinta penkiomis aminorūgštimis. M.HhaI-DNR komplekso erdvinės struktūros analizė parodė, kad specifiškumo pasikeitimą iš GCGC į GCG MTazėje L2Bsp greičiausiai nulemia būtent atpažinimo Kilpos 2 sutrumpinimas, dėl kurio ji nutolsta nuo DNR ir nebesąveikauja su ketvirtąja taikinio GCGC bazių pora. Tuo tarpu iš M.Bsp6I perkeltas fragmentas

tikriausiai nėra funkcionalus M.HhaI struktūriniame kontekste ir DNR atpažinimo neįtakoja. Taip pat tikėtina, kad šis į M.HhaI įterptas fragmentas nėra optimalus fermento funkcijai. Todėl konstruojant efektyvią GCG atpažįstančią MTazę, nutarta išlaikyti penkių amr. deleciją M.HhaI atpažinimo Kilpoje-2 ir kryptingos evoliucijos būdu optimizuoti jos amr. seką (**3.1 pav. A**). Mutagenezei parinktos keturios amr. sutrumpintoje Kilpoje-2. Norint užtikrinti sutrumpintos Kilpos-2 konformacinį lankstumą ir kadangi M.HhaI erdvinėje struktūroje dviejų iš penkių Kilpoje-2 esančių glicinų konformacijos yra neleistinos šoninę grandinę turinčioms amr., mutuojamo regiono centre buvo paliktas vienas glicinas.

Mutagenezė atlikta PGR metodu, naudojant oligonukleotidą, kuriame keturių mutagenizuojamų amr. kodonai pakeisti į NNS. Tokioje sistemoje įmanomi 1 048 576 kodonų variantai. Mutagenezės schema ir detalus aprašymas pateikti **2.7.4 skyriuje**. Kaip matrica PGR metu buvo naudota linearizuota plazmidė pHHΔBE, nekoduojanti aktyvios MTazės ir turinti 36 nt deleciją, apimančią Kilpą-2. Mutuojamam fragmentui homologiškos sekos nebuvimas PGR matricoje užtikrina vienodą tikimybę įvairias sekas turintiems pradmenims dalyvauti reakcijoje. Susintetintas PGR fragmentas įklonuotas į plazmidę pHHΔBE, atkuriant pilną *hhaIM* geno seką, ir gautomis plazmidėmis transformuotos *E.coli* ER2566 *lacI^f* kamieno ląstelės. Šios mutantų bibliotekos selekcijos schema pavaizduota **3.3 pav.** Transformantai auginti selektyvioje skystoje M9 terpėje 37°C temperatūroje per naktį, neindukuojant baltymo sintezės. Gauto banko dydis įvertintas išsėjus tris nepriklausomus 1000^x skiedimus ant tokios pat agarizuotos terpės. Tokiu būdu įvertinta, kad gautą banką sudarė ~6·10⁶ transformantų. Tokiomis auginimo sąlygomis (esant baziniam MTazės ekspresijos lygiui), WT M.HhaI ekspresuojančiose ląstelėse plazmidinė DNR pilnai metilinama GCGC taikiniuose ir apsaugoma nuo sukarpymo R.Hin6I (GCGC), o L2Bsp atveju stebimas tik labai silpnas plazmidinės DNR metilinimas. Taigi šios auginimo sąlygos buvo tinkamos efektyvesnių negu L2Bsp MTazių atrankai. Iš gautų transformantų buvo išgryninta suminė DNR ir, karpant restrikcijos endonukleazėmis nustatyta, kad

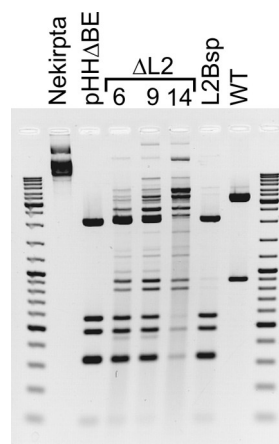
didžioji dalis bibliotekos turėjo teisingos struktūros plazmidės. Nustačius modifikuojamo fragmento nukleotidų seką nepastebėta žymaus nukleotidų nukrypimo nuo atsitiktinio pasiskirstymo mutuojamuose kodonuose.

Kadangi nėra GCG taikinį atpažįstančios restrikcijos endonukleazės, biocheminis bankų praturtinimas vykdytas karpant iš mutantų banko išgrynintą suminę plazmidinę DNR REazių Hin6I (GCGC) ir Bsh1236I (CGCG) mišiniu (skliausteliuose nurodyta REazių atpažįstama seka, pabraukti citozinai, kurių metilinimas inhibuoja REazės aktyvumą). Šios REazės atitinkamai turėjo 14 ir 8 taikinius pHhaI-ΔL2 plazmidėje. ~0,5 μg sukarpytos DNR transformuota į *E.coli* ląsteles ir gauta ~2·10⁴ transformantų. Iš 9 transformantų išgryninus plazmidinę DNR ir patikrinus jos apsaugojimą nuo karpymo R.Bsh1236I nustatyta, kad tik keturi transformantai kodavo aktyvias MTazes (iš jų išgryninta DNR buvo iš dalies apsaugota nuo karpymo). Todėl iš likusių kolonijų buvo vėl išgryninta suminė DNR ir biocheminės selekcijos ciklas pakartotas. Po antrojo ciklo buvo gauta ~1500 transformantų. Iš 35 klonų išskirtą plazmidinę DNR karpant R.Bsh1236I nustatyta, kad visos plazmidės buvo stipriau metilintos negu L2Bsp koduojanti plazmidė. Nustačius DNR iš 28 klonų seką, aptikti tik du skirtingi Kilpos-2 amr. sekos variantai – **SGGRC** (27 klonuose) ir **SAGRC** (viename klone) (**3.1 pav.**). Pažymėtina, kad nors amr. seka buvo ta pati, aminorūgščių kodonai skyrėsi: buvo rasti visi pagal mutagenizacijos schemą įmanomi Ser, Gly ir Arg kodonai (Cys atveju buvo galima gauti tik vieną iš dviejų Cys koduojančių kodonų). Tai rodo, kad atrinktos MTazės nėra kilusios iš vieno neproporcingai pasidauginusio pirmtako ir šių sekų atsiradimo nenulėmė nukleotidų sudėtis pradinėje bibliotekoje. Taigi galima teigti, kad buvo atrinktos optimalią atpažinimo Kilpos-2 struktūrą turinčios MTazės. Įdomu, kad 5 iš 27 patikrintų variantų turėjo mutaciją už mutagenizuojamo fragmento ribų, IX-ame konservatyviame motyve (M.HhaI K273R). Ši mutacija tikriausiai buvo įvesta *Taq* polimerazės PGR metu.



3.3 paveikslas. GCG taikinį atpažįstančių MTazių nukreipta evoliucija. MTazę koduojantis genas pavaizduotas kaip pilka rodyklė, mutuojiama Kilpa-2 juoda; balti ir juodi skrituliai žymi atitinkamai nemetilintas ir metilintas GCG sekas; stora juoda rodyklė žymi plazmidėje koduojamos MTazės sintezę *E. coli* ląstelėje.

Tolesniems tyrimams pasirinkti trys klonai, koduojantys visus tris atrinktus MTazių variantus – Δ L2-6, Δ L2-9 ir Δ L2-14 (3.1 pav. A). Visais trimis atvejais atrinktų MTazių metilinimo efektyvumas *in vivo* esant baziniam baltymo ekspresijos lygiui buvo ženkliai didesnis negu L2Bsp (3.4 pav.). Pažymėtina, kad aktyviausia buvo MTazė Δ L2-14, turinti papildomą mutaciją IX konservatyviame motyve.



3.4 paveikslas. Atrinktų MTazių aktyvumas *in vivo*. *E. coli* ER2267 ląstelės, turinčios tiriamą MTazę koduojančią plazmidę, augintos minimalioje terpėje 37°C temperatūroje per naktį. Išgryninta DNR karpyta R.Bsh1236I (CGCG) ir

frakcionuota agaroziniame gelyje. Pirmame ir paskutiniame takeliuose – DNR molekulinės masės standartas; pHHΔBE – kontrolinė plazmidė, nekoduojanti aktyvios MTazės.

Tolesniam MTazių charakterizavimui trys atrinktos MTazės, WT M.HhaI ir L2Bsp baltymai superekspresuoti E.coli ER2267 kamiene ir išgryninti naudojant Ni²⁺ chelatuojančią kolonėlę, kofaktorius AdoMet pašalintas dializuojant. Masių spektrometru nustatytos išgrynintų baltymų molekulinės masės paklaidų ribose sutapo su apskaičiuotomis teoriškai.

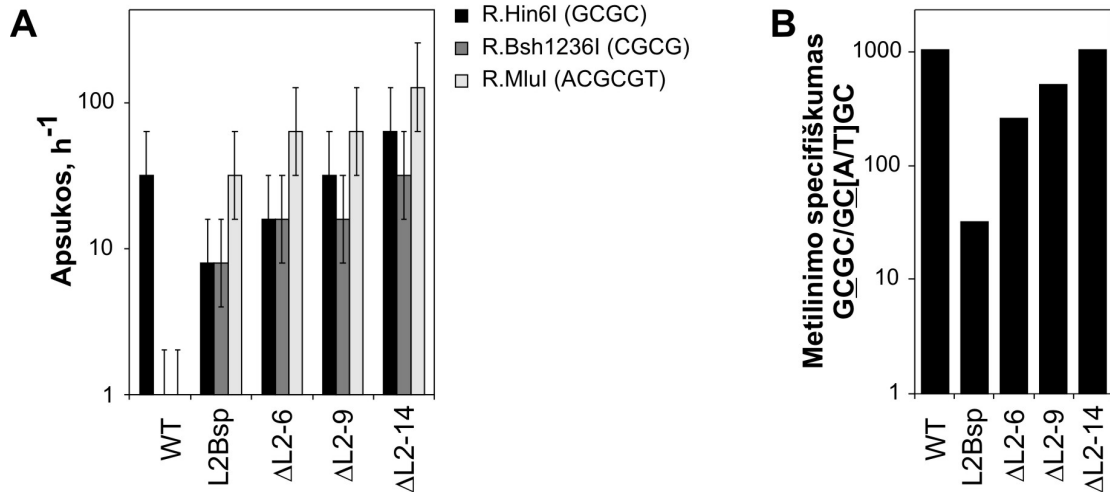
3.1.3. Atrinktų MTazių katalitinio efektyvumo ir specifiškumo tyrimas

Pirmajame darbų etape naujų MTazių aktyvumas ir specifiškumas buvo tirtas REazėmis, nekerpančiomis DNR, jeigu jų taikiniuose yra 5-metilcitozinas (**2.3 lentelė**). Tyrimui naudotos REazės, kurių taikiniuose yra spėjamas mutantinių MTazių taikinyje GCG: Hin6I (**GCGC**), Bsh1236I (**CGCG**) ir MluI (**ACGCGT**). Nespecifiniam metilinimui ne GCG taikiniuose įvertinti panaudota R.BseXI (GCWGC). Eksperimento metu fago λ DNR buvo metilinta skirtingais tiriamos MTazės kiekiais 1 val. 37°C temperatūroje, po to MTazė inaktyvuota kaitinant, o DNR karpyma 5mC jautriomis REazėmis. Kiekvienu atveju buvo nustatytas minimalus MTazės kiekis, reikalingas pilnam λ DNR apsaugojimui nuo sukarpymo. Pagal tai buvo įvertintas MTazės per valandą padaromų katalitinių apskukų skaičius. Šios analizės rezultatai pateikti **3.5 pav. A**.

Visos atrinktos MTazės metilino DNR *in vitro* ir apsaugojo DNR nuo karpymo R.Hin6I. Kaip ir eksperimentuose *in vivo*, taip ir *in vitro* mažiausiai aktyvi buvo L2Bsp, o aktyviausia – ΔL2-14, turinti papildomą mutaciją IX konservatyviame motyve. ΔL2-6 ir ΔL2-9 pasižymėjo labai artimu katalitiniu efektyvumu.

Visos mutantinės MTazės pilnai apsaugojo DNR nuo sukarpymo R.Bsh1236I ir R.MluI – REazėmis, kurių taikinyje nėra GCGC sekos. Taigi šie duomenys neprieštaravo prielaidai, kad mutantinių MTazių specifiškumas yra

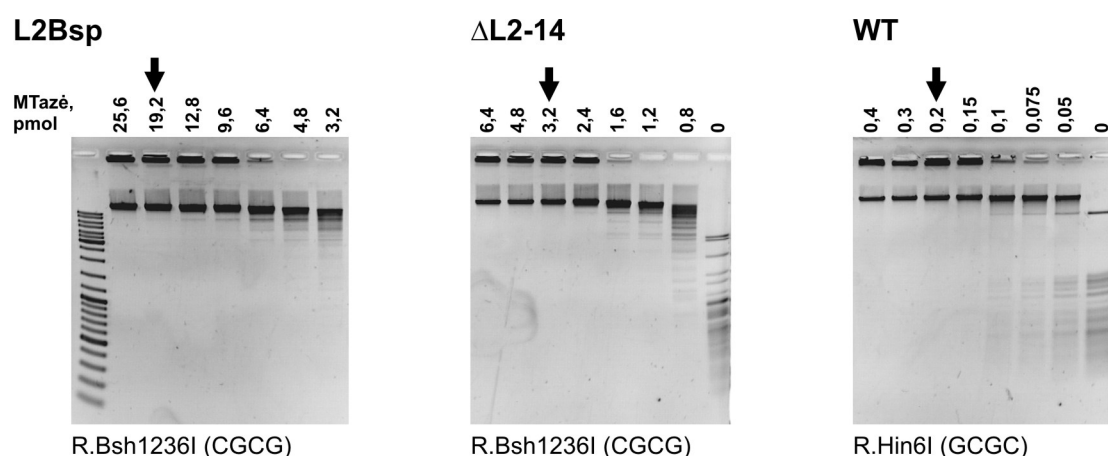
ne \underline{GCGC} , kaip WT M.HhaI, o pasikeitęs į \underline{GCG} . Ne \underline{GCGC} taikinių atžvilgiu taip pat aktyviausia buvo $\Delta L2-14$, o mažiausiai aktyvi L2Bsp.



3.5 paveikslas. $\Delta L2$ -MTazių *in vitro* specifiskumo ir aktyvumo analizė restrikcijos endonukleazėmis. **A** – matomų fermento apsukų skaičius MTazei metilinant skirtingus taikinius. Kiekvienos MTazės atveju atlikta serija reakcijų, kuriose pastovus λ DNR kiekis metilintas mažėjančiu kiekiu tiriamos MTazės ($2\times$ skiedimai, pradedant nuo ekvimolinio baltymo ir \underline{GCG} taikinių santykio). Po to metilinta DNR karpyta skirtingomis 5mC jautriomis REazėmis. Matomų fermento apsukų skaičius (h^{-1}) skirtinguose taikiniuose įvertintas pagal minimalų MTazės kiekį (MTazės : \underline{GCG} taikinių santykį), reikalingą pilnam apsaugojimui pasiekti per 1 val.. Duomenys pateikti su eksperimento paklaida. **B** – $\Delta L2$ -MTazių specifiskumas, išreikštas kaip fermento apsukų \underline{GCGC} taikiniuose santykis su apsukomis $\underline{GC[A/T]GC}$ taikiniuose.

Kaip minėta anksčiau, L2Bsp *in vivo* metilina ne tik \underline{GCG} taikinius, bet ir kai kurias $\underline{GC[A/T/C]}$ sekas, ypač \underline{GCA} . Šių taikinių metilinimas galėjo būti būdingas ir naujoms MTazėms, turinčioms panašią į L2Bsp Kilpos-2 struktūrą (**3.1 pav.**). Nekanoninių taikinių metilinimas buvo tiriamas naudojant R.BseXI, kuri jautri tik pirmojo citozino taikinyje $\underline{GC[A/T]GC}$ metilinimui. Apsaugojimas nuo karpymo šia REaze stebėtas tik esant didelėms tiriamų MTazių koncentracijoms. Skirtingai nuo REazių, kurių taikinyje yra \underline{GCG} motyvas, efektyviausiai nuo R.BseXI apsaugojo L2Bsp. Kiekybinį ne \underline{GCG} taikinių metilinimo įvertinimą ir palyginimą su \underline{GCG} taikinių metilinimo efektyvumu apsunkino tai, kad nei vieno eksperimento metu nebuvo pasiektas

pilnas apsaugojimas nuo R.BseXI. Todėl norint palyginti kanoninių (GCG) ir nekanoninių (šiuo atveju GC[A/T]) taikinių metilinimo efektyvumą, buvo nustatyta mažiausia MTazės koncentracija, kurią naudojant pradedamas fiksuoti nepilnas DNR karpymas REaze BseXI. Kanoninių taikinių atveju, šį apsaugojimo pradžios tašką ir pilną apsaugojimą skiria penki 2-kartiniai MTazės skiedimai, t.y. pilnam apsaugojimui pasiekti reikalinga 32 kartus didesnė MTazės koncentracija. Pagal analogiją buvo teoriškai apskaičiuotas tiriamų MTazių kiekis, reikalingas pilnam apsaugojimui nuo R.BseXI pasiekti. Tokiu būdu gautas specifinių ir nespecifinių taikinių metilinimo efektyvumo santykis leido apytikriai įvertinti, kad iš mutantų bibliotekos atrinktos MTazės pasižymi panašiu specifiškumu kaip WT M.HhaI, o tuo tarpu L2Bsp ~10 kartų mažiau specifiška (3.5 pav. B).



3.6 paveikslas. Pakeisto specifiškumo MTazių savitojo aktyvumo nustatymas. 1 μg λ DNR inkubuota su skirtingais kiekiais tiriamų MTazių 1 val. 37°C esant mišinyje 100 μM AdoMet, po to MTazės inaktyvuotos kaitinant ir DNR karpyta nurodytomis REazėmis. Virš kiekvieno takelio nurodytas MTazės kiekis reakcijos mišinyje (pmol), juoda rodyklė žymi takelį, kuriame yra 1 akt. vnt. MTazės.

Naudojant sukonstruotas MTazes kaip molekulinės biologijos įrankius, patogiau jį kiekį matuoti aktyvumo vienetais. Analogiškai restrikcijos endonukleazėms, DNR MTazių aktyvumo vienetas apibrėžiamas kaip MTazės kiekis, kuris per 1 val. 37°C temperatūroje 50 μl reakcijos tūryje pilnai apsaugo 1 μg λ DNR nuo hidrolizės tokio paties arba persidengiančio specifiškumo REaze. Pakeisto specifiškumo MTazių aktyvumo vienetais

nustatyti buvo naudota R.Bsh1236I, suteikianti galimybę patikrinti daugiausia GCG taikinių (2.3 lentelė). Kaip matyti iš 3.6 pav., ΔL2-14 savitasis aktyvumas 16 kartų mažesnis negu WT M.HhaI, tačiau atsižvelgus į tai, kad GCG taikinių λ DNR yra 8 kartus daugiau negu GCGC, galima teigti, kad šio eksperimento sąlygomis abi MTazės veikia labai panašiu efektyvumu. Tuo tarpu L2Bsp savitasis aktyvumas 6 kartus mažesnis negu ΔL2-14.

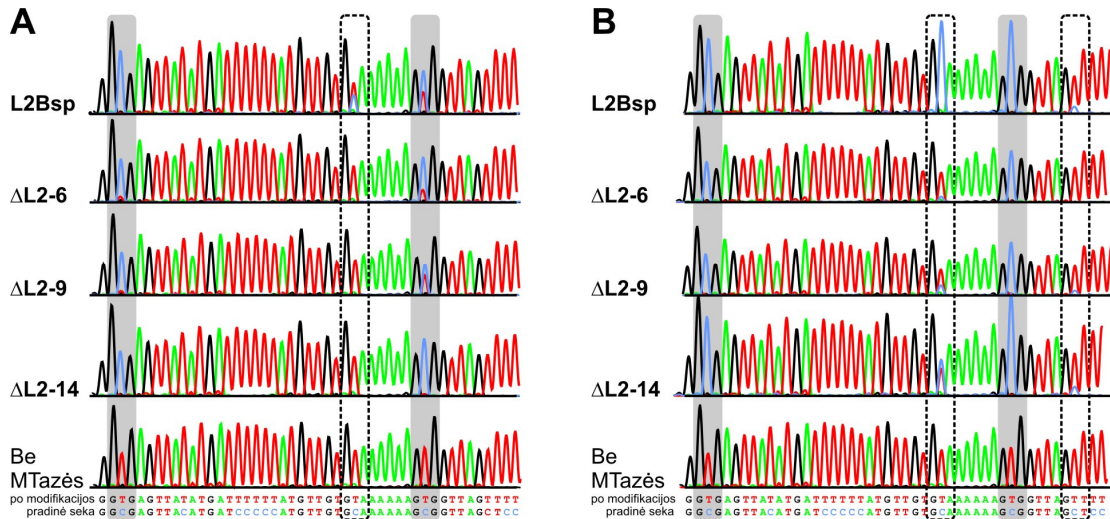
3.1.4. ΔL2-MTazių specifškumo tyrimas modifikuojant DNR bisulfitu

Pirminių tyrimų metu MTazių specifškumui tirti buvo panaudotos 5-metilcitozinui jautrios restrikcijos endonukleazės. Pagrindinis šio metodo trūkumas – ribotas skirtingus taikinius atpažįstančių REazių pasirinkimas, dėl ko visuomet egzistuoja tikimybė, kad MTazės taikiny nesutaps su tyrimams naudojamos REazės taikiniu. Todėl detaliam naujų MTazių specifškumo charakterizavimui buvo panaudota metilintos DNR modifikacija bisulfitu, leidžianti identifikuoti 5-metilcitozinius nepriklausomai nuo jų vietos DNR sekoje (žiūr. 2.9.3 skyrių) (Clark ir kt., 2006).

pBR322 DNR buvo metilinta skirtingu kiekiu tiriamų MTazių, modifikuota bisulfitu ir padauginta PGR reakcijoje su modifikuotai DNR komplementariais pradmenimis. Analizuotas 538 bp ilgio β-laktamazės geno fragmentas (3398-3935 pozicijos pBR322 molekulės viršutinėje grandinėje), turintis 9 GCG ir 37 GC[A/T/C] taikinius (12 GCA, 11 GCC ir 10 GCT). Pradiniame etape gautas PGR produktas buvo tiesiogiai panaudotas sekoskaitos reakcijose. Po modifikacijos citozinai matomi pozicijose, kur buvo 5-metilcitozinai, o nemetilintų citozinių vietoje matomi timinai. Jei kuri nors pozicija metilinta dalinai, elektroforeogramoje matomas ir C, ir T signalas. Šis metodas nėra kiekybinis, bet leidžia greitai nustatyti, kokios pozicijos yra pilnai metilintos, iš dalies metilintos arba visai nemetilintos.

Kontrolinėje reakcijoje, analizuojant nemetilintą (be MTazės inkubuotą pBR322 DNR) 5-metilcitozinių aptikta nebuvo. Metilinimo reakcijose naudojant nedidelį tiriamos MTazės kiekį (MTazės : GCG santykis 1:64), ΔL2-14 pilnai metilino aštuonis, ΔL2-9 – septynis, o ΔL2-6 – penkis iš devynių

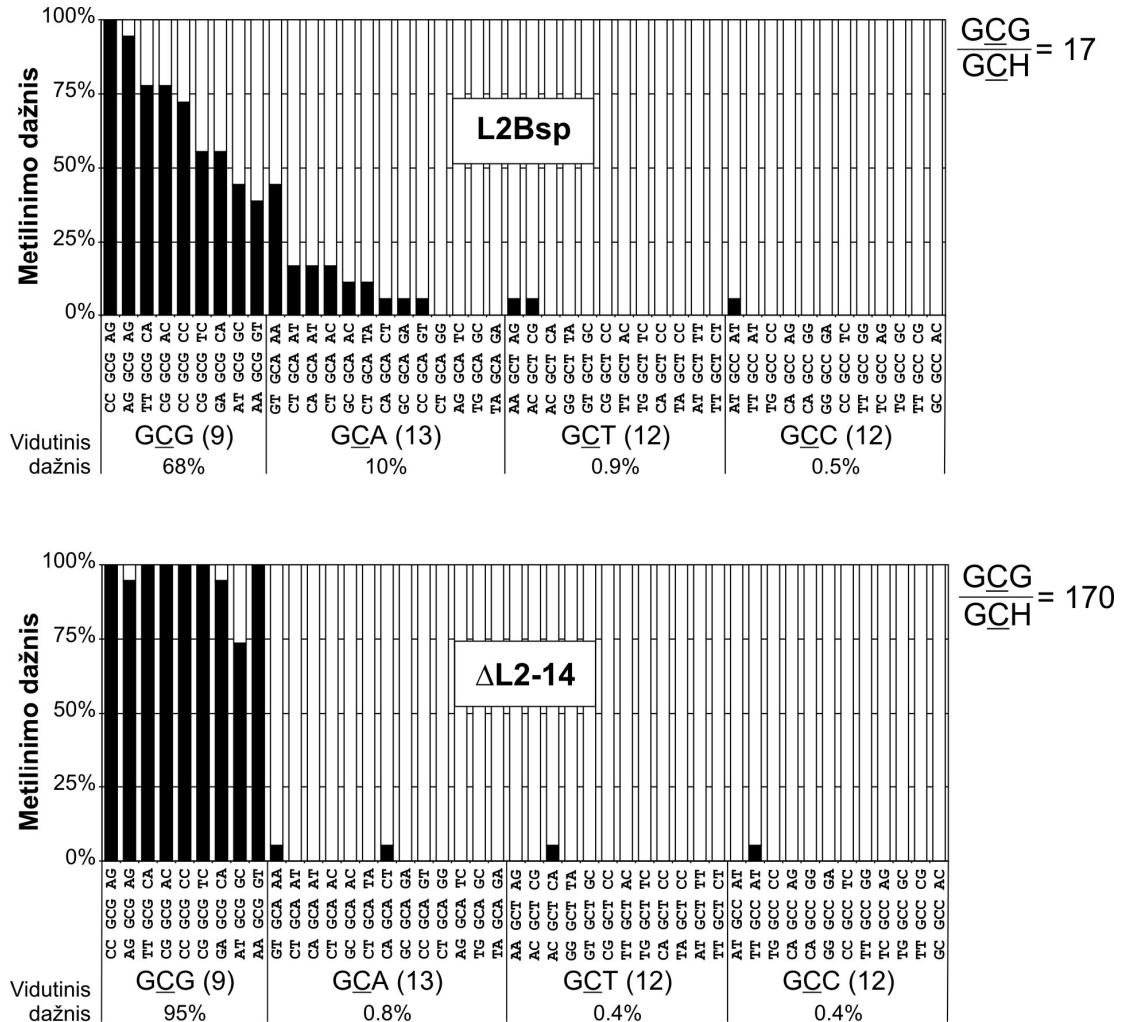
GCG taikinių. Likę GCG taikiniai buvo dalinai metilinti. Skirtingai negu naujai sukonstruotos MTazės, L2Bsp pilnai metilino tik tris iš devynių GCG taikinių, tačiau tuo pat metu buvo aptiktas dalinis metilinimas keliuose GCA taikiniuose (3.7 pav. A).



3.7 paveikslas. Δ L2-MTazių *in vitro* specifiškumo analizė, naudojant DNR modifikaciją bisulfitu. Pateiktas pavyzdys rezultatų, gautų metilinimui naudojant skirtingą MTazių kiekį: **A** – MTazės : GCG santykis 1:64. **B** – MTazės : GCG santykis 1:4. Pilkame fone kanoniniai GCG taikiniai; Punktyrine linija apibraukti nekanoniniai MTazių taikiniai GCA ir GCT. pBR322 DNR buvo metilinta *in vitro* tiriamomis MTazėmis 1 val., esant reakcijos mišinyje 300 μ M AdoMet, modifikuota bisulfitu, analizuojamas fragmentas padaugintas PGR ir nustatyta jo seka. Po modifikacijos bisulfitu ir PGR nemetilinti citozinai virsta timiniais, o citozinai aptinkami tik tose pozicijose, kur buvo 5-metilcitozinas. Kadangi tiesiogiai nustatoma PGR produkto seka, gautos elektroforeogramos rodo vidurkintą molekulių populiacijos vaizdą, ir kiekvieno citozino būseną galima nusakyti kaip „metilintas“, „nemetilintas“ arba „iš dalies metilintas“.

L2Bsp ir Δ L2-14 specifiškumas buvo charakterizuotas detaliau, klonuojant po modifikacijos bisulfitu gautą PGR fragmentą ir nustatant atskirų klonų DNR sekas. Taip buvo kiekybiškai įvertintas skirtingų taikinių metilinimo dažnis, kuris šiuo atveju apibrėžiamas kaip klonų, kuriuose taikinis buvo metilintas santykis su visų analizuotų klonų skaičiumi. Greta GCG taikinių, L2Bsp gana efektyviai metilino ir GCA sekas, taip pat keletas 5mC buvo aptikta GCC bei GCT taikiniuose (3.8 pav.). Tuo tarpu Δ L2-14 atveju, GC[A/C/T] sekose 5mC buvo aptikta žymiai mažiau: tik 4 atvejais iš 703

galimų (37 GC[A/C/T] taikiniai tikrinti devyniolikoje klonų). Palyginus šių MTazių specifiškumą (GCG ir GC[A/C/T] taikinių metilinimo efektyvumo santykį), nustatyta, kad ΔL2-14 ~10 kartų specifiškesnė negu L2Bsp.



3.8 paveikslas. L2Bsp ir ΔL2-14 specifiškumo *in vitro* palyginimas. pBR322 DNR buvo metilinta L2Bsp (viršuje) arba ΔL2-14 (apačioje), esant MTazės : GCG santykiui 1:64. Metilinta DNR buvo modifikuota bisulfitu, padauginta PGR, gautas PGR produktas klonuotas ir nustatyta 18-19 nepriklausomų klonų DNR seka. Analizuotas 538 nt ilgio pBR322 viršutinės grandinės fragmentas, turintis 46 potencialius MTazių taikinius GCN. Diagramoje pateiktas individualių GCN taikinių metilinimo dažnis, skliausteliuose pateiktas taikinių skaičius. H – adeninas, citozinas arba timinas.

Padidinus MTazės kiekį reakcijoje iki MTazės : GCG santykio 1:4, visų MTazių atveju buvo stebėtas ne GCG taikinių metilinimas (3.7 pav. B). Pažymėtina, kad 5mC buvo aptikti tik GCN sekose, kas rodo, kad visų MTazių specifiškumas trečiajai taikinio pozicijai yra mažiausias. L2Bsp šiomis

sąlygomis efektyviai (pilnai arba beveik pilnai) metilino ne tik GCG, bet ir GCA sekas, taip pat buvo stebėtas daugelio fragmente esančių GCC ir GCT sekų dalinis metilinimas. Naujai sukonstruotų MTazių atveju GC[A/T/C] pozicijų metilinimo efektyvumas buvo mažesnis. Jis koreliavo su MTazių katalitiniu efektyvumu ir mažėjo eilėje: $\Delta 5-14 > \Delta 5-9 > \Delta 5-6$. Tarp ne GCG sekų visais atvejais efektyviausiai buvo metilinamos GCA sekos.

Gauti duomenys rodo, kad evoliucijos *in vitro* būdu atrinktos $\Delta L2$ -MTazės iš tiesų pasižymi pakeistu specifiškumu ir efektyviai metilina GCG taikinius. Taip pat jos yra specifiškesnės negu anksčiau laboratorijoje sukurta L2Bsp.

3.1.5. $\Delta L2$ -MTazių kinetinis charakterizavimas

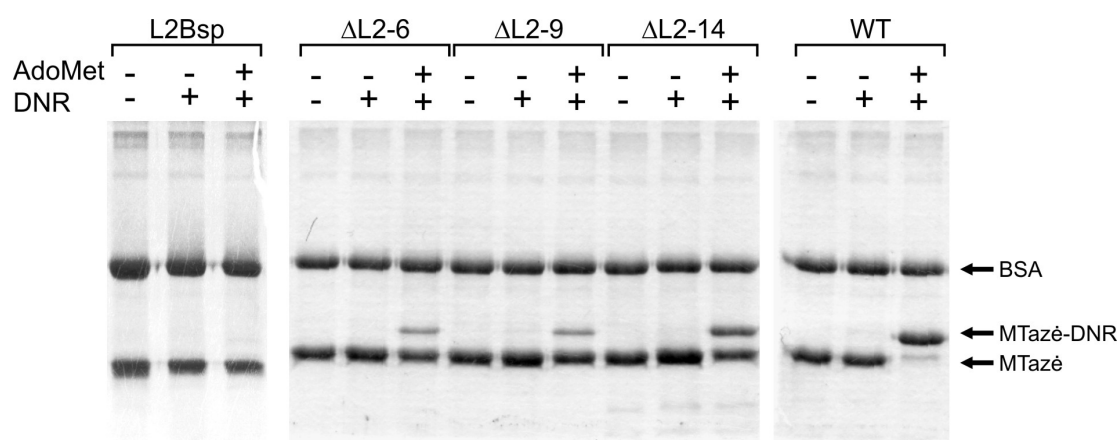
Norint geriau suprasti katalitinio aktyvumo ir specifiškumo pokyčių priežastis, buvo nustatytos naujų MTazių kinetinės konstantos stacionarios būklės sąlygomis ir palygintos su WT M.HhaI ir L2Bsp charakteristikomis. Substratu šiuose tyrimuose naudota poli[dG-dC]·poli[dG-dC] DNR, neturinti nespecifinių sekų tiek WT, tiek mutantinių MTazių atveju. Tokios DNR panaudojimas leido išvengti nuo DNR sekos priklausomų MTazių aktyvumo skirtumų.

3.1 lentelė. $\Delta L2$ -MTazių katalitiniai parametrai.

MTazė	K_D^{AdoMet} , μM	K_M^{AdoMet} , μM	K_M^{DNR} , nM	k_{cat} , min^{-1}	k_{cat} / K_M^{DNR} , $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
WT	$4,2 \pm 0,2$	$0,03 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$	$0,89 \pm 0,05$	$9 \cdot 10^7$
L2Bsp	$6,1 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,5$	1300 ± 200	$0,27 \pm 0,01$	$3 \cdot 10^3$
$\Delta L2-6$	$8,4 \pm 0,9$	$1,2 \pm 0,1$	$13,5 \pm 4,2$	$0,45 \pm 0,01$	$6 \cdot 10^5$
$\Delta L2-9$	$7,5 \pm 0,8$	$1,3 \pm 0,2$	$4,8 \pm 1,4$	$0,23 \pm 0,01$	$8 \cdot 10^5$
$\Delta L2-14$	$6,9 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,3$	$0,98 \pm 0,03$	$1 \cdot 10^7$

Kaip matyti iš **3.1 lentelės**, visų mutantinių MTazių katalitinės konstantos k_{cat} panašios tarpusavyje ir į WT M.HhaI. Labiausiai mutantinės MTazės skyrėsi giminingumu DNR. Dviejų specifinių kontaktų su heterociklinėmis bazėmis pašalinimas stipriai sutrikdė sąveiką su DNR, todėl L2Bsp $K_M^{DNR} \sim 10^4$ kartų padidėjo lyginant su WT M.HhaI. Tuo tarpu optimizavus Kilpos-2 struktūrą atrankos metu, naujų MTazių sąveika su DNR

ženkliai pagerėjo. K_M^{DNR} mažėja eilėje L2Bsp >> Δ L2-6 \geq Δ L2-9 > Δ L2-14. Tokia pati tendencija matoma ir tiriant MTazių sąveiką su 5-fluorocitoziną turinčia DNR: inkubuojant per naktį su DNR pertekliumi, L2Bsp nesudaro stabilaus kovalentinio komplekso, o naujai sukonstruotos MTazės tokį kompleksą formuoja, nors ir ne taip efektyviai kaip WT M.HhaI (**3.9 pav.**). Šie rezultatai patvirtino ankstesnių tyrimų duomenis, kad naujai sukonstruotos MTazės efektyvesnės už L2Bsp, o Δ L2-14 – efektyviausia GCG taikinius metilinti MTazė.

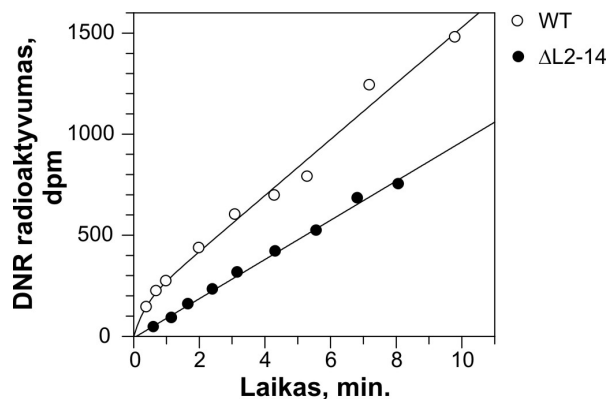


3.9 paveikslas. Pakeisto specifiškumo MTazių sąveika su 5-fluorocitoziną turinčia DNR. 5 μ M tiriamos MTazės inkubuota su 5 μ M GFGC/GFGC-13 DNR ir 200 μ M AdoMet Metilinimo buferyje I kambario temperatūroje per naktį, po to MTazė inaktyvuota kaitinat 95°C temperatūroje 5 min. su NDS ir mėginiai išfrakcionuoti denatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje. Baltymas gelyje dažytas Kumasi dažu.

Įdomu, kad visų pakeisto specifiškumo MTazių K_M^{AdoMet} buvo 50-200 kartų didesnė negu WT HhaI. Iš pirmo žvilgsnio tai buvo kiek netikėta, kadangi kofaktoriaus surišimo centras yra toli nuo taikinio atpažinimo domeno, ir pastarojo mutacijos neturėtų įtakoti kofaktoriaus surišimo. Norint patikrinti šią prielaidą, buvo ištirtas MTazių gimingumas AdoMet, matuojant Trp41 fluorescencijos gesinimą, prisijungus kofaktoriui (Vilkaitis ir kt., 2000). Šiuo metodu išmatuotos mutantinių MTazių K_D^{AdoMet} buvo labai panašios į WT M.HhaI (**3.1 lentelė**), ir tai patvirtino, kad atpažinimo Kilpos-2 pakeitimai neturi įtakos MTazės sąveikai su AdoMet binariame komplekse. Todėl

labiausiai tikėtina, kad stipriai padidėjusią mutantinių MTazių K_M^{AdoMet} lemia greitesnė kofaktoriaus disociacija iš uždaro trinario komplekso.

Iš ankstesnių tyrimų žinoma, kad M.HhaI reakcijos greitį riboja trinario produktų komplekso (MTazė-metilinta DNR-AdoHcy) iširimasis. Todėl pirmosios apšukos metu (ikistacionariomis sąlygomis) metilinta DNR susidaro didesniu greičiu negu reakcijos greitis stacionariomis sąlygomis (k_{cat}). Matuojant produkto susidarymą laike, pirmosios apšukos metu stebimas produkto susidarymo šuolis. MTazės $\Delta L2-14$ atveju atlikus analogiškus matavimus produkto susidarymo šuolis nestebėtas (**3.10 pav.**). Tai rodo, kad šiuo atveju reakcijos greitį riboja kita stadija ir patvirtina prielaidą, kad $\Delta L2$ -MTazėms būdinga greitesnė kofaktoriaus disociacija iš trinario komplekso.

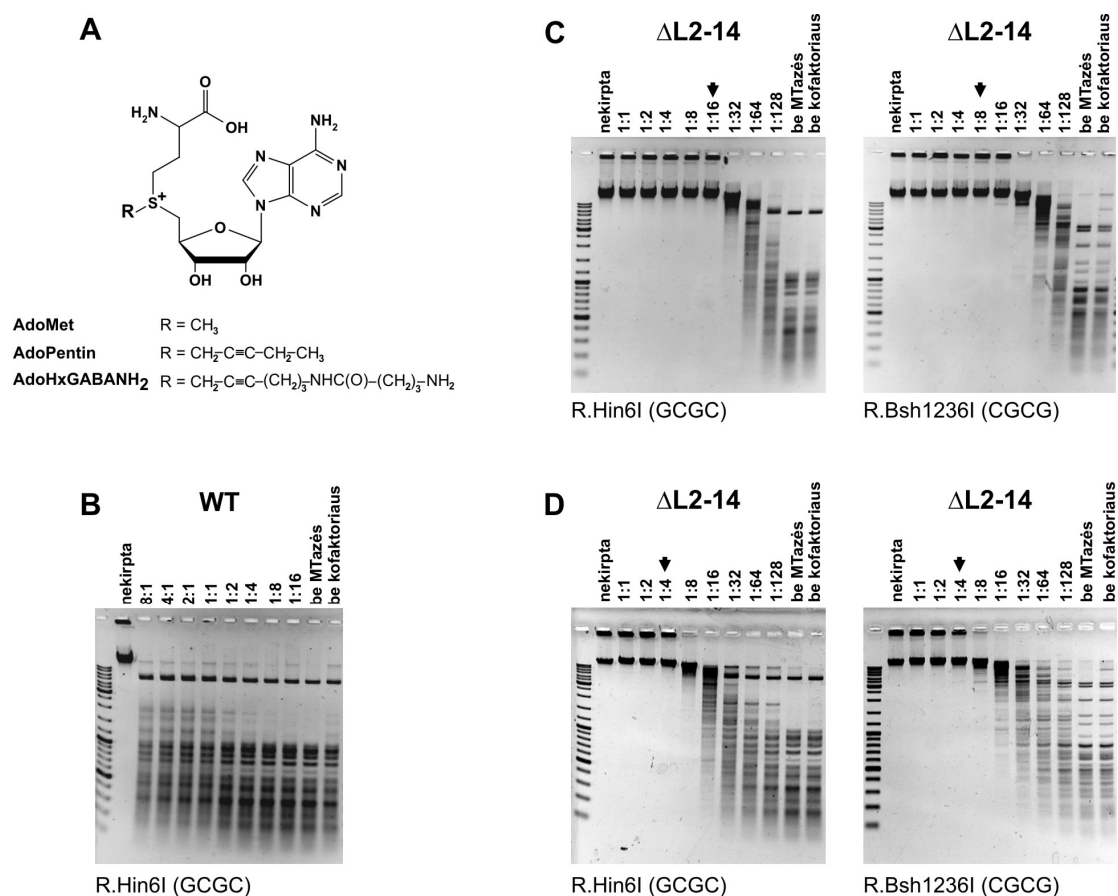


3.10 paveikslas. Pradinio produktų susidarymo šuolio tyrimas WT M.HhaI ir $\Delta L2-14$ katalizuojamose reakcijose. Reakcijos mišinys Metilinimo buferyje I, turintis 4 nM $\Delta L2-14$ arba WT M.HhaI, polidG-dC]·poly[dG-dC] DNR (500 M dvigrandžių GCGC taikinių) ir 100 μ M [*metil-3H*]AdoMet (0.5 Ci/mmol) inkubuotas 37°C temperatūroje. Praėjus 0,5-10 min. nuo reakcijos pradžios buvo imami mėginiai, reakcija stabdyta 0,5 N HCl ir į DNR įjungtos žymės kiekis matuotas kaip aprašyta **2.10.2 skyriuje**.

3.1.6. DNR alkilinimas reakcijose su sintetiniais AdoMet analogais

Šiuo metu Biotechnologijos instituto DNR modifikacijos tyrimų laboratorijoje vystoma mTAG (*methyltransferase-directed transfer of activated groups*) technologija, suteikianti galimybę specifinėse DNR vietose prijungti geromis reporterinėmis savybėmis pasižyminčias grupes (Klimašauskas ir Weinhold, 2007). Tam naudojamos DNR metiltransferazės ir sintetiniai

kofaktoriaus analogai, kuriuose pernešama metilgrupė pakeista didesnėmis, chemiškai reaktyviomis grupėmis. Tačiau pasirodė, kad laukinio tipo MTazės dažniausiai yra labai neefektyvios reakcijose su sintetiniais AdoMet analogais. M.HhaI reaktyvumą su kofaktoriaus analogais pavyko ženkliai pagerinti pakeitus dideles kofaktoriaus surišimo centre esančias amr. į Ala arba Ser. Viena iš tokių aktyvumą didinančių mutacijų buvo Tyr254 iš atpažinimo Kilpos-2 pakeitimas į Ser (G. Lukinavičius ir S. Klimašauskas, nepublikuoti rezultatai). Tyr254 formuoja išorinę AdoMet surišimo kišenės sieną ir gali erdviškai trukdyti kofaktoriaus su ilgesne pernešama grandine surišimui aktyviame centre. Δ L2-MTazėse analogiškoje pozicijoje yra Ser, todėl buvo tikėtasi, kad šios MTazės bus efektyvesnės už laukinio tipo baltymų reakcijose su AdoMet analogais.



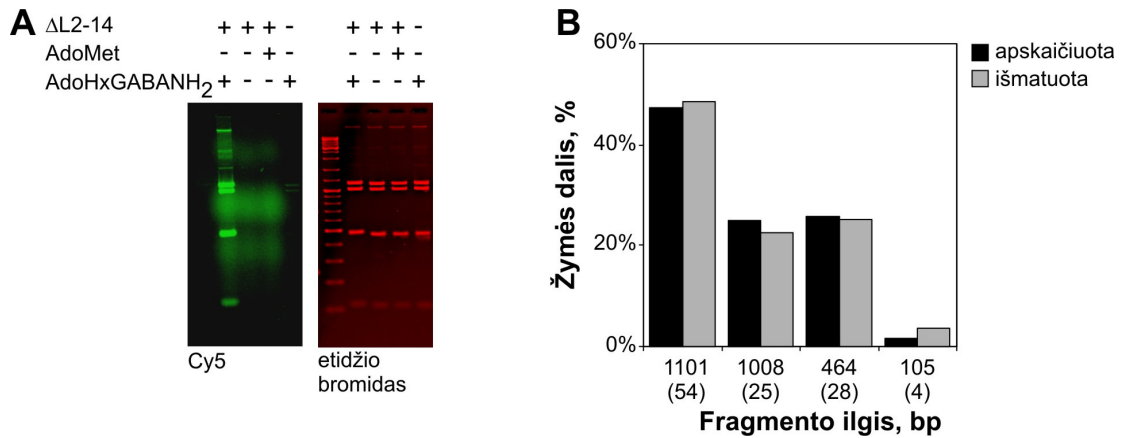
3.11 paveikslas. Fermentinis DNR alkilinimas naudojant sintetinius AdoMet analogus. **A** – AdoMet ir sintetinių jo analogų struktūra. **B** – WT M.HhaI aktyvumas reakcijoje su AdoPentin. **C** – Δ L2-14 aktyvumas reakcijoje su AdoPentin. **D** – Δ L2-14 aktyvumas reakcijoje su AdoHxGABANH₂.

Pastovus λ DNR kiekis metilintas mažėjančiu kiekiu tiriamos MTazės ($2\times$ skiedimai, pradėdant nuo ekvimolinio baltymo ir GCG taikinių santykio), MTazė inaktyvuota kaitinant, DNR karpyta 5mC jautriomis REazėmis ir frakcionuota agaroziniame gelyje. Virš kiekvieno takelio nurodytas MTazės : GCG taikinių santykis, rodyklė žymi mažiausią MTazės : GCG taikinių santykį, reikalingą pilnam apsaugojimui pasiekti.

Pirmiausia buvo patikrintas Δ L2-14 sugebėjimas pernešti pentinilo radikalą nuo modelinio kofaktoriaus analogo AdoPentin (**3.11 pav. A**) ant DNR. Δ L2-14 katalizuojamos reakcijos greitis su šiuo kofaktoriumi yra $\sim 8 \text{ h}^{-1}$, t.y. bent 100 kartų didesnis negu laukinio tipo MTazės atveju (palyginkite **3.11 pav. B** ir **C**) ir tik ~ 8 kartus mažesnis negu reakcijos greitis su natūraliu kofaktoriumi. Karpant alkilintą DNR R.Bsh1236I (CGCG), nustatyta, kad Δ L2-14 specifiskumas su abiem kofaktoriais nesiskiria. Taigi naujai sukurta MTazė ne tik efektyviai metilina GCG sekas, bet ir efektyviai jas alkilina reakcijose su sintetiniais kofaktoriaus analogais.

Kitame darbų etape buvo tirtas Δ L2-14 aktyvumas reakcijoje su žymėjimui tinkamu kofaktoriumi AdoHxGABANH₂. Kaip matyti iš **3.11 pav. D**, Δ L2-14 katalizuoja ir šią reakciją. Svarbu pažymėti, kad WT M.HhaI visai nekatalizuoja reakcijos su šiuo AdoMet analogu (G. Lukinavičius ir S. Klimašauskas, nepublikuoti rezultatai). Šioje reakcijoje prie DNR specifinių taikinių prijungiamas radikalas su pirmine aminogrupe, neaptinkama gamtinėse nukleorūgščių molekulėse. Taip modifikuotus taikinius galima specifiskai pažymėti įvairiomis (fluorescuojančiomis, giminingumo) žymėmis, naudojant komercinius reagentus, pvz., NHS esterius. Δ L2-14 reakcijoje su AdoHxGABANH₂ modifikuota DNR buvo inkubuota su Cy5-NHS esteriu ir tokiu būdu fluorescuojanti žymė prijungta prie MTazės modifikuotų GCG taikinių. Pažymėta DNR buvo hidrolizuota REazėmis BamHI ir Pagi, hidrolizės produktai išfrakcionuoti agaroziniame gelyje ir vizualizuoti žadinant fluorescenciją 635 nm šviesa (**3.12 pav. A**). Densitometriškai įvertinus kiekviename fragmente įjungtos žymės kiekį nustatyta, kad jis gerai koreliuoja su teoriškai apskaičiuotu pagal GCG taikinių skaičių kiekviename fragmente

(3.12 pav. B). Taigi naujai sukonstruota MTazė Δ L2-14 yra tinkama specifiniam GCG sekų žymėjimui panaudojant AdoMet analogus.



3.12 paveikslas. Plazmidinės DNR žymėjimas GCG sekose, naudojant Δ L2-14 ir sintetinį kofaktoriaus analogą AdoHxGABANH₂. pUC19 DNR buvo alkilinta inkubuojant su Δ L2-14 ir AdoHxGABANH₂. Antrame žingsnyje prijungtas fluorescuojantis dažas, veikiant Cy5 NHS esteriu. Žymėta DNR hidrolizuota R.BamHI ir R.PagI ir frakcionuota agaroziniame gelyje. **A** (*kairėje*) – vaizdas, gautas nuskanavus gelį 635 nm lazeriu, žadinančiu Cy5 fluorescenciją. **A** (*dešinėje*) – tas pats gelis nudažytas etidžio bromidu ir nuskanuotas 480 nm lazeriu. **B** – į skirtingo ilgio DNR fragmentus įjungtos žymės kiekis įvertintas densitometriškai ir palygintas su teoriniu, apskaičiuotu pagal fragmente esančių GCG taikinių skaičių (nurodytas skliausteliuose).

3.1.7. Apibendrinimas

Dviejų vandenilinių jungčių tarp baltymo ir DNR pašalinimas hibridinėje MTazėje L2Bsp stipriai sumažino jos giminingumą DNR. Tai pasireiškė pablogėjusiu jos katalitiniu efektyvumu, ~1000 kartų išaugusia K_M^{DNR} ir nesugebėjimu sudaryti kovalentinio komplekso su 5-fluorocitoziną turinčia DNR bei formuoti stabilus PAAG detektuojamo baltymo-DNR komplekso. Nors tokie pokyčiai atrodo neišvengiami konstruojant mažesnio specifškumo (trumpesnę seką atpažįstantį) baltymą, prarastus specifinius kontaktus su DNR bazėmis galima kompensuoti stiprinant nespecifinius kontaktus su DNR fosfodiesteriniu karkasu. Tai labai gerai iliustruoja faktas, kad visų iš kombinatorinės bibliotekos atrinktų MTazių Kilpoje-2 randamas Arg. Nors neįmanoma tiksliai nuspėti sutrumpintos Kilpos-2 konformacijos, bet neabejotina, kad šis Arg yra netoli DNR fosfodiesterinio karkaso, ir tai

greičiausiai lemia ~100 kartų mažesnę MTazių Δ L2-6 ir Δ L2-9 K_M^{DNR} negu L2Bsp. Įdomu, kad efektyviausioje pakeisto specifiškumo MTazėje Δ L2-14 aptiktas papildomas pakeitimas už kombinatorinio rajono ribų, lemiantis keletą kartų padidėjusią k_{cat} ir sumažėjusią K_M^{DNR} . Ši mutacija – IX konservatyviame motyve esančio Lys273 pakeitimas į Arg. M.HhaI-DNR komplekso erdvinėje struktūroje matyti, kad Lys273 nukreiptas į DNR pusę, tačiau jo teigiamą krūvį turinti aminogrupė nutolusi nuo DNR fosfodiesterinio karkaso ~5 Å. Tikėtina, kad Arg atveju dėl ilgesnės šoninės grandinės teigiamas krūvis gali labiau priartėti prie DNR, ir tai gali lemti didesnę mutantinės MTazės giminingumą DNR. Kitose C5-MTazėse šioje konservatyvioje pozicijoje randamas tiek Lys, tiek Arg (**1.5 pav.**).

Įdomu, kad visoms pakeisto specifiškumo MTazėms būdinga ne tik didesnė negu WT M.HhaI K_M^{DNR} , bet ir didesnė K_M^{AdoMet} . Didesnę K_M^{AdoMet} gali lemti uždaros katalitinės kilpos konformacijos destabilizavimas ir/arba kofaktoriaus surišimo centro struktūros pokyčiai, pagreitinantys kofaktoriaus disociaciją iš trinario reakcijos produktų komplekso. Iš erdvinės struktūros matyti, kad išorinę kofaktoriaus surišimo kišenės sieną sudarančio Tyr254 pakeitimas į Ser arba Thr atveria platesnį kanalą iš jos į išorę ir taip gali palengvinti kofaktoriaus disociaciją. Be to šios mutacijos suardo hidrofobinę sąveiką tarp Tyr254 ir Glu82, stabilizuojančią katalitinę kilpą uždaroje konformacijoje. Pažymėtina, kad po atrankos K_M^{AdoMet} pagerėjo nedaug, tik ~4 kartus lyginat su L2Bsp. Taigi arba tolimesnis giminingumo AdoMet pagerinimas nėra įmanomas, sutrumpinus Kilpą-2, arba reikia atlikti atranką kitokiomis sąlygomis – modifikuojant kitas baltymo dalis ir/arba selekciją atliekant esant mažesnei AdoMet koncentracijai. Svarbu pažymėti, kad esamas Δ L2-MTazių giminingumas AdoMet yra visiškai pakankamas praktiniam MTazių taikymui. Be to šie kofaktoriaus surišimo kišenės struktūriniai pokyčiai pagerina Δ L2-MTazių aktyvumą su AdoMet analogais ir suteikia galimybę jas panaudoti gamtinių molekulių žymėjimui specifinėse sekose fluorescuojančiomis arba giminingumo žymėmis.

Greta mažo L2Bsp katalitinio efektyvumo, buvo stebimas ir specifiškumo išsigimimas: ši MTazė metilino ne tik GCG, bet ir GC[A/C/T] sekas. Taigi Kilpos-2 pakeitimas šioje MTazėje pakenkė ir Kilpos-1 funkcijai. Trečiosios bazių poros atpažinimą didžiaja dalimi lemia Kilpos-1 sudaromi kontaktai, išskyrus vieną vandenilinę jungtį, kurią per vandens molekulę sudaro Ser252 šoninė grandinė su trečiojo guanino (G3) N7 atomu (**3.1 pav. C**). Gali būti, kad Ser252 pakeitimas į Thr hibridinėje MTazėje L2Bsp pažeidžia šią sąveiką. Nors ši vandenilinė jungtis neleidžia atskirti guanino nuo adenino, bet ji gali būti svarbi teisingam trečiosios bazių poros orientavimui MTazės atžvilgiu, taip padėdama Gln237 atpažinti šios bazių poros citoziną (C3). Kita vertus, Kilpos-2 pakeitimai gali įtakoti greta esančių baltymo regionų struktūrą, kas savo ruožtu gali pažeisti Kilpos-1 sąveiką su DNR. Dėl šių priežasčių konstruojant efektyvią GCG atpažįstančią MTazę buvo būtinas sutrumpintos Kilpos-2 amr. sekos optimizavimas.

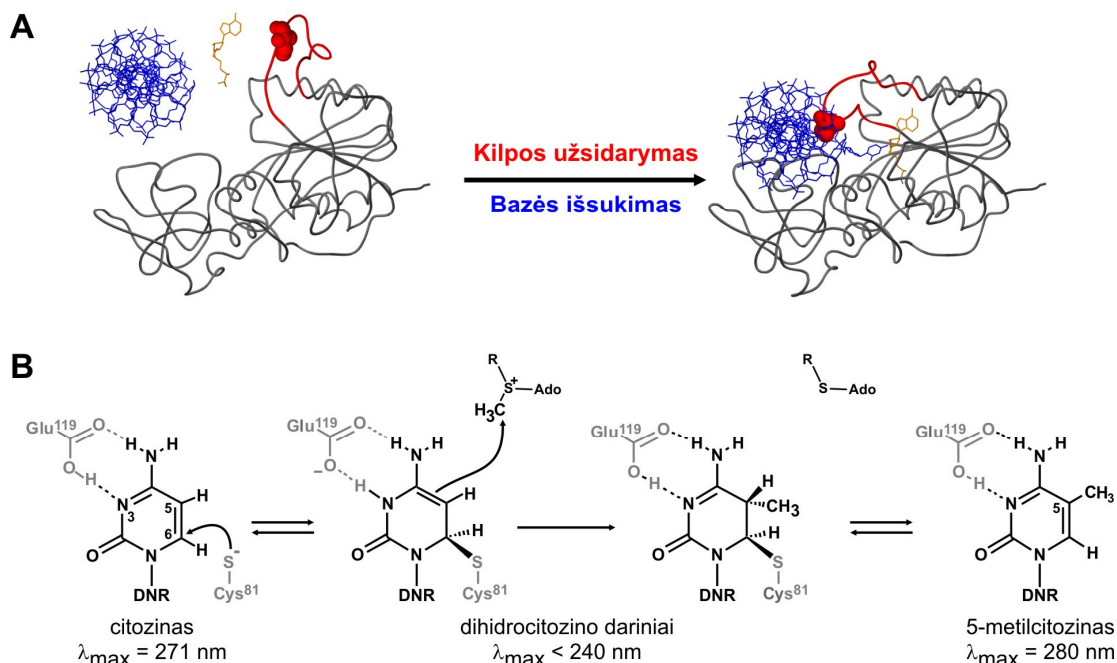
Δ L2-MTazių specifiškumas GCG unikalus, kol kas nežinoma gamtinių MTazių, metilinančių šį taikinį. Kadangi GCG – asimetrinė DNR seka, jos metilinimas sukuria hemimetilintus CG taikinius, kurie yra metilimą palaikančių eukariotinių DNR MTazių taikiniai (Goll ir Bestor, 2005). MTazės L2Bsp *in vivo* metilinta plazmidinė DNR buvo sėkmingai panaudota pelės MTazės Dnmt1 procesyvumo tyrimams (Vilkaitis ir kt., 2005). Taigi skirtingai nuo neseniai aprašytų pakeisto specifiškumo M.SinI (Timar ir kt., 2004) ir M.HaeIII (Cohen ir kt., 2004) mutantų, Δ L2-MTazės turi realią galimybę tapti įrankiais tiriant mechanistinius DNR metilinimo eukariotuose aspektus. Nors geriausias iš sukonstruotų MTazių katalitinis efektyvumas ($k_{cat}/K_M^{DNR} = 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 10 kartų mažesnis negu WT M.HhaI, jis palyginamas su kai kurių kitų C5-MTazių katalitiniu efektyvumu: M.HaeIII katalitinis efektyvumas $3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Cohen ir kt., 2004), M.SinI – $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Timar ir kt., 2004), M.SssI – 10^4 - $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Subach ir kt., 2006; Rathert ir kt., 2007). Pažymėtina, kad M.SssI plačiai naudojama metilintos DNR gavimui epigenetiniuose ir biocheminiuose tyrimuose. Δ L2-MTazių specifiškumas *in vitro* taip pat palyginamas su keliomis charakterizuotomis laukinio tipo

C5-MTazėmis (Cohen ir kt., 2002; Timar ir kt., 2004; Youngblood ir kt., 2006). Metilinimui naudojant nano- - mikromolines fermento koncentracijas, specifinių taikinių metilinimo efektyvumas paprastai apie dviem eilėmis didesnis negu nekanoninių taikinių metilinimas. Tokiomis sąlygomis, kai MTazės koncentracija viršija K_M^{DNR} , metilinimo specifiškumą didžiają dalimi lemia ne giminingumas DNR, o k_{cat} . Taigi MTazės specifiškumas, apibrėžiamas kaip specifinių ir nespecifinių taikinių k_{cat}/K_M^{DNR} santykis nėra labai informatyvus.

Apibendrinant, galima teigti, kad šiame darbe pirmą kartą aprašomas dvejopas DNR citozino-5 MTazės specifiškumo pakeitimas baltymų inžinerijos metodais. Sukonstruota GCG taikinį metilinanti MTazė gali naudoti sintetinius AdoMet analogus ir prijungti ilgesnes ir chemiškai įvairesnes negu metilgrupė grupes prie DNR.

3.2. Greitų baltymo ir DNR konformacinių virsmų M.HhaI katalizuojamoje reakcijoje tyrimas

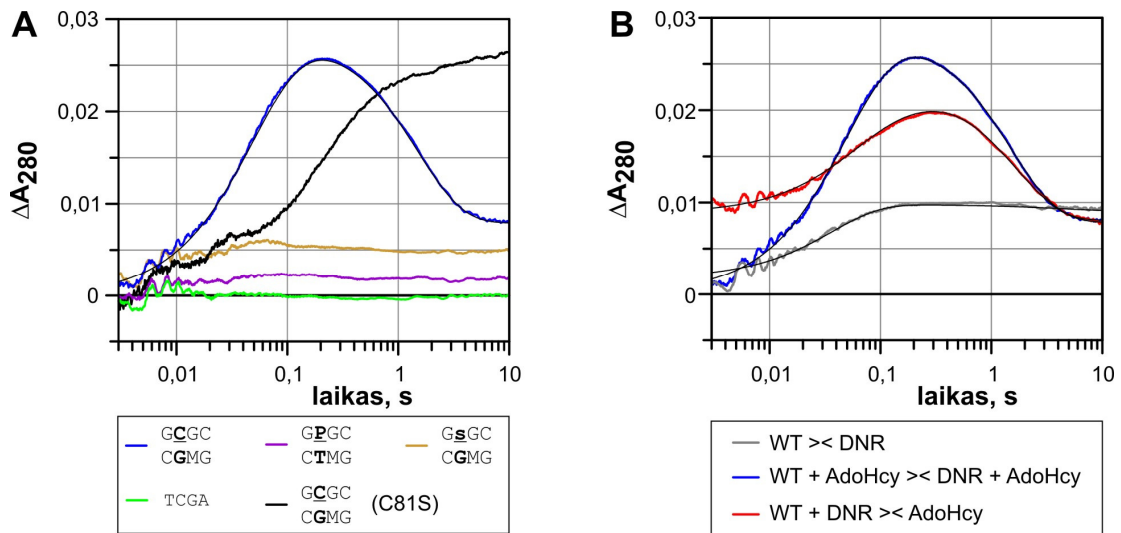
3.2.1. Tiesioginis citozino išsukimo ir kovalentinės aktyvacijos stebėjimas realiu laiku



3.13 paveikslas. Konformaciniai virsmai ir citozino kovalentinė aktyvacija M.HhaI katalizuojamoje reakcijoje. **A** – baltymo ir DNR konformacijos pokyčiai: M.HhaI katalitinė kilpa užsidaro apglėbdama surištą DNR ir priartindama katalitinį nukleofilą Cys81 prie išsukto metilinamo citozino, kuris išsukamas iš DNR dvigubos spiralės į aktyvų centrą. M.HhaI pilka, katalitinė kilpa (81-100 amr.) raudona, Ile86 parodytas kaip tūrinis modelis (*spacefill*), DNR mėlyna, AdoHcy geltonas. Paveiksle vaizduojamos M.HhaI-AdoMet ir M.HhaI-DNR-AdoHcy kompleksų struktūros (PDB kodai 1hmy ir 3mht) (Cheng ir kt., 1993; O'Gara ir kt., 1996a). **B** – citozino kovalentinė aktyvacija aktyviame centre ir ją lydintys bazės UV absorbcijos pokyčiai.

Metilinamo citozino išsukimas M.HhaI katalizuojamos reakcijos metu lokaliai, tačiau stipriai deformuoja DNR: išsuktas citozinas netenka visų sanklodos sąveikų, o abipus jo toje pačioje grandinėje esantys guaninai praranda sanklodą iš vienos žiedo pusės (Klimašauskas ir kt., 1994). Vėliau, vykstant kovalentinei katalizei, Cys81 prisijungimas suardo citozino žiedo aromatinę sistemą ir tai lemia chromoforo išnykimą: λ_{\max} pasislenka nuo citozinui būdingo 270 nm iki 225-240 nm, būdingo 5,6-dihidrocitozino dariniams (Skaric ir kt., 1974; Sverdlov ir kt., 1974; Ulanov ir kt., 1976)

(3.13 pav. B). Jeigu šių lokalių struktūrinių virsmų sukelti absorbcijos pokyčiai yra pakankamai dideli, kad juos būtų galima patikimai fiksuoti baltymo ir oligonukleotido absorbcijos fone, M.HhaI katalizuojamą reakciją galima būtų sekti stebint absorbcijos kitimą laike. Tai suteiktų galimybę stebėti iki šiol tiesiogiai nematomas katalitinio ciklo stadijas – citozino išsukimą ir kovalentinę aktyvaciją.



3.14 paveikslas. M.HhaI sąveiką su DNR lydintys UV absorbcijos pokyčiai. Reakcijose buvo 3 μM M.HhaI, 2,5 μM DNR dvigrandžio oligonukleotido (25 bp) ir 100 μM AdoHcy. **A** – M.HhaI sąveika su skirtingais DNR substratais: mėlyna – GCGC/GMGC (natyvus taikiny), geltona – GsGC/GMGC (bebazis taikiny), žalia – TCGA (DNR be M.HhaI taikinio), violetinė – GPGC/GMTC (DNR su neišardoma taikinio bazių pora); juoda – M.HhaI C81S reakcija su GCGC/GMGC (natyviu taikiniu), esant reakcijos mišinyje AdoHcy. **B** – reagentų maišymo tvarkos įtaka reakcijai: pilka – M.HhaI greitai sumaišyta su GCGC/GMGC (be kofaktoriaus); mėlyna – M.HhaI sumaišyta su GCGC/GMGC esant reakcijos mišinyje AdoHcy; raudona – M.HhaI sumaišyta su GCGC/GMGC, o nusistovėjęs pusiausvyrai greitai sumaišyta su AdoHcy. Šių reakcijų kinetiniai parametrai pateikti 3.2 lentelėje. Plona juoda linija vaizduoja duomenų aproksimaciją dviejų arba trijų eksponentinių lygtimis.

Kadangi minėti virsmai yra labai greiti ($\geq 0,1 \text{ s}^{-1}$), darbo metu buvo naudojama sustabdytos tėkmės aparatūra (*stopped-flow*) (2.4 pav.), suteikianti galimybę pradėti absorbcijos ir/arba fluorescencijos matavimus praėjus ~ 2 ms nuo reakcijos pradžios. Greitai sumaišius M.HhaI perteklių (3 μM) su hemimetilintą taikinį turinčiu oligonukleotidu (2,5 μM) ir esant reakcijos

mišinyje AdoHcy (100 μ M), buvo patikimai registruojamas 25-30 mAU absorbcijos (280 nm) augimas 1 AU bendros tirpalo absorbcijos fone (optinis kelias 10 mm) (**3.14 pav. A**). Toliau vykstant reakcijai, A_{280} augimą lydėjo \sim 20 mAU amplitudės absorbcijos sumažėjimas. Kontroliniuose eksperimentuose su bebaziu taikiniu užfiksuotas ženkliai mažesnis absorbcijos augimas (3-6 mAU); absorbcijos pokytis visai nestebėtas reakcijoje su taikinio vietoje P:T bazių porą turinčia DNR (ankstesnių tyrimų metu buvo parodyta, kad M.HhaI šios bazių poros neišardo (Daujotytė ir kt., 2004)). Didžiausia šio pokyčio amplitudė buvo registruojama matuojant 280-290 nm bangoilgio šviesos absorbciją. Labai panašus reakcijos profilis stebėtas triptofanų neturinčio M.HhaI mutanto W41F katalizuojamoje reakcijoje (**3.16 pav.**), kas rodo, kad absorbcijos pokytis nėra susijęs su vienintelio M.HhaI triptofano absorbcijos pokyčiais. Visi šie rezultatai rodo, kad absorbcijos augimą sukelia metilinamo citozino išsukimas iš DNR spiralės.

3.2 lentelė. Citozino išsukimo ir kovalentinės aktyvacijos kinetiniai parametrai WT M.HhaI katalizuojamoje reakcijoje.

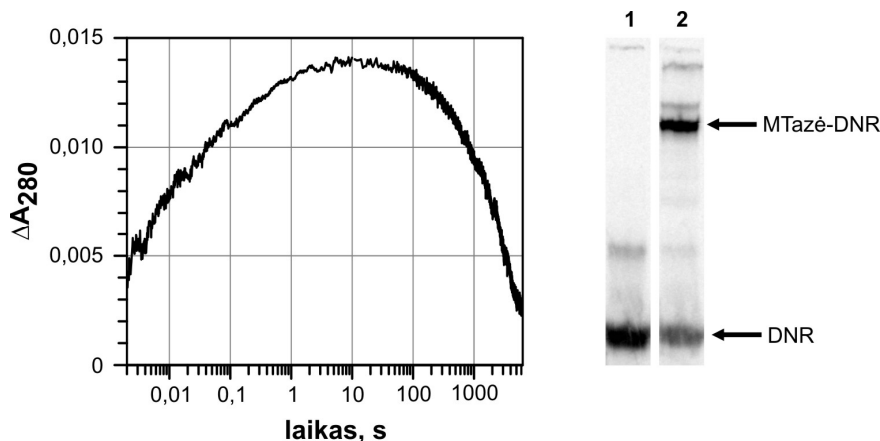
Reakcija	HhaI \times DNR		HhaI + AdoHcy \times DNR + AdoHcy		HhaI + DNR \times AdoHcy	
	Greitis, s^{-1}	Amplitudė, mAU	Greitis, s^{-1}	Amplitudė, mAU	Greitis, s^{-1}	Amplitudė, mAU
Citozino išsukimas	$27,4 \pm 0,3$	$8,3 \pm 0,04$	$19,1 \pm 0,1$	$28 \pm 0,1$	$19,7 \pm 0,9$	$7,6 \pm 0,5$
	-	-	$2,5 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,4$	$7,1 \pm 0,4$
Kovalentinė jungtis	$0,23 \pm 0,06$	$-0,7 \pm 0,07$	$0,71 \pm 0,003$	$-23 \pm 0,1$	$0,60 \pm 0,01$	$-16 \pm 0,1$

Reakcijos atliktos naudojant 3 μ M WT M.HhaI, 2,5 μ M GCGC/GMGC (kanoninis taikinis) ir 100 μ M kofaktorių. Atskirai paruošti ir greitai sustabdytos tėkmės aparaturoje sumaišyti reagentai atskirti simboliu „ \times ““. Kinetiniai parametrai buvo gauti aproksimuojant **3.14 pav. B** pateiktus duomenis dviejų arba trijų eksponenčių lygtimis. Parametrų vertės pateikiamos su standartinė aproksimacijos paklaida.

Iki šiol nebuvo nustatyta, kokio dydžio hiperchrominį efektą lemia vieno nukleotido išsukimas iš DNR. Atsižvelgiant į $\epsilon_{280} = 7200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 2,5 μ M citozino monofosfato tirpalo absorbcija turėtų būti 19 mAU. Remiantis artimiausio kaimyno (*nearest neighbor*) metodu, naudojamu DNR sugerties koeficientams apskaičiuoti, vieno nukleotido indėlis į DNR grandinės

absorbciją (260 nm) sudaro 60-80% laisvo nukleotido absorbcijos. Taigi stebimas absorbcijos padidėjimas (25-30 mAU) yra 2-3 kartus didesnis negu galima būtų tikėtis, jeigu hiperchrominį efektą lemtų vien pakitusi išsukto citozino absorbcija. Tokį didelį hiperchrominį efektą galima paaiškinti tuo, kad du kaimyniniai guaninai taip pat netenka π - π sąveikos iš vienos žiedo pusės.

Norint įsitikinti, koks procesas lemia absorbcijos mažėjimą vėlesniame reakcijos etape, buvo atlikta reakcija su M.HhaI katalitinio cisteino mutantu C81S. Šis baltymas stipriai suriša DNR, tačiau dėl stipriai pažeisto sugebėjimo sudaryti kovalentinę jungtį su metilnamu citozinu pasižymi tik pėdsakiniu metiltransferaziniu aktyvumu (Mi ir Roberts, 1993). Kaip ir tikėtasi, C81S reakcijoje su hemimetilinta DNR ir AdoHcy stebėtas absorbcijos augimas dėl citozino išsukimo, tačiau vėlesnis absorbcijos mažėjimas neregistruotas (**3.14 pav. A**). M.HhaI reakcijoje su hemimetilinta DNR ir AdoHcy stebimo absorbcijos sumažėjimo amplitudė (16-20 mAU) gerai atitinka vieno citozino absorbcijos išnykimą, skaičiuojant pagal laisvo nukleotido sugerties koeficientą. Panašios amplitudės, tačiau žymiai lėtesnis ($0,0003 \text{ s}^{-1}$) absorbcijos mažėjimas stebėtas kontrolinėje M.HhaI reakcijoje su 5-fluorocitoziną turinčia DNR ir AdoMet (**3.15 pav.**). Šiuo atveju vyksta negrįžtamas chromoforo sunaikinimas, nes susidarius kovalentinei jungčiai ir įvykus metilgrupės pernašai, neįmanoma fluoro β -eliminacija (Osterman ir kt., 1988). Žinoma, kad M.HhaI katalizuojamas metilgrupės prijungimas prie tokios DNR vyksta ~ 400 kartų lėčiau negu citozino metilinimas (Vilkaitis ir kt., 2001). Šioje reakcijoje stebimą absorbcijos mažėjimą gerai aprašė vienos eksponentės lygtis, o apskaičiuota pokyčio amplitudė (13 mAU) atitiko $\sim 65\%$ chromoforo išnykimą. (Įvertinimui naudotas 5-fluorocitozino sugerties koeficientas $\epsilon_{280} = 8000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Tanaka ir kt., 1981)). Kai tokios pačios sudėties reakcija buvo atlikta naudojant ^{33}P žymėtą DNR ir reakcijos produktai išfrakcionuoti denatūruojančiame PAA gelyje, $\sim 70\%$ DNR buvo aptikta denatūracijai atspariame kovalentiniame MTazės-DNR komplekse. Taigi gauti rezultatai patvirtino, kad stebimas absorbcijos mažėjimas iš tiesų atitinka kovalentinio komplekso tarp MTazės ir metilnamo citozino susidarymą.



3.15 paveikslas. M.HhaI sąveika su 5-fluorocitozina turinčia DNR. 3 μM M.HhaI sumaišyta su 2,5 μM GFGC/GMGC, esant reakcijos mišinyje 100 μM AdoMet. Kairėje – A_{280} kitimas laike, užregistruotas naudojant sustabdytos tėkmės aparatūrą; dešinėje – analogiška reakcija, atlikta su ^{33}P žymėta DNR (~27 val.) ir reakcijos produktai išfrakcionuoti PAA gelyje su NDS. DNR vizualizuota *PhoshoImager* sistema. **1** – DNR inkubuota be baltymo, **2** – reakcija su baltymu.

Susidarant binariniam kompleksui tarp M.HhaI ir DNR taip pat stebimas absorbcijos augimas, tačiau jo amplitudė ~4 kartus mažesnė, negu esant reakcijos mišinyje AdoHcy (**3.14 pav. B**, **3.2 lentelė**). Jeigu AdoHcy pridedama prie MTazės-DNR komplekso nusistojus pusiausvyrai, stebimas tolesnis absorbcijos augimas iki reakcijoje su AdoHcy stebimo lygio. Tai rodo, kad binariniam M.HhaI-DNR kompleksui būdinga greita pusiausvyra, kuomet $\sim 1/3$ citozino yra išsukta iš DNR ir surišta aktyviame centre. Šie rezultatai gerai atitinka BMR rezultatus apie dinamišką M.HhaI-DNR komplekso prigimtį (Klimašauskas ir kt., 1998) bei M.HhaI katalizuojamą greitą protono citozino 5-oje padėtyje apkeitimą deuteriu, kai reakcijos mišinyje nėra kofaktoriaus (Wu ir Santi, 1987).

Apibendrinant galima teigti, kad stebint absorbcijos kitimą galima tiesiogiai realiu laiku stebėti M.HhaI katalizuojamą citozino išsukimą ir kovalentinę aktyvaciją natūralioje DNR, nenaudojant dirbtinių bazės analogų.

3.2.2. Citozino išsukimo ir katalitinės kilpos užsidarymo stebėjimas vienu metu

Kartu su metilino citozino išsukimu vyksta dideli M.HhaI konformacijos pokyčiai (**3.13 pav. A**): katalitinė kilpa užsidaro, apglėbdama

surištą DNR ir fiksuodama išsuktą citoziną aktyviame centre. Taip katalitinis Cys81 priartinamas prie metilinamo citozino ir susiformuoja aktyvus centras (Klimašauskas ir kt., 1994). Baltymo konformaciniai pokyčiai dažnai sekami matuojant triptofano fluorescenciją, kurią stipriai įtakoja Trp apsuptis. M.HhaI – dėkingas baltymas tokiems matavimas, kadangi jame yra vienintelis triptofanas (W41) kofaktoriaus surišimo kišenėje. Jis nors ir dalyvauja kofaktoriaus surišime, bet nėra kritiškas fermentiniam aktyvumui ir baltymo struktūrai (Merkienė ir Klimašauskas, 2005; Estabrook ir Reich, 2006; Estabrook ir kt., 2009). M.HhaI konformacijos pokyčiams matuoti buvo panaudotas mutantinis baltymas W41F/I86W, kuriame Ile86 iš katalitinės kilpos buvo pakeistas į triptofaną, o Trp41 iš kofaktoriaus surišimo kišenės pakeistas į fenilalaniną.

3.3 lentelė. WT M.HhaI ir W41F/I86W kinetiniai parametrai

MTazė	$K_M^{AdoMet(37^\circ C)}$, μM	$k_{cat}(37^\circ C)$, s^{-1}	$k_{chem}(25^\circ C)$, s^{-1}
WT	$0,035^a \pm 0,003$	$0,018^a \pm 0,001$	$0,12 \pm 0,004$
W41F/I86W	$2,7^a \pm 0,4$	$0,056^a \pm 0,002$	$0,09 \pm 0,004$

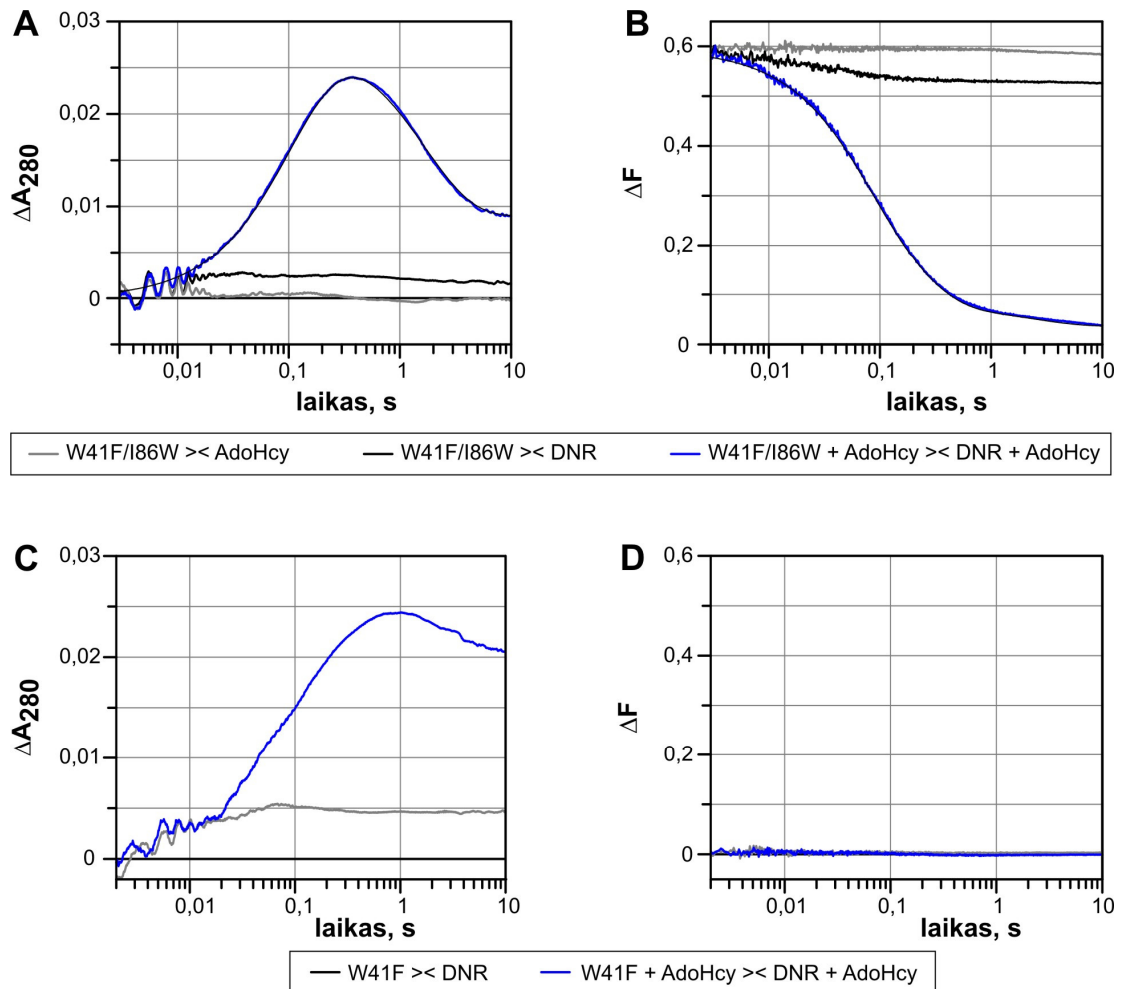
^a išmatavo dr. E. Merkienė.

Stacionarios kinetikos parametrai nustatyti reakcijose su poli[dG-dC]·poli[dG-dC], o k_{chem} – naudojant GCGC/GMGC dvigrandį oligonukleotidą.

Savo katalitiniiais parametrais šis mutantas buvo labai panašus į anksčiau aprašytą W41F mutantą (Merkienė ir Klimašauskas, 2005), ir nuo WT M.HhaI labiausiai skyrėsi mažesniu giminingumu kofaktoriui (**3.3 lentelė**). Analogiškos savybės buvo būdingos ir anksčiau aprašytiems vieną triptofaną turintiems M.HhaI mutantams W41F/K91F bei W41F/E94W (Estabrook ir Reich, 2006). Mažesnę šių mutantinių baltymų giminingumą AdoMet ir AdoHcy galima kompensuoti padidinant kofaktoriaus koncentraciją reakcijos mišinyje.

Sumaišius W41F/I86W, GCGC/GMGC oligonukleotidą ir AdoHcy buvo užfiksuotas stiprus fluorescencijos (žadinimas 280 nm, emisija >335 nm) sumažėjimas, (**3.16 pav. B**). Reakcijoje su GCGC/GMGC ir AdoMet pradinį

fluorescencijos mažėjimą sekė fluorescencijos augimas (**3.22 pav. B**). Reakcijose be kofaktoriaus arba be DNR fluorescencijos pokytis nestebėtas arba jo amplitudė buvo labai maža. Taip pat fluorescencijos pokyčiai nestebėti triptofanų neturinčio M.HhaI W41F reakcijose (**3.16 pav. D**).



3.16 paveikslas. M.HhaI W41F/I86W katalizuojamas citozino išsukimas ir katalitinės kilpos užsidarymas. 3 μM W41F/I86W sumaišyta su 100 μM AdoHcy (pilka), 2,5 μM GCGC/GMGC (juoda) arba 3 μM W41F/I86W sumaišyta su 2,5 μM GCGC/GMGC esant reakcijos mišinyje 100 μM AdoHcy (mėlyna). **A** – absorbcijos pokytis, **B** – fluorescencijos pokytis. Iš šių duomenų apskaičiuoti kinetiniai parametrai pateikti **3.4 lentelėje**. Plona juoda linija vaizduoja globalią absorbcijos ir fluorescencijos kreivių aproksimaciją trijų eksponenčių lygtimi su dviem bendromis greičio konstantomis. **C**, **D** – 3 μM W41F sumaišyta su 2,5 μM GCGC/GMGC be kofaktoriaus (pilka) arba esant reakcijos mišinyje 100 μM AdoHcy (mėlyna). **C** – absorbcijos pokytis, **D** – fluorescencijos pokytis.

Taigi galima daryti išvadą, kad fluorescencijos pokyčius W41F/I86W katalizuojamose reakcijose sukelia Trp86 aplinkos pasikeitimas: fluorescencija

gesinama, kai užsidarius katalitinei kilpai Trp86 priartėja prie DNR mažojo griovio ir atsiduria hidrofobiškesnėje aplinkoje (Estabrook ir kt., 2009). Kaip ir anksčiau aprašytų M.HhaI mutantų W41F/K91W ir W41F/E94W atveju, Trp86 fluorescencijos pokyčiai gali būti naudojami katalitinės kilpos konformacijos pokyčiams stebėti. Nors mutantinis baltymas šiek tiek skiriasi nuo WT M.HhaI savo katalitiniais parametrais, tačiau suteikia galimybę realiu laiku stebėti katalitinės kilpos konformacijos pokyčius (registruojant fluorescenciją) ir metilnamo citozino išsukimą (registruojant absorbciją) tame pačiame mėginyje. Tai įmanoma todėl, kad ir absorbcijai, ir triptofano fluorescencijos žadinimui buvo naudojama to paties bangoilgio (280 nm) šviesa.

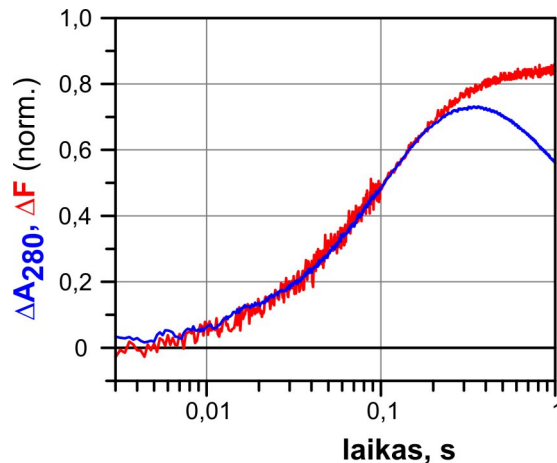
W41F/I86W reakcijoje su GCGC/GMGC ir 100 μ M AdoHcy, absorbcijos profilis buvo labai panašus į gautąjį su WT M.HhaI (**3.16 pav. A**). Pirmoji fazė, atitinkanti citozino išsukimą, buvo šiek tiek lėtesnė negu WT atveju (atitinkamai 9 s⁻¹ ir 19 s⁻¹) (**3.4** ir **3.2 lentelės**), o kovalentinės jungties susidarymo greitis abiem atvejais sutapo (0,64 ir 0,71 s⁻¹). Globali absorbcijos ir fluorescencijos kreivių analizė parodė, kad abu signalus gerai aprašo trijų eksponenčių lygtis su dviem bendromis greičio konstantomis, kas rodo, kad citozinas išsukamas ir katalitinė kilpa užsidaro sinchroniškai. Citozino ir kilpos judėjimo sinchroniškumą gerai iliustruoja **3.17 pav.**, kuriame pavaizduoti vienu metu išmatuoti fluorescencijos ir absorbcijos signalai. Trečioji eksponentė, aprašanti kovalentinės jungties susidarymą absorbcijos signale, nebuvo visiškai sinchroniška su fluorescencijos signalu (**3.4 lentelė**). Tačiau fluorescencijoje jos amplitudė buvo labai nedidelė, greitis ir amplitudė variavo skirtinguose baltymo preparatuose, taigi jos prigimtis toliau tyrinėta nebuvo.

3.4 lentelė. Citozino išsukimo ir katalitinės kilpos užsidarymo kinetiniai parametrai W41F/I86W katalizuojamoje reakcijoje.

Reakcija	Taikinio bazių pora C:G (3.16 pav.)		Taikinio bazių pora C:T (3.20 pav.)			
	12,5		8,65			
Parametrai	Greitis, s ⁻¹	Amplitudė, santyk. vnt.		Greitis, s ⁻¹	Amplitudė, santyk. vnt.	
		absorbėja	fluorescencija		absorbėja	fluorescencija
Bazės išsukimas/ kilpos užsidarymas	19,0 ± 1,1 6,9 ± 0,2	0,26 ± 0,03 0,81 ± 0,03	-0,32 ± 0,03 -0,57 ± 0,03	63 ± 2 19,6 ± 0,6	0,53 ± 0,02 0,44 ± 0,02	-0,56 ± 0,02 -0,38 ± 0,02
Kovalentinė jungtis	0,64 ± 0,01/ 0,76 ± 0,05*	-0,74 ± 0,005	-0,10 ± 0,004*	0,60 ± 0,004/ 0,68 ± 0,06*	0,70 ± 0,001	-0,05 ± 0,001*

Atliekant reakcijas greitai sumaišyta 3 μM W41F/I86W su 2,5 μM DNR, esant abiejuose reakcijos mišiniuose 100 μM AdoHcy. Kinetiniai parametrai buvo gauti globaliai analizuojant normuotus absorbcijos ir fluorescencijos signalus. Parametru vertės pateikiamos su standartine aproksimacijos paklaida.

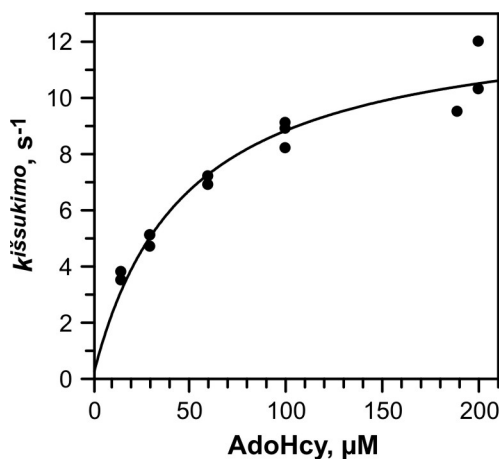
*nepaaiškintas fluorescencijos pokytis.



3.17 paveikslas. W41F/I86W katalizuojamoje reakcijoje citozinas išsukamas ir katalitinė kilpa užsidaro sinchroniškai. 3 μM W41F/I86W sumaišyta su 2,5 μM GCGC/GMGC esant reakcijos mišinyje 100 μM AdoHcy, ir vienu metu išmatuoti absorbcijos (mėlynas) ir fluorescencijos (raudonas) signalai. Išmatuotos kreivės normuotos ir aiškumo dėlei pakeistas fluorescencijos signalo poliškumas.

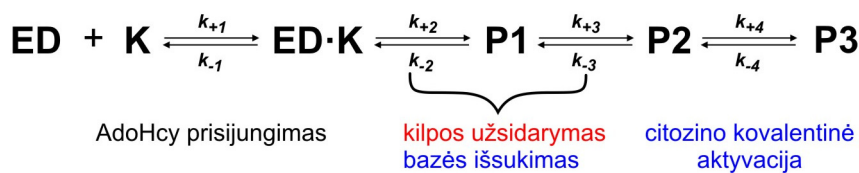
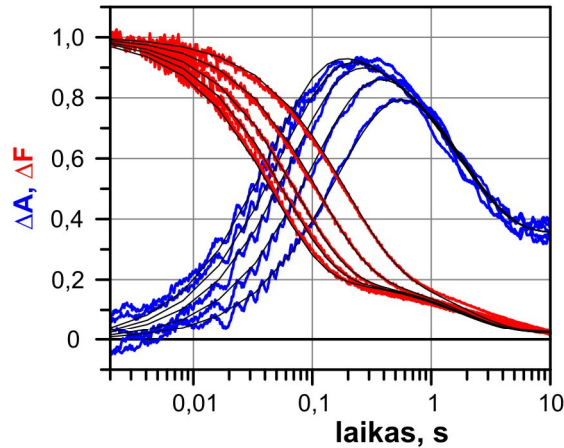
Iš BMR matavimų žinoma, kad AdoHcy stabilizuoja užsidariusią katalitinę kilpą (Klimašauskas ir kt., 1998), o W41F/I86W pasižymi mažesniu giminingumu kofaktoriui negu WT M.HhaI. Todėl mažesnis bazės išsukimo greitis galėjo liudyti apie nepilną komplekso W41F/I86W-DNR įsotinimą kofaktoriais. Iš tiesų, keičiant AdoHcy koncentraciją 15-200 μM ribose citozino išsukimo greitis didėjo (**3.18 pav.**). Šio greičio priklausomybę nuo AdoHcy koncentracijos gerai aprašė hiperbolės lygtis; pagal ją apskaičiuotas maksimalus citozino išsukimo greitis (13 s^{-1}) buvo labai artimas WT. Iš šios analizės nustatyta disociacijos konstanta $K_D^{\text{AdoHcy(išmatuota)}}$ ($\sim 50 \mu\text{M}$), žymiai didesnė negu tikėtina trinario komplekso MTazė-DNR-AdoHcy disociacijos konstanta ($\geq K_M^{\text{AdoMet}} = 1,3 \mu\text{M}$). Taigi $K_D^{\text{AdoHcy(išmatuota)}}$ nėra tikroji trinario komplekso disociacijos konstanta, bet aprašo reakcijos metu trumpai gyvuojantį kompleksą, kuriame dar nėra susidarę visi specifiniai kontaktai su DNR taikiniu, citozinas dar neišsuktas, o katalitinė kilpa tebėra atvira. Struktūriškai toks kompleksas turėtų panašėti į mažo giminingumo M.HhaI kompleksą su specifinio taikinio neturinčia DNR. Reakcijos metu toks kompleksas greitai izomerizuojasi virsdamas į stabilų kompaktišką kompleksą,

kuriame katalitinė kilpa užsidariusi, o citozinas išsuktas ir užrakintas aktyviame centre.



3.18 paveikslas. Citozino išsukimo greičio priklausomybė nuo AdoHcy koncentracijos W41F/I86W katalizuojamoje reakcijoje. 3 μM WT M.HhaI sumaišyta su 2,5 μM GCGC/GMGC DNR esant reakcijos mišinyje 15-200 μM AdoHcy ir, naudojant sustabdytos tėkmės aparatūrą, matuotas reakcijos mišinio absorbcijos kitimas laike. Citozino išsukimo greitis apskaičiuotas aproksimuojant gautus duomenis dviejų eksponenčių lygtimi. Citozino išsukimo greičio priklausomybė nuo AdoHcy koncentracijos aproksimuota hiperbolės lygtimi ir apskaičiuotos K_D^{AdoHcy} (išmatuota) ir $v_{max}^{(išmatuotas)}$ vertės.

Nepilnas įsotinimas kofaktoriumi leido varijuoti reakcijos greitį, keičiant AdoHcy koncentraciją, ir atlikti detalesnę kinetinę analizę. Paprasčiausias mechanizmas, gerai aprašantis absorbcijos ir fluorescencijos signalų serijas, išmatuotas esant skirtingoms AdoHcy koncentracijoms, pateiktas 3.19 pav.. Pagal šį mechanizmą citozinas išsukamas ir katalitinė kilpa užsidaro sinchroniškai, o bazės išsukimo/kilpos užsidarymo kelyje egzistuoja dvi stabilios tarpinės būsenos, kuriose katalitinė kilpa užsidariusi, o bazė išsukta iš DNR spiralės. Bandymai šiuos duomenis aprašyti sudėtingesniais kinetiniais mechanizmais (kai kilpos užsidarymas ir bazės išsukimas vyksta nesinchroniškai; arba egzistuoja kelios binarinio komplekso MTazė-DNR formos, pasižyminčios skirtingu giminingumu kofaktoriumi) gerų rezultatų nedavė. Vis dėlto negalima tvirtinti, kad šis paprasčiausias mechanizmas pilnai aprašo WT M.HhaI reakcijos mechanizmą, kadangi gali būti, kad W41F/I86W reakcijoje eksperimentiškai matomas tik vienas iš įmanomų reakcijos kelių.



3.19 paveikslas. Detali W41F/I86W ir DNR konformacinių virsmų kinetinė analizė reakcijoje su AdoHcy. 3 μM W41F/I86W ir 2,5 μM GCGC/GMGC viename švirškšte buvo greitai sumaišyti su 15-200 μM AdoHcy. **Viršuje** – normalizuotos absorbcijos (mėlynos) ir fluorescencijos kreivės (raudonos) su aproksimacija į apačioje pavaizduotą mechanizmą. **Apačioje** – minimalus mechanizmas, gerai aprašantis absorbcijos ir fluorescencijos signalų serijas. Aproksimacija atlikta programa Dynafit (versija 3.28.059) (Kuzmic, 1996). ED – binarinis kompleksas MTazė-DNR, kuriame katalitinė kilpa atvira, o metilinamas citozinas neišsuktas; ED·K – pirminis trinaris kompleksas, kuriame dar nėra susidarę visi specifiniai kontaktai su DNR taikiniu, citozinas dar neišsuktas, o katalitinė kilpa tebėra atvira; P1-P3 – tarpinės komplekso konformacijos, kuriose katalitinė kilpa uždara, o metilinamas citozinas išsuktas (P1, P2) arba išsuktas ir sudaręs kovalentinę jungtį su Cys81 (P3). Aproksimuojant gautos greičio konstantos pateiktos 3.5 lentelėje.

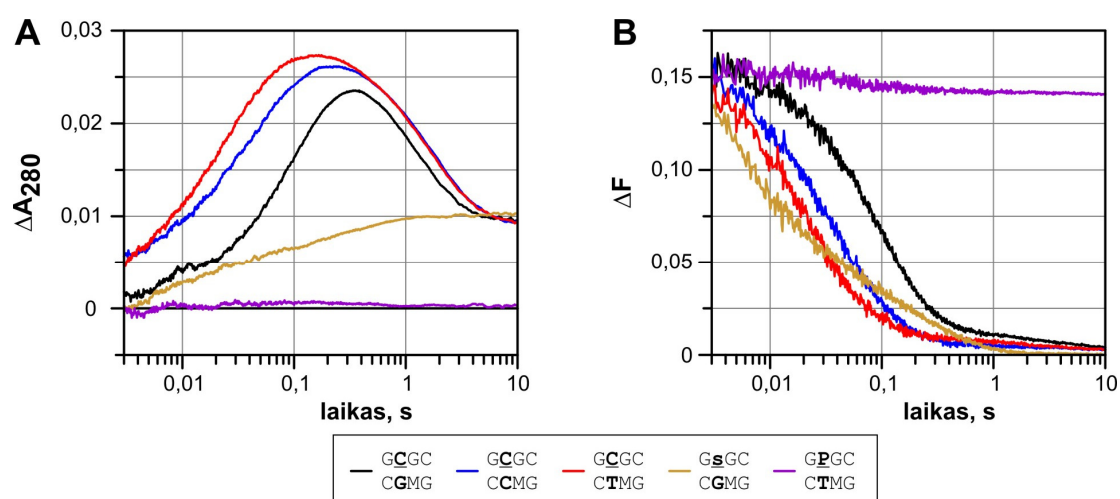
3.5 lentelė. Kinetinės konstantos, aprašančios W41F/I86W, DNR ir AdoHcy sąveiką.

	Kofaktoriaus prisijungimas	Kilpos užsidarymas/ citozino išsukimas		Kovalentinė jungtis
k_{+i}	29 μM ⁻¹ ·s ⁻¹	29 s ⁻¹	14 s ⁻¹	3,2 s ⁻¹
k_{-i}	1820 s ⁻¹	0,2 s ⁻¹	70 s ⁻¹	0,07 s ⁻¹

3.2.3. Reakcijos su klaidingai suporuotais substratais

Norint geriau suprasti ryšį tarp bazės išsukimo ir katalitinės kilpos užsidarymo buvo analizuotos W41F/I86W reakcijos su DNR substratais,

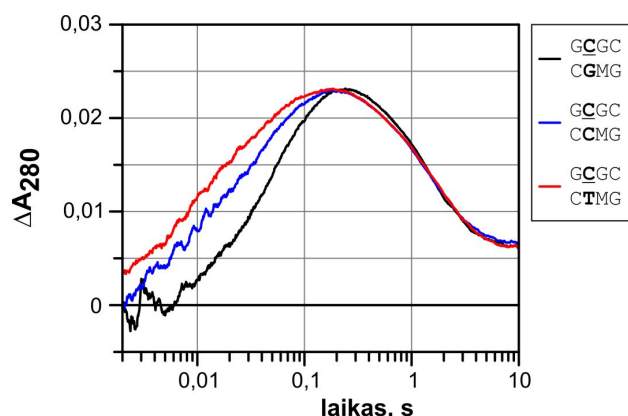
turinčiais klaidingai suporuotą bazių porą taikinio vietoje (t.y. su tokiais oligonukleotidais, kuriuose išsukamam citozinui komplementarus guaninas pakeistas citozinu arba timinu). M.HhaI stipriai suriša tokią DNR, o sąveikos stiprumas atvirkščiai koreliuoja su taikinio bazių poros stiprumu (Klimašauskas ir Roberts, 1995; Daujotyte ir kt., 2004). Tyrimų metu buvo stebėta, kaip bazių poros stiprumas įtakoja citozino išsukimo ir katalitinės kilpos užsidarymo greičius. Nustatyta, kad bazės išsukimo ir katalitinės kilpos užsidarymo greičiai didėjo silpnėjant taikinio bazių porai (**3.20 pav.**). Taigi buvo stebėta ta pati tendencija kaip M.HhaI giminingumo šiems substratams atveju. Kaip ir natyvaus substrato atveju, absorbcijos ir fluorescencijos signalai buvo gerai aprašomi trijų eksponenčių lygtimis su dviem bendromis greičio konstantomis (**3.4 lentelė**), taigi ir reakcijose su šiais substratais citozinas išsukamas ir kilpa užsidaro sinchroniškai.



3.20 paveikslas. W41F/I86W sąveika su klaidingai suporuotais DNR substratais. 3 μM W41F/I86W sumaišyta su 2,5 μM DNR esant reakcijos mišinyje 100 μM AdoHcy. **A** – absorbcija, **B** – fluorescencija.

Didžiausias katalitinės kilpos užsidarymo greitis stebėtas reakcijoje su GsGC/GMGC DNR, turinčia bebazį taikinį. M.HhaI pasižymi dideliu giminingumu tokiam DNR substratui, kuris (skirtingai negu natyvaus taikinio atveju) nepriklauso nuo kofaktoriaus buvimo (Wang ir kt., 2000). Sustabdytos tėkmės eksperimentuose išmatuoto kilpos užsidarymo greičio taip pat neįtakojo kofaktoriaus pridėjimas. Taigi nors katalitinės kilpos užsidarymas – sudėtingas

konformacinis virsmas, jis gali įvykti labai greitai ($>100\text{ s}^{-1}$), o jo greitį reakcijoje su natūraliu substratu riboja bazės išsukimo greitis. Pažymėtina, kad reakcijoje su GPGC/GMTC, kuriame esančios P:T bazių poros M.HhaI neišardo, katalitinės kilpos užsidarymas taip pat nestebimas.



3.21 paveikslas. WT M.HhaI sąveika su klaidingai suporuotais DNR substratais. 3 μM WT M.HhaI sumaišyta su 2,5 μM DNR esant reakcijos mišinyje 100 μM AdoHcy ir registruotas A_{280} kitimas.

3.6 lentelė. Kinetiniai citozino išsukimo ir kovalentinė aktyvacijos parametrai WT M.HhaI reakcijose su klaidingai suporuotais substratais

Taikinio bazių pora	C:G		C:C		C:T	
	Greitis, s^{-1}	Amplitudė, mAU	Greitis, s^{-1}	Amplitudė, mAU	Greitis, s^{-1}	Amplitudė, mAU
Bazės išsukimas	$19,5 \pm 0,7$	24 ± 1	154 ± 5	$8 \pm 0,1$	130 ± 2	$13 \pm 0,1$
	$5,5 \pm 1,1$	6 ± 1	$19,1 \pm 0,2$	$19 \pm 0,1$	$18,6 \pm 0,2$	$13 \pm 0,1$
Kovalentinė jungtis	$0,70 \pm 0,02$	$-22 \pm 0,4$	$0,64 \pm 0,004$	$-19 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,002$	$-19 \pm 0,02$

Reakcijos atliktos naudojant 3 μM WT M.HhaI, 2,5 μM DNR ir 30 μM AdoHcy. Kinetiniai parametrai buvo gauti aproksimuojant **3.21 pav.** pateiktus duomenis trijų eksponenčių lygtimi. Parametrų vertės pateikiamos su standartinė aproksimacijos paklaida.

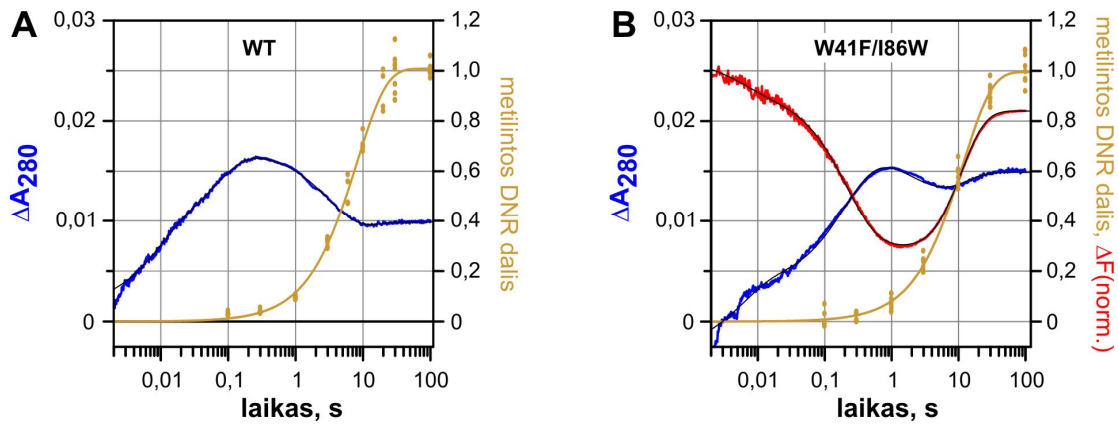
*nepaaiškintas fluorescencijos pokytis.

WT M.HhaI atveju galima buvo stebėti tik taikinio bazės išsukimą, kuris su klaidingai suporuotais DNR substratais buvo greitesnis negu su kanoniniu taikiniu (**3.21 pav.**). Šalia dominuojančio bazės išsukimo greičio, stebimo su natyvia DNR (19 s^{-1}) reakcijose su klaidingai suporuotais substratais buvo stebėtas greitesnis procesas (**3.6 lentelė**). Šie rezultatai gerai atitinka prielaidą, kad klaidingai suporuotuose DNR substratuose dalis citozino

yra mažiau stabilus DNR spiraleje ir jį fermentas gali lengviau išsukti. Tokios citozino konformacijos („iš dalies išsukto citozino“) egzistavimas galėtų pagreitinti kompaktiško trinario komplekso susidarymą.

3.2.4. Reakcija su AdoMet

Esant reakcijos mišinyje kofaktoriui AdoMet, įvyksta pilnas reakcijos ciklas, susidarant reakcijos produktams – metilintai DNR ir AdoHcy. Pradinės reakcijos stadijos – bazės išsukimas ir kovalentinė aktyvacija, – nesunkiai išskiriamos absorbcijos profilyje, kadangi vyksta panašiu greičiu ir sukelia panašios amplitudės ΔA_{280} kaip ir reakcijoje su AdoHcy (**3.22 pav.**). W41F/I86W reakcijos atveju fluorescencijos ir absorbcijos signalus gerai aprašo keturių eksponenčių lygtis su bendromis greičio konstantomis, kas rodo, kad reakcijoje su AdoMet (kaip ir su AdoHcy) katalitinė kilpa užsidaro ir citozinas išsukamas sinchroniškai (**3.7 lentelė**). Greta minėtų procesų ir absorbcijoje, ir fluorescencijoje stebimas lėtesnis ($0,1 \text{ s}^{-1}$) signalo augimas. Fluorescencijos atveju ši didelį signalo pokytį galima neabejotinai priskirti katalitinės kilpos atsidarymui po reakcijos. Absorbcijos signalo pokyčio interpretacija sudėtingesnė. Pati metilgrupės pernaša absorbcijos nekeičia. Nors citozino virsmui į 5-metilcitoziną būdingas ženklus batochrominis efektas, jis gali pasireikšti tik atsistačius žiedo aromatinei sistemai po β -eliminacijos, taigi matoma būtų tik pastaroji stadija. Tačiau esant didelei AdoMet koncentracijai, 5-metilcitozinas išstumiamas iš katalitinio centro ir grįžta atgal į DNR dvigrandę spiralę (Estabrook ir kt., 2009), sukeldamas hipochrominį efektą, beveik visai panaikinantį absorbcijos skirtumą dėl C virsmo į 5mC. Todėl registruojamas tik labai mažas, nuo AdoMet koncentracijos priklausantis A_{280} pokytis (**3.23 pav.**). Šio virsmo greitis (**3.7 lentelė**) iš esmės sutampa su metilgrupės pernešimo greičiu, nustatytu reakcijoje su $^3\text{H-AdoMet}$ (**3.3 lentelė**) bei katalitinės kilpos atsidarymo greičiu, matomu fluorescencijoje. Taigi metilgrupės pernaša, β -eliminacija ir kilpos atsidarymas šio eksperimento sąlygomis matomi kaip vienas procesas.



3.22 paveikslas. Citozino konformacijos pokyčiai ir metilgrupės pernaša reakcijoje su AdoMet. 3 μM WT M.HhaI (A) arba W41F/I86W (B) buvo sumaišyta su 2,5 μM GCGC/GMGC, esant 100 μM AdoMet. Mėlynas – absorbcijos signalas (absoliučioje skalėje), raudonas – fluorescencijos signalas (normuotas), geltonas – vienos apskukos reakcijoje įjungtas į DNR ^3H radioaktyvumas (normuotas). Vienos apskukos eksperimentas atliktas kaip aprašyta 2.10.4 skyriuje. Reakcijų kinetiniai parametrai pateikti 3.7 lentelėje.

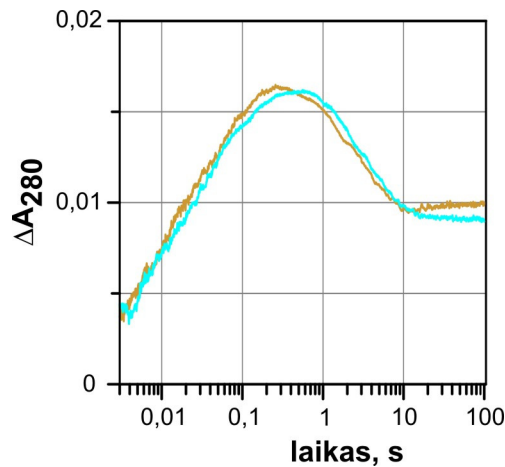
3.7 lentelė. Kinetiniai WT M.HhaI ir W41F/I86W parametrai reakcijose su AdoMet.

	WT + AdoMet \gg DNR AdoMet		W41F/I86W + AdoMet \gg DNR + AdoMet		
	Greitis, s^{-1}	Amplitudė, mAU	Greitis, s^{-1}	Amplitudė, santyk. vnt.	
				absorbcija	fluorescencija
Bazės išsukimas/ kilpos užsidarymas	120 \pm 3	7,1 \pm 0,1	180 \pm 5	0,23 \pm 0,004	-0,13 \pm 0,004
	14,4 \pm 0,2	8,5 \pm 0,1	4,68 \pm 0,03	0,46 \pm 0,002	-0,59 \pm 0,002
Kovalentinė jungtis	0,26 \pm 0,003	-12,8 \pm 0,4	0,36 \pm 0,01	-0,23 \pm 0,01	-0,44 \pm 0,02*
Metilgrupės pernaša/ bazės grįžimas	0,16 \pm 0,004	5,6 \pm 0,4	0,12 \pm 0,002	0,16 \pm 0,01	0,95 \pm 0,02

Reakcijos atliktos naudojant 3 μM MTazę, 2,5 μM GCGC/GMGC (kanoninis taikynys) ir 100 μM AdoMet. Atskirai paruošti ir greitai sustabdytos tėkmės aparatuose sumaišomi reagentai atskirti simboliu „ \gg “. Kinetiniai parametrai buvo gauti aproksimuojant 3.22 pav. pateiktus duomenis keturių eksponenčių lygtimi. Parametrų vertės pateikiamos su standartine aproksimacijos paklaida.

WT M.HhaI reakcijos atveju stebimas labai panašus reakcijos profilis absorbcijoje kaip ir W41F/I86W (3.22 pav. A). Reakcijos kinetiniai parametrai pateikti 3.7 lentelėje. Lėčiausio mažos amplitudės proceso greitis labai artimas metilgrupės pernešimo greičiui, išmatuotam vienos apskukos reakcijoje su ^3H -AdoMet. Ši fazė WT baltymo atveju yra labai mažos amplitudės prie 280 nm, tačiau matuojant 290-300 nm absorbciją, matoma didesnė amplitudė, kas leidžia patikimai priskirti šį pokytį reakcijos produktų komplekso iširimui. Taigi ir WT M.HhaI katalizuojamoje reakcijoje citozino kovalentinė aktyvacija

yra greitesnė už metilgrupės pernašą, o β -eliminacija ir kilpos atsidarymas vyksta labai panašiais greičiais.



3.23 paveikslas. DNR konformacinių virsmų greičio priklausomybė nuo AdoMet koncentracijos WT M.HhaI katalizuojamoje reakcijoje. 3 μ M WT M.HhaI buvo greitai sumaišyta su 2,5 μ M GCGC/GMGC, esant 30 μ M (žydra) arba 100 μ M (geltona) AdoMet ir matuotas A_{280} pokytis.

3.2.5. Apibendrinimas

Šiame darbe pirmą kartą aprašomas metodas, suteikiantis galimybę realiu laiku tiesiogiai stebėti fermento (DNR C5-MTazės) katalizuojamą citozino išsukimą iš DNR spiralės. Matavimų metu registruojamas DNR hiperchrominis efektas, lydintis π - π sanklodos sąveikų suardymą išsuktos bazės vietoje, todėl detekcijai nereikalingos jokios tiriamos DNR modifikacijos (pvz., įvedant fluorescuojančius bazės analogus). Kadangi hiperchrominis efektas – fundamentali nukleorūgščių molekulių savybė, nėra jokių apribojimų išsukamos bazės prigimčiai, ir šį metodą galima pritaikyti daugelio su DNR arba RNR sąveikaujančių baltymų tyrimui. Pagrindinis metodo privalumas – galimybė atlikti matavimus su chemiškai nmodifikuotomis nukleorūgštimis. Sistemose, kuriose nukleorūgščių deformacijos charakterizuotos kitais metodais (pvz., kristalografiškai) šis metodas suteikia galimybę tiesiogiai tirti reakcijų su natūraliais substratais kinetiką. Kita vertus mažiau ištirtų sistemų atveju UV sugerties pokyčių matavimai negarantuoja vienareikšmiškų atsakymų, nes palyginamus hiperchrominius efektus gali sukelti ne tik išsuktas nukleotidas, bet ir kitokios DNR ar RNR deformacijos (Moller ir kt., 1979).

Atsižvelgus į artimiausio kaimyno (*nearest neighbor*) efektus, vieno nukleotido grandies vidutinis indėlis į DNR grandinės absorbciją (260 nm) sudaro 60-80% laisvo nukleotido absorbcijos. Šio darbo metu nustatyta, kad vieno citozino išsukimas iš DNR spiralės sukelia ~2-3 kartus didesnį hiperchrominį efektą (t.y., lygų 150% laisvo nukleotido A_{280}). Taigi pavienio nukleotido išsukimo atveju DNR elektroninė sistema suardoma labiau negu vidutinė nukleotido išlaisvinimo iš dvigrandės struktūros reikšmė (Kelley ir Barton, 1999; Rajski ir kt., 1999). Pažymėtina, kad C:G bazių poros hipochromiškumas didžiausias prie 280 nm, kai kaimyniniai nukleotidai yra A arba G (Cantor ir kt., 1970; Cavaluzzi ir Borer, 2004). Kita vertus, išsukto citozino absorbciją (sugerties koeficientą) gali įtakoti sąveika su baltymu. Gausūs struktūriniai ir biocheminiai M.HhaI tyrimai rodo, kad baltymas sudaro vandenilines jungtis su išsukto citozino N3 ir O2 atomais (Klimašauskas ir kt., 1994). Tuo tarpu žinoma, kad protonuojant citozino N3 padėtį absorbcijos maksimumas slenkasi nuo 271 nm neutralioje terpėje iki 280 nm, esant pH < 3, o sugerties koeficientas padidėja nuo $\epsilon_{271} = 9000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ iki $\epsilon_{280} = 13200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Fox ir Shugar, 1952).

Šiame darbe tiesiogiai išmatuotas citozino išsukimo greitis lygus 10-20 s^{-1} . Ankstesniuose darbuose DNR MTazių bazės išsukimo kinetika buvo tirta naudojant DNR su 2-aminopurinu taikinyje. Taip buvo tirtos adenino N6-MTazės EcoRI (Allan ir kt., 1999) ir Ecodam (Liebert ir kt., 2004) bei M.HhaI (Vilkaitis ir kt., 2000), tačiau šie darbai nesuteikė informacijos apie bazės išsukimą iš natyvio DNR. Šiame darbe nustatyta, kad M.HhaI W41F/I86W katalizuojamoje reakcijoje kilpa užsidaro ir citozinas išsukamas sinchroniškai. Labai tikėtina, kad šie procesai vyksta sinchroniškai ir WT M.HhaI reakcijoje. Panašūs kilpos užsidarymo greičiai buvo gauti tiriant kitus M.HhaI mutantus (Estabrook ir kt., 2009), turinčius triptofaną katalitinėje kilpoje, o taip pat netiesiogiai, tiriant reakciją su 2-aminopuriną turinčia DNR (Vilkaitis ir kt., 2000). Šio darbo metu stebėtas katalitinės kilpos užsidarymo ir citozino išsukimo sinchroniškumas gerai atitinka anksčiau paskelbtus duomenis, kad išsuktas citozinas stipriai surišamas (užrakinamas) tik pilnai

susiformavus aktyviam centrui (Klimašauskas ir Roberts, 1995; Klimašauskas ir kt., 1998). Nesant išsukamos bazės (DNR su bebaziu taikiniu) katalitinės kilpos užsidarymas yra labai greitas, tačiau kitais atvejais uždaro komplekso susidarymo greitį riboja bazių poros išardymas: citozino išsukimo ir katalitinės kilpos greičiai tuo didesni, kuo silpnesnė taikinio bazių pora. Šie rezultatai neprieštarauja prielaidai, kad klaidingai suporuotuose DNR substratuose dalis taikinio citozino yra mažiau stabilus DNR spiraleje, ir todėl tolesnis citozino išsukimas/užrakinimas M.HhaI katalizuojamoje reakcijoje gali vykti lengviau. Tokiu būdu dviejų taikinio citozino konformacijų egzistavimas galėtų paaiškinti citozino išsukimo/kilpos užsidarymo kinetikoje stebimas dvi fazes.

Kita vertus, dviejų fazių kinetika gali rodyti, kad citozino išsukimo/kilpos užsidarymo kelyje egzistuoja du stabilūs tarpiniai konformerai, besiskiriantys tarpusavyje kilpos ir/arba bazės konformacijomis. Tai yra tikėtina, nes struktūrinė analizė rodo, kad katalitinės kilpos užsidarymas – ženklus ir sudėtingas konformacijos pokytis. Šią hipotezę paremia ir **3.19 pav.** pateikta W41F/I86W katalizuojamos reakcijos kinetinė analizė. Tačiau nors bandymai aprašyti šiuos duomenis kitokiais kinetiniais mechanizmais gerų rezultatų nedavė, negalima kategoriškai tvirtinti, kad šis paprasčiausias mechanizmas pilnai aprašo M.HhaI katalizuojamą reakciją ir atmesti DNR substrato konformacijos įtakos išsukimo kinetikai. Gali būti, kad tirtame mutantiniame baltyme W41F/I86W vyrauja vienas iš galimų reakcijos kelių.

Literatūroje diskutuojamos dvi M.HhaI katalizuojamą citozino išsukimą aiškinančios hipotezės. Pirmoji teigia, kad išsukamas citozinas į aktyvų centrą keliauja per DNR mažąjį griovį, o citozino išsukimą lydi katalitinės kilpos užsidarymas (Klimašauskas ir kt., 1998). Ši hipotezė remiasi kristalinių struktūrų analize (Klimašauskas ir kt., 1994) bei duomenimis apie išsukto 2-aminopurino bei timino pasiekiamumą tirpikliui (Serva ir kt., 1998; Vilkaitis ir kt., 2000). Alternatyvi hipotezė remiasi molekulinės dinamikos skaičiavimais ir teigia, kad pirma uždaro katalitinė kilpa, o tik tada inicijuojamas citozino išsukimas (Huang ir kt., 2003). Tokiu atveju citozinas į aktyvų centrą patenka per DNR didįjį griovį, keliaudamas baltymo vidumi.

Tokia citozino trajektorija intuityviai sunkiai suvokiama, tačiau, anot skaičiavimų, baltymas yra pakankamai dinamiškas, kad užtikrintų citozino judėjimą uždarame trinariame komplekse. Šią hipotezę taip pat netiesiogiai lemia konformaciškai suvaržyto bebazio nukleotido konformacija komplekse su M.HhaI (Horton ir kt., 2004). Šiai hipotezei prieštarauja tai, kad remiantis molekulinės dinamikos skaičiavimais pasiūlyta Ser87 svarba bazės išsukimui eksperimentiškai nebuvo patvirtina (Daujotytė ir kt., 2004). Šio darbo metu gauti duomenys neleidžia atmesti nei vienos iš hipotezių, kadangi sinchroniškas citozino ir katalitinės kilpos judėjimas neprieštarauja nei vienam iš pasiūlytų modelių.

Sukurtas metodas leido pirmą kartą tiesiogiai išmatuoti kovalentinės jungties tarp katalitinio Cys81 ir citozino susidarymo greitį. Nustatyta, kad kovalentinė citozino aktyvacija vyksta žymiai lėčiau ($0,7 \text{ s}^{-1}$ reakcijoje su AdoHcy, $0,3 \text{ s}^{-1}$ reakcijoje su AdoMet) negu citozinas išsukamas ir užrakinamas aktyviame centre. Taigi citozino aktyvacijos greitį reakcijoje su kanoniniu GCGC taikiniu lemia nukleofilinės Cys81 atakos greitis, bet ne citozino stabilizacija aktyviame centre. Tačiau yra duomenų, kad citozino stabilizacija aktyviame centre gali būti svarbus mechanizmas, lemiantis lėtesnį reakcijos greitį su nekanoniniais DNR substratais (Svedruzic ir Reich, 2004; Estabrook ir kt., 2009).

Nėra žinoma, kuri išsukto citozino dalis trinariame komplekse HhaI-DNR-AdoHcy sudaro kovalentinę jungtį su baltymu. Trinarių kompleksų kristalinėse struktūrose Cys81 sieros ir citozino C6 atomai paprastai nutolę vienas nuo kito per 2,6-2,8 Å (Kumar ir kt., 1997). Tai atitinka vidurkį tarp kovalentinės C-S jungties ilgio (1,8 Å) M.HhaI komplekse su 5-fluorocitozinu (Klimašauskas ir kt., 1994) ir šių atomų van der Valso skersmenų sumos (3,6 Å), ir rodo, kad tik dalis (~50%) citozino yra kovalentiškai susirišęs su baltymu. Susidarant kovalentinei jungčiai stebimo absorbcijos sumažėjimo amplitudė gerai atitinka vieno citozino absorbcijos išnykimą, jeigu skaičiuotume pagal laisvo nukleotido sugerties koeficientą, kas rodytų, kad visas citozinas yra surištas. Tačiau turint omenyje, kad išsukto citozino molinę

sugertį gali įtakoti sąveikos su baltymu, galima teigti, kad 70-100% citozino yra kovalentiniame komplekse.

Reakcijoje su AdoMet kovalentinę citozino aktyvaciją seka metilgrupės pernaša ant citozino ir β -eliminacija, išyrant kovalentiniam kompleksui tarp MTazės ir 5-metilcitozino. Gauti rezultatai rodo, kad citozino kovalentinė aktyvacija yra greitesnė už metilgrupės pernašą, o β -eliminacija ir kilpos atsidarymas vyksta labai panašiais greičiais, ir yra kinetiškai neišskiriami aprašytų eksperimentų sąlygomis. Taigi mūsų rezultatai paremia neseniai paskelbtų kvantinės mechanikos skaičiavimų rezultatus (Zangi ir kt., 2010) ir leidžia atmesti anksčiau pasiūlytą hipotezę, kad citozino kovalentinė aktyvacija ir metilgrupės pernaša vyksta sinchroniškai (Zhang ir Bruice, 2006).

IŠVADOS

1. Racionalios baltymų inžinerijos ir nukreiptos evoliucijos metodais pašalinus antrąją atpažinimo kilpą, M.HhaI specifiskumas GCGC pakeistas į GCG.
2. Nors specifinių kontaktų su taikinio bazėmis praradimas sumažina metiltransferazės katalitinį aktyvumą, tai galima kompensuoti stiprinant nespecifinius kontaktus tarp baltymo ir DNR fosfodiesterinio karkaso.
3. Naujai sukonstruotos GCG taikinį atpažįstančios DNR hemimetilazės katalitinis efektyvumas ir sekos selektyvumas yra palyginami su laukinio tipo MTazėmis, ir pakankami jos praktiniam panaudojimui molekulinės biologijos tyrimuose.
4. Naujoji GCG specifiskumo DNR citozino-5 metiltransferazė katalizuoja didesnių negu metilas grupių pernešimą nuo AdoMet analogų, todėl gali būti naudojama gamtinių DNR žymėjimui, ar hemimetilitų CG taikinių sukūrimui.
5. Registruojant mažus UV absorbcijos pokyčius, galima tiesiogiai stebėti DNR metiltransferazės katalizuojamą citozino išsukimą iš DNR spiralės pagal hiperchrominį efektą ir kovalentinę citozino aktyvaciją pagal chromoforo suardymą. Kadangi hiperchrominis efektas – fundamentali nukleorūgščių molekulių savybė, šį metodą galima pritaikyti daugelio bazę iš RNR arba DNR išsukančių baltymų tyrimui, nepriklausomai nuo bazės prigimties.
6. Vienu metu stebint katalitinės kilpos konformacijos ir taikinio citozino išsukimą nustatyta, kad M.HhaI katalizuojamoje reakcijoje metilinamas citozinas išsukamas ir katalitinė kilpa užsidaro sinchroniškai, vidutiniu 10-20 s⁻¹ greičiu. Šį greitį stipriai įtakoja taikinio bazių poros stiprumas.

7. Kovalentinė citozino aktyvacija (išmatuotas greitis $0,3-0,6 \text{ s}^{-1}$) ir metilgrupės pernešimas (išmatuotas greitis $0,1-0,2 \text{ s}^{-1}$) yra kinetiškai netapačios katalitinio ciklo stadijos.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiuose moksliniuose straipsniuose:

1. **Gerasimaitė, R.**, Merkienė, E. and Klimašauskas, S. (2011) Direct observation of cytosine flipping and covalent catalysis in a DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* DOI: gkq1329 [pii] 10.1093/nar/gkq1329.
2. **Gerasimaitė, R.**, Vilkaitis, G. and Klimašauskas, S. (2009). A directed evolution design of a GCG-specific DNA hemimethylase. *Nucleic Acids Res* **37**(21): 7332-7341.

Disertacijoje pateikta medžiaga buvo pristatyta šiose konferencijose:

1. **Gerasimaitė, R.**, Merkienė, E. and Klimašauskas, S. (2010). Direct real-time observation of cytosine flipping and covalent catalysis in a DNA methyltransferase. Abstracts of Chemical Biology 2010, Heidelberg, Germany; 22-25 September 2010; p. 82
2. **Gerasimaitė, R.** and Klimašauskas, S. (2007). Novel approaches to engineering sequence-specificity of DNA cytosine-5 methyltransferases. Abstracts of 32nd FEBS Congress, Vienna, Austria; 7-13 June, 2007; *FEBS J* **274** (Suppl. 1) p. 259.
3. **Gerasimaitė, R.** ir Klimašauskas, S. (2006). Pakeisto specifiškumo DNR metiltransferazės. LBD IX suvažiavimo-konferencijos "Biochemija: mokslas ir žinių visuomenė" tezės, Molėtai, Lietuva; 2006 m. birželio 16-18 d.d.; p. 34

Kitos publikacijos

Klimašauskas, S., **Gerasimaitė, R.**, Vilkaitis, G. and Kulakauskas, S. (2002). N4,5-dimethylcytosine, a novel hypermodified base in DNA. *Nucleic Acids Res Suppl*(2): 73-74.

PADĖKA

Dėkoju darbo vadovui prof. Sauliui Klimašauskui už suteiktą galimybę dirbti DNR Modifikacijos Tyrimų laboratorijoje, pasiūlytas tyrimų temas ir mokslines diskusijas. Dėkoju straipsnių bendraautoriams dr. Eglei Merkienei ir dr. Giedriui Vilkaičiui už produktyvų darbą ir perteiktą patirtį.

Esu labai dėkinga savo vyrui ir kolegai dr. Gražvydui Lukinavičiui už sintetinius kofaktoriaus analogus, M.HhaI C81S baltymą; taip pat už patarimus, mokslines diskusijas, kantrybę ir palaikymą, kai darbai nesisekdavo. Dėkoju buvusioms studentėms Miglei Tomkuvienei ir Anastasijai Chomič už tai, kad ne tik noriai mokėsi, bet ir man padėjo daug naujo išmokti; už įkvepiantį optimizmą. Nuoširdus ačiū visiems kolegoms iš DNR modifikacijos tyrimų laboratorijos, vertingais patarimais ir diskusijomis prisidėjusiais prie šio darbo. Ypatingas ačiū Zdislavui Staševskij už mokslines diskusijas ir efektyvią pagalbą susidūrus su sunkumais.

Dėkoju Godai Mitkaitei už *E.coli* kamieną ir Eglei Rudokienei už DNR sekų nustatymą.

Esu dėkinga dabartiniam vadovui prof. Andreas Mayer (Loanos universitetas, Šveicarija) ir kolegoms iš jo vadovaujamos laboratorijos už pasitikėjimą ir draugišką darbo atmosferą, kuri labai padėjo rengiant disertaciją.

Nuoširdžiausias ačiū visai mano šeimai, ypač mamai ir močiutei, už tikėjimą manimi ir besąlygišką palaikymą.

Disertacijoje aprašyti darbai buvo iš dalies finansuoti Howard Hughes Medical Institute (JAV), Lietuvos švietimo ir mokslo ministerijos ir Lietuvos Valstybinio Mokslo ir Studijų Fondo lėšomis.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Allan, B. W., Reich, N. O. and Beechem, J. M. (1999). Measurement of the absolute temporal coupling between DNA binding and base flipping. *Biochemistry* **38**(17): 5308-5314.
2. Ausubel, F. M. (1995). *Short protocols in molecular biology*, Harvard Medical School, USA.
3. Avvakumov, G. V., Walker, J. R., Xue, S., Li, Y., Duan, S., Bronner, C., Arrowsmith, C. H. and Dhe-Paganon, S. (2008). Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature* **455**(7214): 822-825.
4. Balganesch, T. S., Reiners, L., Lauster, R., Noyer-Weidner, M., Wilke, K. and Trautner, T. A. (1987). Construction and use of chimeric SPR/phi 3T DNA methyltransferases in the definition of sequence recognizing enzyme regions. *Embo J* **6**(11): 3543-3549.
5. Bertschinger, J. and Neri, D. (2004). Covalent DNA display as a novel tool for directed evolution of proteins in vitro. *Protein Eng Des Sel* **17**(9): 699-707.
6. Bird, A. (1999). DNA methylation de novo. *Science* **286**: 2287-2288.
7. Bochtler, M., Szczepanowski, R. H., Tamulaitis, G., Grazulis, S., Czapinska, H., Manakova, E. and Siksnys, V. (2006). Nucleotide flips determine the specificity of the Ecl18ki restriction endonuclease. *EMBO J* **25**(10): 2219-2229.
8. Bock, C., Reither, S., Mikeska, T., Paulsen, M., Walter, J. and Lengauer, T. (2005). BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* **21**(21): 4067-4068.
9. Braun, G., Diechtierow, M., Wilkinson, S., Schmidt, F., Huben, M., Weinhold, E. and Reich, N. O. (2008). Enzyme-directed positioning of nanoparticles on large DNA templates. *Bioconjug Chem* **19**(2): 476-479.
10. Buryanov, Y. and Shevchuk, T. (2005). The use of prokaryotic DNA methyltransferases as experimental and analytical tools in modern biology. *Anal Biochem* **338**(1): 1-11.
11. Butkus, V., Klimašauskas, S., Keršulytė, D., Vaitkevičius, D., Lebionka, A. and Janulaitis, A. (1985). Investigation of restriction-modification enzymes from *M. varians* RFL19 with a new type of specificity toward modification of substrate. *Nucleic Acids Res* **13**(16): 5727-5746.
12. Cantor, C. R., Warshaw, M. M. and Shapiro, H. (1970). Oligonucleotide interactions. 3. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides. *Biopolymers* **9**(9): 1059-1077.
13. Cao, X., Springer, N. M., Muszynski, M. G., Phillips, R. L., Kaeppler, S. and Jacobsen, S. E. (2000). Conserved plant genes with similarity to

- mammalian de novo DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4979-4984.
14. Carvin, C. D., Dhasarathy, A., Friesenhahn, L. B., Jessen, W. J. and Kladde, M. P. (2003a). Targeted cytosine methylation for in vivo detection of protein-DNA interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7743-7748.
 15. Carvin, C. D., Parr, R. D. and Kladde, M. P. (2003b). Site-selective in vivo targeting of cytosine-5 DNA methylation by zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res* **31**(22): 6493-6501.
 16. Cavaluzzi, M. J. and Borer, P. N. (2004). Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA. *Nucleic Acids Res* **32**(1): e13.
 17. Cedar, H. and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* **10**(5): 295-304.
 18. Chen, L., MacMillan, A. M., Chang, W., Ezaz-Nikpay, K., Lane, W. S. and Verdine, G. L. (1991). Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Biochemistry* **30**(46): 11018-11025.
 19. Cheng, X. and Blumenthal, R. M. (1996). Finding a basis for flipping bases. *Structure* **4**: 639-645.
 20. Cheng, X. and Blumenthal, R. M. (2008). Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* **16**(3): 341-350.
 21. Cheng, X. and Blumenthal, R. M. (2010). Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry* **49**(14): 2999-3008.
 22. Cheng, X., Kumar, S., Posfai, J., Pflugrath, J. W. and Roberts, R. J. (1993). Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell* **74**: 299-307.
 23. Clark, S. J., Statham, A., Stirzaker, C., Molloy, P. L. and Frommer, M. (2006). DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nat Protoc* **1**(5): 2353-2364.
 24. Cohen, H. M., Tawfik, D. S. and Griffiths, A. D. (2002). Promiscuous methylation of non-canonical DNA sites by HaeIII methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **30**(17): 3880-3885.
 25. Cohen, H. M., Tawfik, D. S. and Griffiths, A. D. (2004). Altering the sequence specificity of HaeIII methyltransferase by directed evolution using in vitro compartmentalization. *Protein Eng Des Sel* **17**(1): 3-11.
 26. Dalhoff, C., Lukinavičius, G., Klimašauskas, S. and Weinhold, E. (2006). Direct transfer of extended groups from synthetic cofactors by DNA methyltransferases. *Nat Chem Biol* **2**(1): 31-32.
 27. Darii, M. V., Cherepanova, N. A., Subach, O. M., Kirsanova, O. V., Rasko, T., Slaska-Kiss, K., Kiss, A., Deville-Bonne, D., Reboud-

- Ravaux, M. and Gromova, E. S. (2009). Mutational analysis of the CG recognizing DNA methyltransferase SssI: insight into enzyme-DNA interactions. *Biochim Biophys Acta* **1794**(11): 1654-1662.
28. Daujotyte, D., Liutkevičiūtė, Z., Tamulaitis, G. and Klimašauskas, S. (2008). Chemical mapping of cytosines enzymatically flipped out of the DNA helix. *Nucleic Acids Res* **36**(10): e57.
 29. Daujotyte, D., Serva, S., Vilkaitis, G., Merkienė, E., Venclovas, C. and Klimašauskas, S. (2004). HhaI DNA methyltransferase uses the protruding Gln237 for active flipping of its target cytosine. *Structure* **12**(6): 1047-1055.
 30. Daujotyte, D., Vilkaitis, G., Manelytė, L., Skalicky, J., Szyperski, T. and Klimašauskas, S. (2003). Solubility engineering of the HhaI methyltransferase. *Protein Eng* **16**(4): 295-301.
 31. Dila, D., Sutherland, E., Moran, L., Slatko, B. and Raleigh, E. A. (1990). Genetic and sequence organization of the mcrBC locus of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **172**(9): 4888-4900.
 32. Donahue, J. P., Israel, D. A., Peek, R. M., Blaser, M. J. and Miller, G. G. (2000). Overcoming the restriction barrier to plasmid transformation of Helicobacter pylori. *Mol Microbiol* **37**(5): 1066-1074.
 33. Dryden, D. T. (1999). *Bacterial DNA Methyltransferases. S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions*. Cheng, X. and R. M. Blumenthal. Singapore, World Scientific Publishing Company.
 34. Duguid, E. M., Rice, P. A. and He, C. (2005). The structure of the human AGT protein bound to DNA and its implications for damage detection. *J Mol Biol* **350**(4): 657-666.
 35. Estabrook, R. A., Nguyen, T. T., Fera, N. and Reich, N. O. (2009). Coupling sequence-specific recognition to DNA modification. *J Biol Chem* **284**(34): 22690-22696.
 36. Estabrook, R. A. and Reich, N. (2006). Observing an induced-fit mechanism during sequence-specific DNA methylation. *J Biol Chem* **281**(48): 37205-37214.
 37. Forde, G. K., Kedzierski, P., Sokalski, W. A., Forde, A. E., Hill, G. A. and Leszczynski, J. (2006). Physical nature of interactions within the active site of cytosine-5-methyltransferase. *J Phys Chem A* **110**(6): 2308-2313.
 38. Fox, J. J. and Shugar, D. (1952). Spectrophotometric studies of nucleic acid derivatives and related compounds as a function of pH. II. Natural and synthetic pyrimidine nucleosides. *Biochim Biophys Acta* **9**(4): 369-384.
 39. Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., Heine-Suner, D., Cigudosa, J. C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T. D., Wu, Y. Z., Plass, C. and Esteller,

- M. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(30): 10604-10609.
40. Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L. and Paul, C. L. (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**(5): 1827-1831.
 41. Gabbara, S., Sheluho, D. and Bhagwat, A. S. (1995). Cytosine methyltransferase from *Escherichia coli* in which active site cysteine is replaced with serine is partially active. *Biochemistry* **34**(27): 8914-8923.
 42. Galperin, M. Y. and Cochran, G. R. (2011). The 2011 Nucleic Acids Research Database Issue and the online Molecular Biology Database Collection. *Nucleic Acids Research* **39**(suppl 1): D1-D6.
 43. Goedecke, K., Pignot, M., Goody, R. S., Scheidig, A. J. and Weinhold, E. (2001). Structure of the N6-adenine DNA methyltransferase M.TaqI in complex with DNA and a cofactor analog. *Nat Struct Biol* **8**(2): 121-125.
 44. Goll, M. G. and Bestor, T. H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* **74**: 481-514.
 45. Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C. L., Zhang, X., Golic, K. G., Jacobsen, S. E. and Bestor, T. H. (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* **311**(5759): 395-398.
 46. Gong, W., O'Gara, M., Blumenthal, R. M. and Cheng, X. (1997). Structure of PvuII DNA-(cytosine N4) methyltransferase, an example of domain permutation and protein fold assignment. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2702-2715.
 47. Gopal, J., Yebra, M. J. and Bhagwat, A. S. (1994). DsaV methyltransferase and its isoschizomers contain a conserved segment that is similar to the segment in HhaI methyltransferase that is in contact with DNA bases. *Nucleic Acids Res* **22**(21): 4482-4488.
 48. Groot, M. N., Nieboer, F. and Abee, T. (2008). Enhanced transformation efficiency of recalcitrant *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* isolates upon in vitro methylation of plasmid DNA. *Appl Environ Microbiol* **74**(24): 7817-7820.
 49. Hanck, T., Schmidt, S. and Fritz, H. J. (1993). Sequence-specific and mechanism-based crosslinking of Dcm DNA cytosine-C5 methyltransferase of *E. coli* K-12 to synthetic oligonucleotides containing 5-fluoro-2'-deoxycytidine. *Nucleic Acids Res* **21**(2): 303-309.
 50. Hashimoto, H., Horton, J. R., Zhang, X., Bostick, M., Jacobsen, S. E. and Cheng, X. (2008). The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature* **455**(7214): 826-829.
 51. Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., Slagboom, P. E. and Lumey, L. H. (2008). Persistent

- epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(44): 17046-17049.
52. Heithoff, D. M., Sinsheimer, R. L., Low, D. A. and Mahan, M. J. (1999). An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* **284**(5416): 967-970.
 53. Hermann, A., Schmitt, S. and Jeltsch, A. (2003). The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem* **278**(34): 31717-31721.
 54. Ho, D. K., Wu, J. C., Santi, D. V. and Floss, H. G. (1991). Stereochemical studies of the C-methylation of deoxycytidine catalyzed by HhaI methylase and the N-methylation of deoxyadenosine catalyzed by EcoRI methylase. *Arch. Biochem. Biophys.* **284**: 264-269.
 55. Holz, B., Klimasauskas, S., Serva, S. and Weinhold, E. (1998). 2-Aminopurine as a fluorescent probe for DNA base flipping by methyltransferases. *Nucleic Acids Res* **26**(4): 1076-1083.
 56. Horton, J. R., Liebert, K., Bekes, M., Jeltsch, A. and Cheng, X. (2006a). Structure and substrate recognition of the Escherichia coli DNA adenine methyltransferase. *J Mol Biol* **358**(2): 559-570.
 57. Horton, J. R., Liebert, K., Hattman, S., Jeltsch, A. and Cheng, X. (2005). Transition from nonspecific to specific DNA interactions along the substrate-recognition pathway of dam methyltransferase. *Cell* **121**(3): 349-361.
 58. Horton, J. R., Ratner, G., Banavali, N. K., Huang, N., Choi, Y., Maier, M. A., Marquez, V. E., MacKerell, A. D., Jr. and Cheng, X. (2004). Caught in the act: visualization of an intermediate in the DNA base-flipping pathway induced by HhaI methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **32**(13): 3877-3886.
 59. Horton, J. R., Zhang, X., Maunus, R., Yang, Z., Wilson, G. G., Roberts, R. J. and Cheng, X. (2006b). DNA nicking by HinP1I endonuclease: bending, base flipping and minor groove expansion. *Nucleic Acids Res* **34**(3): 939-948.
 60. Hosfield, D. J., Guan, Y., Haas, B. J., Cunningham, R. P. and Tainer, J. A. (1999). Structure of the DNA repair enzyme endonuclease IV and its DNA complex: double-nucleotide flipping at abasic sites and three-metal-ion catalysis. *Cell* **98**(3): 397-408.
 61. Huang, N., Banavali, N. K. and MacKerell, A. D., Jr. (2003). Protein-facilitated base flipping in DNA by cytosine-5-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 68-73.
 62. Huang, N. and MacKerell, A. D., Jr. (2005). Specificity in protein-DNA interactions: energetic recognition by the (cytosine-C5)-methyltransferase from HhaI. *J Mol Biol* **345**(2): 265-274.
 63. Yang, A. S., Shen, J. C., Zingg, J. M., Mi, S. and Jones, P. A. (1995). HhaI and HpaII DNA methyltransferases bind DNA mismatches,

- methylate uracil and block DNA repair. *Nucleic Acids Res* **23**(8): 1380-1387.
64. Yoder, J. A. and Bestor, T. H. (1998). A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Human Molecular Gen.* **7**: 279-284.
 65. Youngblood, B., Buller, F. and Reich, N. O. (2006). Determinants of sequence-specific DNA methylation: target recognition and catalysis are coupled in M.HhaI. *Biochemistry* **45**(51): 15563-15572.
 66. Jeltsch, A., Christ, F., Fatemi, M. and Roth, M. (1999). On the substrate specificity of DNA methyltransferases. adenine-N6 DNA methyltransferases also modify cytosine residues at position N4. *J Biol Chem* **274**(28): 19538-19544.
 67. Jessen, W. J., Dhasarathy, A., Hoose, S. A., Carvin, C. D., Risinger, A. L. and Kladde, M. P. (2004). Mapping chromatin structure in vivo using DNA methyltransferases. *Methods* **33**(1): 68-80.
 68. Jia, D., Jurkowska, R. Z., Zhang, X., Jeltsch, A. and Cheng, X. (2007). Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* **449**(7159): 248-251.
 69. Kaminskas, E., Farrell, A. T., Wang, Y. C., Sridhara, R. and Pazdur, R. (2005). FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension. *Oncologist* **10**(3): 176-182.
 70. Kelley, S. O. and Barton, J. K. (1999). Electron transfer between bases in double helical DNA. *Science* **283**(5400): 375-381.
 71. Kilgore, J. A., Hoose, S. A., Gustafson, T. L., Porter, W. and Kladde, M. P. (2007). Single-molecule and population probing of chromatin structure using DNA methyltransferases. *Methods* **41**(3): 320-332.
 72. Kiss, A., Posfai, G., Zsurka, G., Rasko, T. and Venetianer, P. (2001). Role of DNA minor groove interactions in substrate recognition by the M.SinI and M.EcoRII DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res* **29**(15): 3188-3194.
 73. Kladde, M. P. and Simpson, R. T. (1994). Positioned nucleosomes inhibit Dam methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1361-1365.
 74. Klimašauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J. and Cheng, X. (1994). HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* **76**: 357-369.
 75. Klimašauskas, S. and Liutkevičiūtė, Z. (2009). *Experimental Approaches to Study DNA Base Flipping*. DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution. Grosjean, H., Landes Bioscience: 21-32.
 76. Klimašauskas, S., Nelson, J. L. and Roberts, R. J. (1991). The sequence specificity domain of cytosine-C5 methylases. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6183-6190.

77. Klimašauskas, S. and Roberts, R. J. (1995). M.HhaI binds tightly to substrates containing mismatches at the target base. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1388-1395.
78. Klimašauskas, S., Szyperski, T., Serva, S. and Wuthrich, K. (1998). Dynamic models of the flipped-out cytosine during HhaI methyltransferase-DNA interactions in solution. *EMBO J.* **17**: 317-324.
79. Klimašauskas, S. and Weinhold, E. (2007). A new tool for biotechnology: AdoMet-dependent methyltransferases. *Trends Biotechnol* **25**(3): 99-104.
80. Klose, R. J. and Bird, A. P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* **31**(2): 89-97.
81. Kobayashi, I., Nobusato, A., Kobayashi-Takahashi, N. and Uchiyama, I. (1999). Shaping the genome-restriction-modification systems as mobile genetic elements. *Curr Opin Genet Dev* **9**(6): 649-656.
82. Kossykh, V. G. and Lloyd, R. S. (2004). A DNA adenine methyltransferase of Escherichia coli that is cell cycle regulated and essential for viability. *J Bacteriol* **186**(18): 6340.
83. Koudan, E. V., Bujnicki, J. M. and Gromova, E. S. (2004). Homology modeling of the CG-specific DNA methyltransferase SssI and its complexes with DNA and AdoHcy. *J Biomol Struct Dyn* **22**(3): 339-345.
84. Kumar, S., Cheng, X., Klimašauskas, S., Sha, M., Posfai, J., Roberts, R. J. and Wilson, G. G. (1994). The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **22**: 1-10.
85. Kumar, S., Cheng, X., Pflugrath, J. W. and Roberts, R. J. (1992). Purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction analysis of an M.HhaI-AdoMet complex. *Biochemistry* **31**(36): 8648-8653.
86. Kumar, S., Horton, J. R., Jones, G. D., Walker, R. T., Roberts, R. J. and Cheng, X. (1997). DNA containing 4'-thio-2'-deoxycytidine inhibits methylation by HhaI methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **25**(14): 2773-2783.
87. Kuzmic, P. (1996). Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal Biochem* **237**(2): 260-273.
88. Kwak, J., Jiang, H. and Kendrick, K. E. (2002). Transformation using in vivo and in vitro methylation in *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiol Lett* **209**(2): 243-248.
89. Labahn, J., Granzin, J., Schluckebier, G., Robinson, D. P., Jack, W. E., Schildkraut, I. and Saenger, W. (1994). Three-dimensional structure of the adenine-specific DNA methyltransferase M.TaqI in complex with the cofactor S-adenosylmethionine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 10957-10961.

90. Lange, C., Wild, C. and Trautner, T. A. (1996). Identification of a subdomain within DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases responsible for the recognition of the 5' part of their DNA target. *EMBO J.* **15**: 1443-1450.
91. Lau, E. Y. and Bruice, T. C. (1999). Active site dynamics of the HhaI methyltransferase: insights from computer simulation. *J Mol Biol* **293**(1): 9-18.
92. Lauster, R., Trautner, T. A. and Noyer-Weidner, M. (1989). Cytosine-specific type II DNA methyltransferases - a conserved enzyme core with variable target-recognizing domains. *J. Mol. Biol.* **206**: 305-312.
93. Lee, Y. F., Tawfik, D. S. and Griffiths, A. D. (2002). Investigating the target recognition of DNA cytosine-5 methyltransferase HhaI by library selection using in vitro compartmentalisation. *Nucleic Acids Res* **30**(22): 4937-4944.
94. Li, F., Papworth, M., Minczuk, M., Rohde, C., Zhang, Y., Ragozin, S. and Jeltsch, A. (2007). Chimeric DNA methyltransferases target DNA methylation to specific DNA sequences and repress expression of target genes. *Nucleic Acids Res* **35**(1): 100-112.
95. Liebert, K., Hermann, A., Schlickerrieder, M. and Jeltsch, A. (2004). Stopped-flow and mutational analysis of base flipping by the Escherichia coli Dam DNA-(adenine-N6)-methyltransferase. *J Mol Biol* **341**(2): 443-454.
96. Lindstrom, W. M., Jr., Flynn, J. and Reich, N. O. (2000). Reconciling structure and function in HhaI DNA cytosine-C-5 methyltransferase. *J Biol Chem* **275**(7): 4912-4919.
97. Liu, L. and Santi, D. V. (2000). m5C RNA and m5C DNA methyltransferases use different cysteine residues as catalysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 8263-8265.
98. Liutkevičiūtė, Z., Lukinavičius, G., Masevičius, V., Daujotytė, D. and Klimašauskas, S. (2009). Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA. *Nat Chem Biol* **5**(6): 400-402.
99. Lobner-Olesen, A., Skovgaard, O. and Marinus, M. G. (2005). Dam methylation: coordinating cellular processes. *Curr Opin Microbiol* **8**(2): 154-160.
100. Lukinavičius, G., Lapienė, V., Staševskij, Z., Dalhoff, C., Weinhold, E. and Klimašauskas, S. (2007). Targeted labeling of DNA by methyltransferase-directed transfer of activated groups (mTAG). *J Am Chem Soc* **129**(10): 2758-2759.
101. Luo, J. and Bruice, T. C. (2005). Low-frequency normal mode in DNA HhaI methyltransferase and motions of residues involved in the base flipping. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(45): 16194-16198.
102. Malone, T., Blumenthal, R. M. and Cheng, X. (1995). Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-

- methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. *J Mol Biol* **253**(4): 618-632.
103. Meister, G. E., Chandrasegaran, S. and Ostermeier, M. (2008). An engineered split M.HhaI-zinc finger fusion lacks the intended methyltransferase specificity. *Biochem Biophys Res Commun* **377**(1): 226-230.
 104. Merkienė, E. and Klimašauskas, S. (2005). Probing a rate-limiting step by mutational perturbation of AdoMet binding in the HhaI methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **33**(1): 307-315.
 105. Mi, S., Alonso, D. and Roberts, R. J. (1995). Functional analysis of Gln-237 mutants of HhaI methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **23**: 620-627.
 106. Mi, S. and Roberts, R. J. (1992). How M.MspI and M.HpaII decide which base to methylate. *Nucleic Acids Res* **20**(18): 4811-4816.
 107. Mi, S. and Roberts, R. J. (1993). The DNA binding affinity of HhaI methylase is increased by a single amino acid substitution in the catalytic center. *Nucleic Acids Res.* **21**: 2459-2464.
 108. Moller, A., Wild, U., Riesner, D. and Gassen, H. G. (1979). Evidence from ultraviolet absorbance measurements for a codon-induced conformational change in lysine tRNA from Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(7): 3266-3270.
 109. Neely, R. K., Dujotytytė, D., Gražulis, S., Magennis, S. W., Dryden, D. T., Klimašauskas, S. and Jones, A. C. (2005). Time-resolved fluorescence of 2-aminopurine as a probe of base flipping in M.HhaI-DNA complexes. *Nucleic Acids Res* **33**(22): 6953-6960.
 110. Neely, R. K., Dedecker, P., Hotta, J.-i., Urbanaviciute, G., Klimasauskas, S. and Hofkens, J. (2010). DNA fluorocode: A single molecule, optical map of DNA with nanometre resolution. *Chemical Science* **1**(4): 453-460.
 111. Neely, R. K. and Roberts, R. J. (2008). The BsaHI restriction-modification system: cloning, sequencing and analysis of conserved motifs. *BMC Mol Biol* **9**: 48.
 112. Nephew, K. P., Balch, C. and Skalnik, D. G. (2009). Methyl group acceptance assay for the determination of global DNA methylation levels. *Methods Mol Biol* **507**: 35-41.
 113. Ng, H. H. and Bird, A. (1999). DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**(2): 158-163.
 114. Noyer-Weidner, M. and Trautner, T. A. (1993). *Methylation of DNA in prokaryotes*. DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance. Jost, J. and H. Saluz. Basel, Birkhauser Verlag. **64**.
 115. O'Gara, M., Horton, J. R., Roberts, R. J. and Cheng, X. (1998). Structures of HhaI methyltransferase complexed with substrates containing mismatches at the target base. *Nat Struct Biol* **5**(10): 872-877.

116. O'Gara, M., Klimašauskas, S., Roberts, R. J. and Cheng, X. (1996a). Enzymatic C5-cytosine methylation of DNA: mechanistic implications of new crystal structures for HhaI methyltransferase-DNA-AdoHcy complexes. *J Mol Biol* **261**(5): 634-645.
117. O'Gara, M., Roberts, R. J. and Cheng, X. (1996b). A structural basis for the preferential binding of hemimethylated DNA by HhaI DNA methyltransferase. *J Mol Biol* **263**(4): 597-606.
118. O'Gara, M., Zhang, X., Roberts, R. J. and Cheng, X. (1999). Structure of a binary complex of HhaI methyltransferase with S-adenosyl-L-methionine formed in the presence of a short non-specific DNA oligonucleotide. *J Mol Biol* **287**(2): 201-209.
119. Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**(3): 247-257.
120. Okano, M., Xie, S. and Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature Genet.* **19**: 219-220.
121. Osterman, D. G., DePillis, G. D., Wu, J. C., Matsuda, A. and Santi, D. V. (1988). 5-Fluorocytosine in DNA is a mechanism-based inhibitor of HhaI methylase. *Biochemistry* **27**(14): 5204-5210.
122. Palmer, B. R. and Marinus, M. G. (1994). The dam and dcm strains of *Escherichia coli* -- a review. *Gene* **143**(1): 1-12.
123. Perakyla, M. (1998). A model study of the enzyme-catalyzed cytosine methylation using ab initio quantum mechanical and density functional theory calculations: pKa of the cytosine N3 in the intermediates and transition states of the reaction. *J. Amer. Chem. Soc.* **120**(49): 12895-12902.
124. Pljevaljcic, G., Pignot, M. and Weinhold, E. (2003). Design of a new fluorescent cofactor for DNA methyltransferases and sequence-specific labeling of DNA. *J Am Chem Soc* **125**(12): 3486-3492.
125. Pljevaljcic, G., Schmidt, F. and Weinhold, E. (2004). Sequence-specific methyltransferase-induced labeling of DNA (SMILing DNA). *Chembiochem* **5**(3): 265-269.
126. Pogribny, I. P. and Beland, F. A. (2009). DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. *Cell Mol Life Sci* **66**(14): 2249-2261.
127. Pondugula, S. and Kladde, M. P. (2008). Single-molecule analysis of chromatin: changing the view of genomes one molecule at a time. *J Cell Biochem* **105**(2): 330-337.
128. Posfai, J., Bhagwat, A. S., Posfai, G. and Roberts, R. J. (1989). Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **17**: 2421-2435.

129. Rajski, S. R., Kumar, S., Roberts, R. J. and Barton, J. K. (1999). Protein-Modulated DNA Electron Transfer. *Journal of the American Chemical Society* **121**(23): 5615-5616.
130. Raleigh, E. A. and Brooks, J. E. (1998). *Restriction Modification Systems: Where They Are and What They Do*. Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis. Bruijn, F. J., J. R. Lupski and G. M. Weinstock. New York, Chapman & Hall.
131. Rasko, T., Finta, C. and Kiss, A. (2000). DNA bending induced by DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res* **28**(16): 3083-3091.
132. Rathert, P., Rasko, T., Roth, M., Slaska-Kiss, K., Pingoud, A., Kiss, A. and Jeltsch, A. (2007). Reversible inactivation of the CG specific SssI DNA (cytosine-C5)-methyltransferase with a photocleavable protecting group. *Chembiochem* **8**(2): 202-207.
133. Reinisch, K. M., Chen, L., Verdine, G. L. and Lipscomb, W. N. (1995). The crystal structure of HaeIII methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base pairing. *Cell* **82**: 143-153.
134. Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J. and Macelis, D. (2005). REBASE--restriction enzymes and DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Res* **33**(Database issue): D230-232.
135. Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J. and Macelis, D. (2010). REBASE—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research* **38**(suppl 1): D234-D236.
136. Robertson, K. D. and Wolffe, A. P. (2000). DNA methylation in health and disease. *Nature Reviews* **1**: 11-19.
137. Sambrook, J. and Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*, CSH laboratory press, USA.
138. Sankpal, U. T. and Rao, D. N. (2002). Structure, function, and mechanism of HhaI DNA methyltransferases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**(3): 167-197.
139. Scavetta, R. D., Thomas, C. B., Walsh, M. A., Szegedi, S., Joachimiak, A., Gumpport, R. I. and Churchill, M. E. (2000). Structure of RsrI methyltransferase, a member of the N6-adenine beta class of DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Res* **28**(20): 3950-3961.
140. Schluckebier, G., O'Gara, M., Saenger, W. and Cheng, X. (1995). Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **247**: 16-20.
141. Schmidt, F. H., Huben, M., Gider, B., Renault, F., Teulade-Fichou, M. P. and Weinhold, E. (2008). Sequence-specific Methyltransferase-Induced Labelling (SMILing) of plasmid DNA for studying cell transfection. *Bioorg Med Chem* **16**(1): 40-48.

142. Schuster-Bockler, B., Schultz, J. and Rahmann, S. (2004). HMM Logos for visualization of protein families. *BMC Bioinformatics* **5**: 7.
143. Serva, S., Weinhold, E., Roberts, R. J. and Klimašauskas, S. (1998). Chemical display of thymine residues flipped out by DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Res* **26**(15): 3473-3479.
144. Sethmann, S., Ceglowski, P., Willert, J., Iwanicka-Nowicka, R., Trautner, T. A. and Walter, J. (1999). M.(ϕ)BssHII, a novel cytosine-C5-DNA-methyltransferase with target-recognition domains at separated locations of the enzyme. *EMBO J.* **18**: 3502-3508.
145. Shevchuk, T. V. and Burianov, I. (1999). [DNA methyltransferases for detection of the level of methylation of cytosine in the DNA CCWGG sequence]. *Bioorg Khim* **25**(8): 630-633.
146. Shieh, F. K., Youngblood, B. and Reich, N. O. (2006). The role of Arg165 towards base flipping, base stabilization and catalysis in M.HhaI. *J Mol Biol* **362**(3): 516-527.
147. Shieh, F. K. and Reich, N. O. (2007). AdoMet-dependent methyltransfer: Glu119 is essential for DNA C5-cytosine methyltransferase M.HhaI. *J Mol Biol* **373**(5): 1157-1168.
148. Singer, E. M. and Smith, S. S. (2006). Nucleoprotein assemblies for cellular biomarker detection. *Nano Lett* **6**(6): 1184-1189.
149. Skaric, V., Gaspert, B., Hohnjec, M. and Lacan, G. (1974). Some dihydro-cytidines and -isocytidines. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*: 267-271.
150. Slupphaug, G., Mol, C. D., Kavli, B., Arvai, A. S., Krokan, H. E. and Tainer, J. A. (1996). A nucleotide-flipping mechanism from the structure of human uracil-DNA glycosylase bound to DNA. *Nature* **384**(6604): 87-92.
151. Smith, A. E. and Ford, K. G. (2007). Specific targeting of cytosine methylation to DNA sequences in vivo. *Nucleic Acids Res* **35**(3): 740-754.
152. Song, J., Rechkoblit, O., Bestor, T. H. and Patel, D. J. (2010). Structure of DNMT1-DNA Complex Reveals a Role for Autoinhibition in Maintenance DNA Methylation. *Science*.
153. Subach, O. M., Baskunov, V. B., Darii, M. V., Maltseva, D. V., Alexandrov, D. A., Kirsanova, O. V., Kolbanovskiy, A., Kolbanovskiy, M., Johnson, F., Bonala, R., Geacintov, N. E. and Gromova, E. S. (2006). Impact of benzo[a]pyrene-2'-deoxyguanosine lesions on methylation of DNA by SssI and HhaI DNA methyltransferases. *Biochemistry* **45**(19): 6142-6159.
154. Svedruzic, Z. M. and Reich, N. O. (2004). The mechanism of target base attack in DNA cytosine carbon 5 methylation. *Biochemistry* **43**(36): 11460-11473.

155. Sverdlov, E. D., Monastyrskaya, G. S., Guskova, L. I., Levitan, T. L., Sheichenko, V. I. and Budowsky, E. I. (1974). Modification of cytidine residues with a bisulfite--O-methylhydroxylamine mixture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* **340**(2): 153-165.
156. Szilak, L., Venetianer, P. and Kiss, A. (1990). Cloning and nucleotide sequence of the genes coding for the Sau96I restriction and modification enzymes. *Nucleic Acids Res* **18**(16): 4659-4664.
157. Tamulaitis, G., Zaremba, M., Szczepanowski, R. H., Bochtler, M. and Šikšnys, V. (2007). Nucleotide flipping by restriction enzymes analyzed by 2-aminopurine steady-state fluorescence. *Nucleic Acids Res* **35**(14): 4792-4799.
158. Tanaka, M., Yoshida, S., Saneyoshi, M. and Yamaguchi, T. (1981). Utilization of 5-Fluoro-2'-deoxyuridine Triphosphate and 5-Fluoro-2'-deoxycytidine Triphosphate in DNA Synthesis by DNA Polymerases α and β from Calf Thymus. *Cancer Research* **41**(10): 4132-4135.
159. Tang, L. Y., Reddy, M. N., Rasheva, V., Lee, T. L., Lin, M. J., Hung, M. S. and Shen, C. K. (2003). The eukaryotic DNMT2 genes encode a new class of cytosine-5 DNA methyltransferases. *J Biol Chem* **278**(36): 33613-33616.
160. Timar, E., Groma, G., Kiss, A. and Venetianer, P. (2004). Changing the recognition specificity of a DNA-methyltransferase by in vitro evolution. *Nucleic Acids Res* **32**(13): 3898-3903.
161. Tycko, B. (2000). Epigenetic gene silencing in cancer. *J. Clin. Invest.* **105**: 401-407.
162. Tran, P. H., Korszun, Z. R., Cerritelli, S., Springhorn, S. S. and Lacks, S. A. (1998). Crystal structure of the DpnM DNA adenine methyltransferase from the DpnII restriction system of streptococcus pneumoniae bound to S-adenosylmethionine. *Structure* **6**(12): 1563-1575.
163. Trautner, T. A., Balganesh, T., Wilke, K., Noyer-Weidner, M., Rauhut, E., Lauster, R., Behrens, B. and Pawlek, B. (1988). Organization of target-recognizing domains in the multispecific DNA (cytosine-5) methyltransferases of Bacillus subtilis phages SPR and Phi-3T. *Gene* **74**: 267.
164. Trautner, T. A., Pawlek, B., Behrens, B. and Willert, J. (1996). Exact size and organization of DNA target-recognizing domains of multispecific DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases. *EMBO J.* **15**: 1434-1442.
165. Ulanov, B. P., Matorina, T. I. and Zmanuzl, N. M. (1976). [Double modification of cytidine residues in DNA]. *Mol Biol (Mosk)* **10**(6): 1211-1220.
166. Verdine, G. L. (1994). The flip side of DNA methylation. *Cell* **76**(2): 197-200.

167. Vilkaitis, G., Dong, A., Weinhold, E., Cheng, X. and Klimašauskas, S. (2000). Functional roles of the conserved threonine 250 in the target recognition domain of HhaI DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.*: in press.
168. Vilkaitis, G. and Klimašauskas, S. (1998). Construction and analysis of monospecific DNA cytosine-C5 methyltransferases with chimeric target recognition domains. *Biologija*(1): 51-54.
169. Vilkaitis, G., Merkienė, E., Serva, S., Weinhold, E. and Klimašauskas, S. (2001). The mechanism of DNA cytosine-5 methylation. Kinetic and mutational dissection of HhaI methyltransferase. *J Biol Chem* **276**(24): 20924-20934.
170. Vilkaitis, G., Suetake, I., Klimašauskas, S. and Tajima, S. (2005). Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase. *J Biol Chem* **280**(1): 64-72.
171. Walter, J., Trautner, T. A. and Noyer-Weidner, M. (1992). High plasticity of multispecific DNA methyltransferases in the region carrying DNA target recognizing enzyme modules. *EMBO J.* **11**: 4445-4450.
172. Wang, P., Brank, A. S., Banavali, N. K., Nicklaus, M. C., Marquez, V. E., Christman, J. K. and MacKerell, A. D. (2000). Use of Oligodeoxyribonucleotides with Conformationally Constrained Abasic Sugar Targets To Probe the Mechanism of Base Flipping by HhaI DNA (Cytosine C5)-methyltransferase. *Journal of the American Chemical Society* **122**(50): 12422-12434.
173. Waterland, R. A. and Jirtle, R. L. (2003). Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* **23**(15): 5293-5300.
174. Watson, M. E., Jr., Jarisch, J. and Smith, A. L. (2004). Inactivation of deoxyadenosine methyltransferase (dam) attenuates Haemophilus influenzae virulence. *Mol Microbiol* **53**(2): 651-664.
175. Weller, R. L. and Rajske, S. R. (2005). DNA methyltransferase-moderated click chemistry. *Org Lett* **7**(11): 2141-2144.
176. Wells, R. D., Larson, J. E., Grant, R. C., Shortle, B. E. and Cantor, C. R. (1970). Physicochemical studies on polydeoxyribonucleotides containing defined repeating nucleotide sequences. *J Mol Biol* **54**(3): 465-497.
177. Whitelaw, N. C. and Whitelaw, E. (2006). How lifetimes shape epigenotype within and across generations. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**: R131-137.
178. Wilke, K., Rauhut, E., Noyer-Weidner, M., Lauster, R., Pawlek, B., Behrens, B. and Trautner, T. A. (1988). Sequential order of target-recognizing domains in multispecific DNA-methyltransferases. *EMBO J.* **7**: 2601-2609.

179. Wilson, G. G. and Murray, N. E. (1991). Restriction and Modification Systems. *Annual Review of Genetics* **25**(1): 585-627.
180. Wyszynski, M. W. and Gabbara, S. (1992). Substitutions of a cysteine conserved among DNA cytosine methylases result in a variety of phenotypes. *Nucleic Acids Res.* **20**: 319-326.
181. Wong, A. H., Gottesman, II and Petronis, A. (2005). Phenotypic differences in genetically identical organisms: the epigenetic perspective. *Hum Mol Genet* **14 Spec No 1**: R11-18.
182. Wu, J. C. and Santi, D. V. (1987). Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **262**: 4778-4786.
183. Zangi, R., Arrieta, A. and Cossio, F. P. (2010). Mechanism of DNA methylation: the double role of DNA as a substrate and as a cofactor. *J Mol Biol* **400**(3): 632-644.
184. Zhang, X. and Bruice, T. C. (2006). The mechanism of M.HhaI DNA C5 cytosine methyltransferase enzyme: a quantum mechanics/molecular mechanics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(16): 6148-6153.