

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Zita Liutkevičiūtė

**DNR CITOZINO METILTRANSFERAZIŲ REAKCIJOS,
NEDALYVAUJANT KOFAKTORIUI**

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2007-2011 m. Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute.

Mokslinis vadovas Prof. habil. dr. **Saulius Klimašauskas** (Vilniaus universitetas; fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	5
ĮVADAS	7
1 LITERATŪROS APŽVALGA	11
1.1 DNR modifikacijų biologinė reikšmė.....	11
1.1.1 DNR metilinimo reikšmė prokariotuose	12
1.1.2 DNR metilinimo skirtumai ir panašumai įvairiuose eukariotuose.....	14
1.1.3 DNR metilinimo funkcijos žinduoliuose	17
1.1.4 5-hidroksimetilcitozinas – nauja seniai atrasta bazė.....	19
1.1.5 DNR demetilinimas.....	23
1.1.6 Eukariotinių metiltransferazių grupės.....	27
1.2 DNR citozino-5 metiltransferazės (modelis – M.HhaI).....	31
1.2.1 Pirminė ir erdvinė struktūra	32
1.2.2 Bazės išsukimas	33
1.2.3 Katalitinis ir kinetinis veikimo mechanizmas.....	34
1.2.4 DNR metiltransferazių panaudojimas biotechnologijoje.....	37
1.3 Fermentų vykdomo DNR bazės išsukimo tyrimo metodai.....	39
2 MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI.....	44
2.1 Medžiagos	44
2.1.1 Reagentai.....	44
2.1.2 Radioaktyvios medžiagos	44
2.1.3 Fermentai	44
2.1.4 Buferiniai ir kiti tirpalai	45
2.1.5 Sintetiniai oligonukleotidai.....	45
2.2 Metodai	46
2.2.1 DNR manipuliacijos <i>in vitro</i> metodai	46
2.2.1.1 Oligonukleotido 5'-galo fosforilinimas.....	46
2.2.1.2 Dvigrandžių oligonukleotidų paruošimas	47
2.2.1.3 Oligonukleotidų paruošimas plonasluoksnės chromatografijos eksperimentams.....	47
2.2.1.4 DNR išsodinimas	48
2.2.1.5 DNR veikimas piperidinu	48
2.2.1.6 Cheminis DNR sekos nustatymas: purinų takelio paruošimas	48
2.2.1.7 PGR fragmentų ruošimas	48
2.2.2 Reakcijos su egzogeniniais reagentais.....	49
2.2.3 Fermento-DNR sąveikos tyrimas elektroforetinio judrumo poslinkio poliakrilamidiniame gelyje metodu	50
2.2.4 Elektroforetinis DNR frakcionavimas denatūruojančiomis sąlygomis.....	50
2.2.5 Vienkryptė ir dvikryptė plonasluoksnė chromatografija	50
2.2.6 Aukšto slėgio skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos metodas	51
2.2.7 Plazmidinės pUC19 DNR žymėjimas M.HhaI taikiniuose.....	52
2.2.8 PGR fragmentų, turinčių hmC, žymėjimas M.SssI taikiniuose.....	52
2.2.9 Žymėjimas biotinu ir hmC turinčios DNR praturtinimas	53
2.2.10 Cheminė modifikuotų nukleozidų sintezė.....	54
2.2.10.1 5-hidroksimetil-2'-deoksicitidino (hmC) sintezė	54
2.2.10.2 5-hidroksimetil-2'-deoksiuridino (hmU) sintezė.....	54

2.2.10.3 5-(2-hidroksietiltio)metil-2'-deoksiuridino (hetmU) sintezė	55
2.2.10.4 Fermentiškai susintetinto hetmC deamininimas iki hetmU	55
3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	56
3.1 2-chloroacetaldehido panaudojimas, tiriant fermentų vykdomą citozino išsukimą iš DNR spiralės	56
3.1.1 Išsukto citozino identifikavimas 2-chloroacetaldehidu metiltransferazių-DNR kompleksuose	57
3.1.2 Išsukto citozino identifikavimas 2-chloroacetaldehidu restrikcijos endonukleazių-DNR kompleksuose	60
3.2 Netipinės DNR citozino-5 metiltransferazių reakcijos	61
3.2.1 2-chloroacetaldehido ir citozino reakcijos produktų analizė plonasluoksnės chromatografijos metodu	63
3.2.2 Metiltransferazių katalizuojama aldehydų reakcija su taikinio citozinais, susidarant 5-(1-hidroksialkil)citozinams	65
3.2.3 2-chloroacetaldehido ir citozino reakcijos produktų tyrimas skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos metodu	69
3.2.4 Metiltransferazių katalizuojamas 5-(1-hidroksialkil)citozinių vertimas į nemodifikuotus citozinius	72
3.2.5 Metiltransferazių katalizuojama 5-hidroksimetilcitozino reakcija su tioliais ir selenoliais	73
3.2.6 Netipinių metiltransferazių katalizuojamų reakcijų mechanizmai	76
3.2.7 Metiltransferazių katalizuojamų netipinių reakcijų panaudojimas	81
3.3 Rezultatų aptarimas	84
3.3.1 Cheminis fermentų vykdomo citozino išsukimo tyrimo metodas	84
3.3.2 Netipinės DNR citozino-5 metiltransferazių katalizuojamos reakcijos	85
3.3.2.1 Metiltransferazių katalizuojamų netipinių reakcijų sąsaja su 5-hidroksimetilcitozino atsiradimu ir demetilinimu eukariotinėje DNR	86
3.3.2.2 Metiltransferazių katalizuojamų netipinių reakcijų panaudojimas	89
IŠVADOS	93
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	94
FINANSINĖ PARAMA	95
CURRICULUM VITAE	96
PADĖKA	97
LITERATŪROS SĄRAŠAS	98

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

2AP	2-aminopurinas
2D-TLC	dvikryptė plonasluoksni chromotografija, nuo angl. two-dimensional thin layer chromatography
4mC	N ⁴ -metil-2'-deoksicitozinas
6mA	N ⁶ -metil-2'-deoksiadeninas
AA	acetaldehidas
ar.	aminorūgštis (aminorūgštys)
a.v.	aktyvumo vienetas
BSA	jaučio serumo albuminas
BMR	branduolio magnetinis rezonansas
Caa	chloroacetaldehidas
caC	5-karboksi-2'-deoksicitozinas
DTT	1,4-ditiotreitolis
dg	dvigrandė
dR	2-deoksiribozė
FA	formaldehidas
fC	5-formil-2'-deoksiuridinas
HPLC-MS	aukšto slėgio skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodas, nuo angl. high-performance liquid chromatography – mass spectrometry
heC	5-(1-hidroksietil)-2'-deoksicitozinas
hcC	5-(1-hidroksi-2-chloretil)-2'-deoksicitozinas
hetmC	5-(2-hidroksietiltio)metil-2'-deoksicitozinas
hetmU	5-(2-hidroksietiltio)metil-2'-deoksiuridinas
hmC, H	5-hidroksimetil-2'-deoksicitozinas
hmU	5-hidroksimetil-2'-deoksiuridinas
hpC	5-(1-hidroksipropil)-2'-deoksicitozinas
HRMS	aukštos skiriamosios gebos spektroskopija, nuo angl. high-resolution mass spectrometry

k.t.	kambario temperatūroje
M. arba MTazė	metiltransferazė
mTAG	metodas, skirtas specifinių DNR sekų žymėjimui, kuriame metiltransferazės perneša funkcinės grupės nuo sintetinių kofaktoriaus analogų ant DNR, nuo angl. methyltransferase-directed transfer of activated groups
mC, M	5-metilcitozinas
NHS	N-hidroksisukcinimidas
PA	propanalis
PAA	poliakrilamidinis
R. arba REazė	restrikcijos endonukleazė
RM	restrikcija-modifikacija
SAH	S-adenozil-L-homocisteinas
SAM	S-adenozil-L-metioninas
vg	viengrandė
TLC	plonasluoksnė chromatografija, nuo angl. thin layer chromatography
UDP-glc	uridinil-(1-gliukozil)difosfatas
UV	ultravioletinė šviesa
εC	N ³ ,N ⁴ -eteno-2'-deoksicitozinas
ε ^{hid} C	N ⁴ ,N ³ -(1-hidroksietil)-2'-deoksicitozinas
wt	laukinis tipas, nuo angl. wild type
*	radioaktyvia žyme 5' gale pažymėtas oligonukleotidas

Tekste naudojami standartiniai aminorūgščių pavadinimų vienos ar trijų raidžių sutrumpinimai.

dC ir C bei panašūs kitų heterobazių trumpinimai vartojami kaip sinonimai 2'-deoksinukleotidų/2'-deoksinukleozidų bet ne ribonukleotidų/ribonukleozidų apibūdinimui.

ĮVADAS

Gyvų organizmų genetinę informaciją sauganti ir perduodanti makromolekulė deoksinukleorūgštis (DNR) yra sudaryta iš 4 pagrindinių heterociklinių bazių: timino (T), adenino (A), guanino (G) ir citozino (C). Penkta minorinė bazė – 5-metilcitozinas (mC) – eukariotinėje DNR buvo atrasta keli metai prieš garsųjį Watson-Crick DNR struktūros modelį (Hotchkiss, 1948; Watson ir Crick, 1953) ir yra intensyviai tyrinėjama iki šių laikų (Razin ir Riggs, 1980; Zemach ir kt., 2010). mC eukariotuose yra epigenetinis žymuo, kuris kartu su kitais veiksniais apsprendžia chromatinio aktyvumą: genų raiškos pobūdį, parazitinių genomo elementų ir žinduolių moteriškos lyties vienos iš X chromosomų nutildymą, dalyvauja imprintinge, mutagenezėje, DNR pažaidų taisyme ir rekombinacijoje (Goll ir Bestor, 2005). Genominėje DNR mC atsiranda dėl fermentų DNR citozino-5 metiltransferazių (MTazių), kurios perneša metilgrupę nuo kofaktoriaus S-adenozil-L-metionino ant citozino jau susintetintoje DNR. Ilgą laiką buvo manyta, kad mC yra stabili modifikacija, kurios kiekis gali mažėti pasyviai, t.y. dalijantis ląstelei ir skiedžiantis metilintai DNR, jei MTazės yra neaktyvios. Vis dėlto, globalus demetilinimas buvo pastebėtas tėvinėje DNR prieš pirmą zigotos pasidalijimą ir pirminėse lytinėse ląstelėse, o lokalus – neuronų promotoriuose ir kitose nesidalijančiose ląstelėse – tai neabejotinai reiškia, kad egzistuoja aktyvus demetilinimo kelias. Tiksliau, demetilinimo keliai, kurių šiuo metu yra pasiūlyti bent keli (Wu ir Zhang, 2010; Nabel ir kt., 2011). Demetilinimo tyrimai ypač suintensyvėjo prieš kelis metus, kai eukariotinėje DNR buvo surasta dar viena modifikuota bazė – 5-hidroksimetilcitozinas (hmC), kurios kiekiai gali siekti beveik 40% mC tam tikrose nervinio audinio ląstelėse (Kriaucionis ir Heintz, 2009; Tahiliani ir kt., 2009). Netrukus kamieninėse embrioninėse ląstelėse buvo identifikuoti 5-formilcitozinas (fC) ir 5-karboksicitozinas (caC) (He ir kt., 2011; Ito ir kt., 2011), tiesa, labai mažais kiekiais, bet visiškai sugriaunantys mitą apie DNR nekintamumą. Pastarosios trys modifikacijos (hmC, fC ir caC) genominėje DNR atsiranda iš mC, veikiant

fermentams oksogenazėms Tet1,2,3, kurių mutacijos yra susijusios su kai kuriomis leukemijos formomis (Tahiliani ir kt., 2009). Taigi, kai atrodė, kad jau beveik viskas žinoma apie eukariotinę DNR, buvo atrastos naujos bazės ir nauji fermentai, modifikuojantys DNR. Parodyta, kad šios modifikacijos yra tarpiniai mC demetilavimo produktai. Iš šios trijulės reikia išskirti hmC, kuris yra stabili modifikacija, tam tikrose vystymosi stadijose ir kai kuriuose audiniuose randama dideliais kiekiais (Li ir Liu, 2011; Munzel ir kt., 2011). Tiksliai hmC reikšmė epigenetikoje ir DNR demetilavime bus atskleista ateityje, nes šiuo metu trūksta metodų, galinčių nustatyti hidroksimetilintas vietas DNR (Nabel ir kt., 2011). Metodai, naudoti mC tyrimams, neatskiria citozino metilavimo nuo hidroksimetilavimo, todėl naujų metodų sukūrimas, leidžiantis tirti mC ir hmC pozicijas genome yra labai pageidaujamas (Huang ir kt., 2010; Jin ir kt., 2010; Nestor ir kt., 2010).

Mūsų tyrimai prasidėjo nuo modelinės prokariotinės MTazės M.HhaI, kuri yra intensyviai tyrinėjama jau 20 metų. Išsprendus trinario komplekso M.HhaI-DNR-SAH struktūrą, pirmą kartą buvo parodytas elegantiškas DNR deformacijos būdas: taikinio citozinas yra išsukamas 180° kampu iš dvigrandės DNR į aktyvų fermento centrą (Klimašauskas ir kt., 1994). Vėliau buvo nustatyta, kad daugelis su DNR sąveikaujančių baltymų, panašiai kaip ir M.HhaI, išsuka bazes iš DNR spiralės (Cheng ir Blumenthal, 1996). Šie atradimai paskatino kurti naujus metodus, įgalinančius tirti bazių išsukimą. Nusprendėme, kad aprašytos 2-chloroacetaldehido (Caa) reakcijos su nesuporuotomis bazėmis galėtų pasitarnauti ir baltymų-DNR tyrimams, paprastai ir greitai identifikuojant fermentų išsuktus citozinas (Kohwi-Shigematsu ir Kohwi, 1992). Eksperimentai parodė, kad šiuo metodu gali būti tyrinėjamos tiek MTazės, tiek restrikcijos endonukleazės (Daujotytė ir kt., 2008). Detalesni susidariusių produktų tyrimai po Caa reakcijos atskleidė, kad MTazių išsukamas citozinas yra modifikuojamas netradiciškai. Išbandžius keletą elektrofilų paaiškėjo, kad MTazės geba prijungti trumpus alifatinius aldehidus prie taikinio citozino 5 atomo, susidarant 1-hidroksialkylcitozinams (Liutkevičiūtė ir kt., 2009). Pažymėtina, kad MTazės dideliu efektyvumu

prijungia formaldehidą, susidarant hmC – šeštai DNR bazei, neseniai surastai žinduolių DNR. MTazės taip pat geba katalizuoti grįžtamą reakciją: hmC virtimą į citoziną. Dar viena atrasta netipinė citozino-5 MTazių reakcija – taikinyje esančio hmC modifikacija alkiltioliais ir alkilselenoliais, susidarant 5-chalkogenometilcitozinams. Pastaroji reakcija gali būti panaudota praktiškai genomines DNR tyrimams, nustatant hmC pozicijas genome (Liutkevičiūtė ir kt., 2011). Atrastos netipinės DNR citozino-5 metiltransferazių reakcijos atskleidė, kad fermentų aktyvus centras gali būti plastiškesnis, nei manyta iki šiol. *In vitro* eksperimentai rodo, kad tam tikromis sąlygomis fermentai gali katalizuoti jiems nebūdingas reakcijas. Šiame etape sunku įvertinti, ar panašios reakcijos galėtų vykti *in vivo*, tačiau MTazių svarba, modifikuojant DNR gyvuosiuose organizmuose (ne tik metilinant, bet ir hidroksimetilinant bei demetilinant), turėtų būti atidžiai peržiūrėta.

Pagrindiniai darbo tikslai ir uždaviniai

1) Ištirti 2-haloacetaldehidų cheminį reaktyvumą baltymo-DNR kompleksuose, siekiant pritaikyti šią reakciją DNR metiltransferazių ir restrikcijos endonukleazių išsuktų citozinų tyrimams.

2) Ištirti naujai atrastos DNR citozino-5 metiltransferazių katalizuojamos citozino reakcijos su nekofaktoriniais elektrofiliniais junginiais produktus, sąlygas ir mechanizmą.

3) Ištirti naujai atrastos DNR citozino-5 metiltransferazių katalizuojamos 5-hidroksimetilcitozino kondensacijos su nekofaktoriniais nukleofiliniais junginiais produktus, sąlygas ir mechanizmą.

4) Ištirti naujų netipinių DNR citozino-5 metiltransferazių reakcijų praktinio pritaikymo galimybes žinduolių genomines DNR tyrimams.

Mokslinis naujumas

Šiame darbe pirmą kartą buvo pademonstruota, kad citozino-5 MTazės, nesant natūralaus kofaktoriaus, katalizuoja netipines reakcijas: trumpų alifatinių aldehidų prijungimą, susidarant 5-(1-hidroksialkil)citozinams, pastarųjų virtimą į nemodifikuotus citozinus ir tolimesnę modifikaciją,

prijungiant alkiloliolius ir alkilselenolius ir susidarant 5-chalkogenometilcitozinams.

Išbandytas ir optimizuotas naujas cheminis metodas, panaudojant Caa, fermentų vykdomam citozino išsukimui tirti. Šis metodas yra paprastas, greitas, nereikalauja sudėtingos įrangos ir tiria natūralios bazės – citozino – išsukimą. Parodyta, kad dviejų skirtingų klasių fermentai – citozino-5 metiltransferazės ir restrikcijos endonuklezės – gali būti tiriamos šiuo metodu.

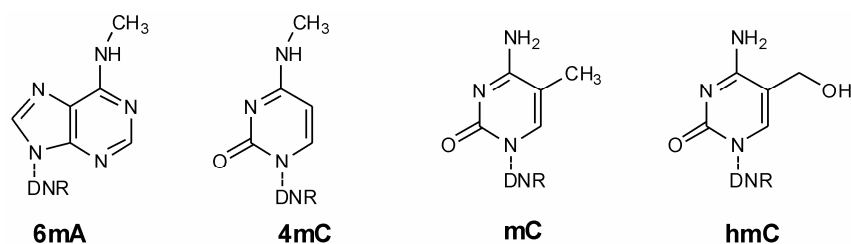
Praktinė reikšmė

Netipinės citozino-5 MTazių reakcijos gali būti pritaikytos DNR tyrimams, nustatant hmC pasiskirstymą genome. hmC yra nauja eukariotinėje DNR atrasta bazė, kurios paplitimas ir biologinė reikšmė yra intensyvių tyrimų objektas, o tyrimo metodų, kurie efektyviai atskirtų hmC nuo mC, labai trūksta. Naujai atrastos reakcijos leidžia kovalentiškai pažymėti hmC bazes CG dinukleotiduose, o po to praturtinti hmC turinčius genominius fragmentus. Šios reakcijos taip pat gali būti panaudotos kovalentiniam DNR žymėjimui MTazių atpažįstamosiose sekose.

1 LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 DNR modifikacijų biologinė reikšmė

DNR be 4 pagrindinių heterociklinių bazių G, A, T ir C taip pat randami tam tikri kiekiai įvairių modifikuotų bazių. Modifikacijos atsiranda dėl kenksmingo aplinkos ar metabolitų poveikio ir yra greitai pataisomos į pradines bazes arba yra ilgalaikės, pačio organizmo sukuriamos, ir turi svarbias biologines funkcijas. DNR bazių modifikacijos bei didelės prijungtos grupės (glutamatas, gliukozė, genobiozė ir kt.) yra ypač būdingos bakteriofagams (Warren, 1980), tačiau likusiame gyvajame pasaulyje vyrauja minimali modifikacija – metilgrupė. Metilgrupės pernešimą nuo kofaktoriaus S-adenozil-L-metionino (SAM) katalizuoja fermentai DNR metiltransferazės (MTazės). Reakcijos produktai yra S-adenozil-L-homocisteinas (SAH) ir trys minorinės bazės: N⁴-metilcitozinas (4mC), 5-metilcitozinas (mC) ir N⁶-metiladeninas (6mA) (pav. 1.1). 4mC ir 6mA metiltransferazes galima apjungti į vieną grupę, nes jos modifikuoja egzociklines aminogrupes (Timinskas ir kt., 1995) ir, be kelių išimčių, yra sutinkamos tik prokariotuose (Wion ir Casadesus, 2006). mC yra paplitęs plačiausiai ir randamas tiek eukariotų, tiek prokariotų DNR. Eukariotuose metilinimas yra epigenetinė modifikacija, kuri kartu su kitais veiksniais lemia DNR struktūrą (euchromatinas ar heterochromatinas), genų ir genomo parazitinių elementų raišką organizme ir kt. Visai neseniai eukariotinių organizmų DNR buvo surasta dar viena modifikuota bazė – 5-hidroksimetilcitozinas (hmC) (pav. 1.1). Ši modifikacija yra intensyviai tyrinėjama, siekiant nustatyti jos biologinę prasmę (Kriaučionis ir Heintz, 2009; Tahiliani ir kt., 2009).



Paveikslas 1.1. Keturios modifikuotos bazės.

1.1.1 DNR metilinimo reikšmė prokariotuose

Pagal ląstelėje atliekamas funkcijas prokariotinės MTazės galima suskirstyti į tris grupes: 1) MTazės, kurios randamos kartu su giminingomis restrikcijos endonukleazėmis ir priklauso restrikcijos-modifikacijos (RM) sistemoms; 2) MTazės, kurios neturi atitinkamos endonukleazės (Dam, CcrM ir Dcm MTazės); 3) antirestrikcinės MTazės, kurios užtikrina svetimos DNR išgyvenimą ląstelėje, nes veikia kaip antirestrikciniai fermentai prieš šeimininko endonukleazės (Dryden, 1999).

Restrikcijos-modifikacijos (RM) sistemos. RM sistemoms priskiriama didžioji dauguma MTazių. Svarbiausia RM fermentų funkcija yra apsauga nuo svetimos DNR. RM sistema susideda iš restrikcijos endonukleazės (REazės) ir MTazės, kurios abi atpažįsta tą patį DNR taikinį. REazė skelia DNR, jei nė viena DNR grandinė nėra metilinta. RM sistemos REazė nekarpo savos DNR, nes ji yra arba visiškai metilinta, arba po DNR replikacijos yra metilinta tik viena DNR grandinė. Fagų DNR neturi specifinių metilintų seku, todėl yra sukarpoma (Dryden, 1999). Kita teorija teigia, kad RM sistemos yra savanaudžiai elementai, gyvenantys bakterijose. Pagrindinis to įrodymas yra ląstelės žūtis, praradus genus, koduojančius RM sistemą: ilgainiui MTazė nebepajėgia metilinti visų savo taikinių, o REazė tuos taikinius perkerpa, nužudydama ląstelę-šeimininkę (Kobayashi, 2001). Kai kurių RM sistemų endonukleazė ir MTazė sudaro vieną bifunkcinį fermentą. Kitos, paprastesnės RM sistemos (II tipo), susideda iš dviejų atskirų MTazės ir endonukleazės fermentų. II tipo REazės yra plačiai pritaikytos praktiškai, norint perkirpti konkrečias DNR vietas, ir intensyviai tyrinėjamos, siekiant išsiaiškinti visuotinius baltymo-DNR sąveikos principus (Dryden, 1999).

Dam ir CcrM (nuo angl. cell-cycle regulated MTase) MTazės. Dam ir CcrM yra procesyvos adenininės MTazės, atpažįstančios atinkamai GATC ir GANTC sekas bei randamos γ -proteobakterijose (Dam) ir α -proteobakterijose (CcrM). Manoma, kad jos išsivystė nepriklausomai viena nuo kitos iš RM sistemų, praradusių restrikcijos endonukleazę. Dam yra atsakinga už didžiausią metilintos DNR dalį *E. coli*. Dėka Dam metilinimo

Mut reparacijos sistema gali atskirti, kuri DNR grandinė yra naujai susintetinta, ir pašalinti neteisingai suporuotus DNR nukleotidus po DNR replikacijos. Dam taip pat kontroliuoja chromosomų replikacijos pradžią, reikiamą nukleosomos susivyniojimą, genų raišką ir transpoziciją. Kai kurioms rūšims, bet ne *E. coli*, ji yra būtina išgyvenimui. Dam metilinimas reguliuoja per 20 genų, kurie indukuojami *Salmonella typhimurium* infekcijos metu. *S. typhimurium dam* mutantai buvo antivirulentiniai ir galėjo būti panaudoti kaip gyva vakcina. Kitų bakterijų rūšių ir kamienų patogeniškumas taip pat susijęs su Dam ir CcrM metiliniu. CcrM, kuri randama *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium meliloti*, *Caulobacter crescentus* ir kitose α -proteobakterijose, yra susijusi su ląstelės ciklo reguliacija ir yra gyvybiškai būtina. Kai kurie virusai taip pat koduoja Dam MTazes. Virusas P1 Dam MTazė yra atsakinga už teisingą DNR supakavimą į viruso galvutę (Dryden, 1999; Wion ir Casadesus, 2006; Marinus ir Casadesus, 2009).

6mA buvo rastas ir kai kuriuose eukariotuose: šarvadumbliuose (lot. k., Dinoflagellata), žaliadumbliuose (lot. k., Chlorophyta; *Chlamydomonas reinhardtii*), pelėsiniam grybe *Penicillium chrysogenum*, kviečių diegiamakštėje (koleoptilėje) bei blakstenuotosiuose (lot. k., Ciliates). Pastarieji turi 2 skirtingus branduolius, mažąjį ir didįjį, o 6mA yra būdingas tik didžiajam branduoliui. Biologinė 6mA funkcija bei fermentai, metilinantys adeniną eukariotuose, nėra ištirti (Wion ir Casadesus, 2006; Iyer ir kt., 2011).

Dcm MTazė. Dcm yra *E. coli* mC MTazė, kuri metilina antrąjį citoziną sekoje CC(A/T)GG. Dcm ištrynimasis nepasireiškia fenotipiškai, todėl biologinės funkcijos nėra žinomos. Tačiau kiekvienas mC po spontaninio deaminavimo gali virsti į timiną. Dėl to atsiranda klaidingai suporuota T-G pora, o neištaisyta klaida sukelia mutacijas (Dryden, 1999).

Antirestrikinės MTazės. Antirestrikinės MTazes koduoja virusai ir konjugacinės plazmidės. Tai multispecifinės MTazės, modifikuojančios kelis skirtingus trumpus taikinius. Šios MTazės metilina fagų ir plazmidžių DNR įprastuose šeimininko RM sistemų taikiniuose. Tai leidžia svetimai DNR išgyventi ir replikuotis ląstelėje šeimininkėje (Dryden, 1999).

1.1.2 DNR metilinimo skirtumai ir panašumai įvairiuose eukariotuose

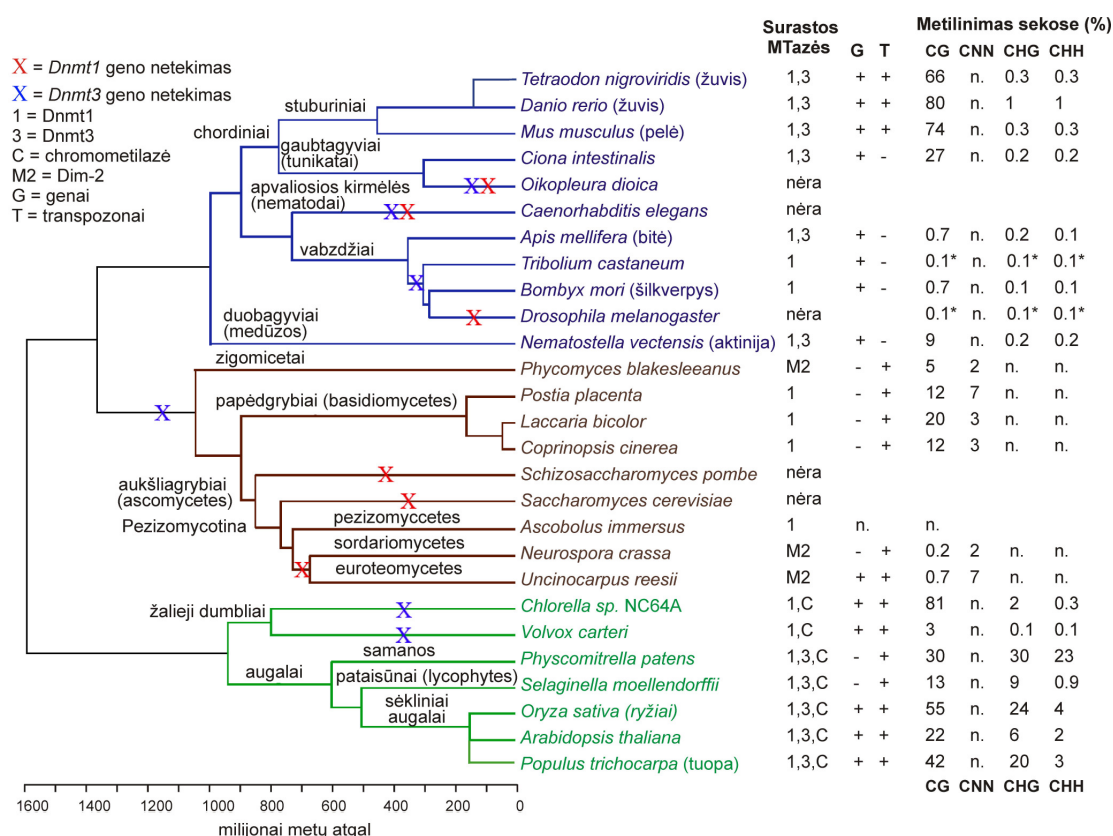
Eukariotuose, be kelių išimčių, yra aptinkamas tik mC. Apibendrintas vaizdas apie mC kiekį ir pasiskirstymą įvairių organizmų genomuose buvo gautas, atlikus DNR sekoskaitą po bisulfito reakcijos (pav. 1.2) (Feng ir kt., 2010; Jeltsch, 2010; Zemach ir kt., 2010) Dabar jau žinoma, kad bisulfitas neatskiria mC ir hmC (Huang ir kt., 2010; Jin ir kt., 2010; Nestor ir kt., 2010), taigi tolimesni tyrimai gali šiek tiek pakoreguoti toliau aprašytus rezultatus.

Reikia pažymėti, kad kai kurių eukariotų rūšių DNR mC nebuvo surastas. Tai apvaliosioms kirmėlėms priklausantis *Caenorhabditis elegans* (Simpson et al., 1986), mielės *Saccharomyces cerevisiae* (Proffitt ir kt., 1984) ir *Scizosaccharomyces pombe* (Antequera ir Birds, 1993). Vabzdžiuose *Drosophila melanogaster* (dvisparnių būrys) ir *Tribolium castaneum* (vabalų būrys) mC nėra arba yra labai maži kiekiai. Tačiau kituose bestuburiuose, tarp jų ir labai gimininguose, mC buvo aptiktas (bitėje, šilkverpyje, duobagyvyje *Nematostella vectensis*). Metilinimo tankumas taip pat yra labai įvairus: pradedant nuo 1% bitėje bei šilkverpyje (žemas metilinimo lygis) ir baigiant 25-80% žiediniuose augaluose bei stuburiniuose (žuvyse ir žinduoliuose) (aukštas metilinimo lygis). Tarpe tarp žemo ir aukšto metilinimo lygio vidutiniškai metilinti yra grybai ir dumbliai, tačiau tarp giminingų rūšių metilinimo kiekis gali būti labai skirtingas, pvz. apie 10% metilinimas sutinkamas dumbliuose *Chlamydomonas reinhardtii* ir *Volvox carteri*, tačiau *Chlorella sp.* pasižymi labai dideliu metilinimo lygiu (80%). Stuburiniuose metilintas citozinas yra randamas beveik tik CG sekose (70-80% CG sekų yra metilinta). Už šių sekų metilinimą yra atsakinga metiltransferazė Dnmt1, tuo tarpu už ne CG sekų metilinimą, kuris genome sutinkamas iki 1%, yra atsakingi Dnmt3 fermentai. Kai kuriuose grybuose didžiausia metilinimo dalis yra ne CG sekose. Už šį metilinimą yra atsakingi grybams specifiniai Dnmt1 pošeimio atstovai – Dim-2 fermentai – ir, tikėtina, kitos Dnmt šeimos. Augaluose ne CG metilinimas yra paplitęs ir gali sudaryti nemažą kiekį.

Augaluose už CG metilinimą yra atsakingi Met1 fermentai (augalų Dnmt1 pošeimis), CHG (H – A, C, T) sekas metilina augalams specifinės chromometiltransferazės, o CHH sekas – augalų Dnmt3 pošeimio atstovai (Feng ir kt., 2010; Jeltsch, 2010; Zemach ir kt., 2010).

Skirtingas metiltransferazių kiekis ir metilinimo lygis tarp įvairių organizmų leidžia daryti prielaidą, kad paskutinis bendras augalų, grybų ir gyvūnų protėvis turėjo veikiančią metilinimo sistemą, sudarytą iš Dnmt1, Dnmt3 ir greičiausiai CMT/Dim-2 (tikėtina, kad CMT/Dim-2 yra monofilatinės kilmės) metiltransferazių. Ši sistema vienuose organizmuose vystėsi toliau, o kituose – neteko savo funkcijų. Tikėtina, kad pradžioje metilinimo lygis buvo mažas arba vidutinis ir daugiausia buvo metilinti genai, o transpozonų metilinimas išsivystė nepriklausomai augaluose ir grybuose (būdingas ne tik CG transpozonų metilinimas) bei gyvūnuose (būdingas tik CG metilinimas), kaip ir imprintuojamų genų metilinimas. Metilinimo padidėjimas būtent CG sekose genuose yra pastebėtas beveik visuose tirtuose organizmuose išskyrus, daugumą grybų ir anksti evoliucijoje atsiskyrusius augalus *Physcomitrella patens* ir *Selaginella moellendorffii*, kuriems nebūdingas metilinimas genuose ir šalia genų esančiose sekose. Metilinimas genuose paraboliskai koreliuoja su genų raiška: labiausiai metilinti yra vidutine raiška pasižymintys genai, o mažesnis metilinimas yra būdingas žemiausios ir aukščiausios raiškos genams. Promotorių metilinimas atvirkščiai koreliuoja su genų raiška: metilinimas genų promotoriuose slopina genų raišką, tačiau ši koreliacija nėra būdinga ištirtiems vabzdžiams, duobagyviams ir gaubtagyviams. Taip pat pastebėta, kad egzoni yra labiau metilinti už intronus, o geno pabaigoje yra stebimas metilinimo sumažėjimas kaip ir prieš pat transkripcijos pradžią. Šie duomenys leidžia manyti, kad DNR metilinimas yra svarbus transkripcijos iniciacijoje, elongacijoje ir terminacijoje bei alternatyviame splaisinge. Genomų parazitų – transpozonų – slopinimas metilinimu yra būdingas augalams, pradedant dumbliais, grybams ir stuburiniams. Vabzdžiams ir chordiniams gaubtagyviams (lot. Tunicata), turintiems daug transpozonų, gausus jų metilinimas nėra būdingas. Išaugęs

metilinimo lygis aukštesniuose organizmuose, tikėtina, yra susijęs su padidėjusiu epigenetinės reguliacijos poreikiu, formuojantis įvairiems ląstelių tipams bei kovojant su genomo parazitais – transpozonais, kurie žmoguje sudaro ~40% genomines DNR. Organizmai, kurių transpozonai nemetilinti, naudoja kitus metodus transpozonų slopinimui: RNR interferencijos mechanizmus arba daugybines mutacijas, kurios atsirado dėl mC mutagenizės (mC geriau deamininasi nei C). Manoma, kad kai kurie organizmai prarado DNR metilinimą, siekiant sumažinti mC mutageniškumą bei energijos sąnaudas, reikalingas DNR metilinimui vykdyti (Feng ir kt., 2010; Jeltsch, 2010; Zemach ir kt., 2010).



Paveikslas 1.2. Eukariotinių organizmų, kurių metilomos yra nustatytos, filogenetinis medis bei MTazių, metilomų sekų ir mC kiekio pasiskirstymas. Dnmt1 šeimos MTazės metilina CG sekas, Dnmt3 – CHH, chromometiltransferazės (būdingos tik augalams) – CHG, Dim-2 (būdingos grybams) – CNN sekas (H – A, C, T; N – bet kuris nukleotidas). "+" ir "-" "G" ir "T" eilutėse atitinkamai reiškia metilinimą arba nemetilinimą genuose ir transpozonuose. *A. immersus* genomo seka nėra nustatyta iki galo, taigi šis grybas gali turėti ir kitų MTazių, pvz. Dim-2. "n." – nenustatyta; "*" – *D. melanogaster* ir *T. castaneum* nustatytas mC kiekis yra ties detekcijos riba. Kiti paaiškinimai pateikti paveiksle. Paruošta, remiantis literatūriniais duomenimis (Feng ir kt., 2010; Jeltsch, 2010; Zemach ir kt., 2010).

1.1.3 DNR metilinimo funkcijos žinduoliuose

DNR metilinimas kartu su potransliacinėmis histonų modifikacijomis, histonų variantais ir su chromatinu sąveikaujančiais baltymais sudaro epigenetinį kodą, kuris nekeičia DNR sekos, tačiau lemia DNR struktūrą (heterohromatinas ar euchromatinas), nuo kurios priklauso genų raiškos lygis. Taigi, citozino metilinimas kartu su kitais epigenetinio kodo veikėjais padidina genome užkoduotos informacijos kiekį ir dalyvauja daugelyje eukariotinėse ląstelėse vykstančių procesų: transpozonų, endogeninių retrovirusų ir X chromosomos transkripcijos slopinime, genomo imprintinge, DNR reparacijoje ir rekombinacijoje (Goll ir Bestor, 2005). Daug žmogaus ligų yra susijusios su metilinimo sutrikimais (Robertson, 2005).

Žinduolių genomas turi 4 kartus mažiau CG sekų, palyginus su atsitiktine statistine reikšme, tačiau 10-20 kartų praturtintos CG sekomis salelės dažnai randamos genų 5' gale ir pirmuosiuose egzonuose. Tokias CG saleles turi net 76% žmogaus genų. Šių salelių metilinimas slopina transkripciją, tačiau dalis CG salelių būna nemetilintos visose vystymosi pakopose ir visuose audiniuose net tada, kai šie genai yra užtildyti. Prie metilintų CG jungiasi su metilinta CG sąveikaujantys baltymai, kurie neleidžia jungtis transkripcijos aktyvatoriams. Vieno iš jų – MeCP2 (nuo angl. methylcytosine-binding protein 2) – mutacija yra Rett sindromo (liga, sutinkama 1 iš 10000 moteriškos lyties kūdikių, pasireiškia sutrikusiu smegenų vystymusi) priežastis, o kito – MBD3 ištrynimasis yra letalus pelėms (Robertson ir Wolffe, 2000; Bogdanovic ir Veenstra, 2009). Heterochromatino, X chromosomos ir imprintuojamų genų CG salelės yra smarkiai metilintos, ir čia transkripcija nevyksta. Transpozonų CG salelės taip pat yra stipriai metilintos – tai užtikrina jų nuslopinimą. Tokie parazitiniai DNR elementai sudaro beveik 40% žmogaus genomo, kai egzonai – tik 5%. Aktyvinti transpozonai gali sutrikdyti šeimininko genų nuskaitymą, skatina insercinę mutagenezę, rekombinaciją tarp nealelinių genų ir taip destabilizuoja genomą (Robertson ir Wolffe, 2000).

Išanalizavus grybo *Ascobus immersus* žinomą "karštą" rekombinacijos tašką ir žinduolių ląstelių V(D)J rekombinaciją, paaiškėjo, kad metilinta DNR rekombinuoja daug mažesniu dažniu (100 ir daugiau kartų). Taip pat stebimi didžiuliai rekombinacijos dažnio skirtumai tarp imprintuojamų regionų moteriškose ir vyriškose lytinėse ląstelėse mejozės stadijoje. Koku būdu DNR metilinimas blokuoja homologinę rekombinaciją, nėra žinoma. Galbūt tai susiję su rekombinacijos pradinių taškų paslėpimu, tarpinių junginių destabilizavimu bei rekombinacijos ir metilinimo mechanizmų komponentų susirinkimo persidengimu (Robertson ir Wolffe, 2000).

5mC deamininimas į timiną yra pagrindinė gamtinių mutacijų priežastis. *Neurospora crassa* ir kitų grybų pasikartojantys genomo elementai yra nuslopinti ne tik dėl mC, bet ir dėl didelio skaičiaus C į T mutacijų. Generatyvinių ląstelių mutacijos sukelia palikuonių ligas, o somatinių – vėžį. Vėžys vystosi ne tik dėl mutacijų genuose, reguliuojančiuose ląstelės augimą ir vystymąsi, bet ir dėl šių genų promotorių nenormalaus metilinimo, kas sąlygoja jų raiškos pasikeitimus. Pakitęs metilinimo pobūdis gali būti tiek pirminė ligos priežastis, tiek jos pasekmė. Įvairių vėžinių susirgimų atvejais stebimas hipermetilinimas tam tikruose genų promotoriuose, ir viso genomo hipometilinimas. Hipermetilinami ir taip nuslopinami už ląstelių diferenciaciją ir apoptozę atsakingi genai, o tai iššaukia nenormalų ląstelių dalijimąsi ir auglio formavimąsi. Hipometilinimas iššaukia genomo nestabilumą dėl padidėjusio retroelementų aktyvumo, tačiau jo prigimtis nėra aiški, nes vėžinėse ląstelėse yra padidėjusi MTazių raiška. Hiper ir hipometilinimo pobūdis yra skirtingas įvairiems vėžiniams susirgimams. Žmogaus senėjimas ir jam būdingos ligos (širdies ir kraujagyslių, neurologinės degeneratyvinės ligos ir vėžiniai susirgimai) taip pat susijusios su DNR metilinimo pakitimais (Goll ir Bestor, 2005; Robertson, 2005; Schulz ir Dokun, 2009).

Kitas tiesiogiai su metilinimu susijusias ligas galima suskirstyti į kelias grupes: ligos, sukeltos genų mutacijų, susijusių su metilinimo palaikymu, mC atpažinimu ir pan. (imunodeficitu, centromerų nestabilumo ir veido anomalijų (ICF) sindromas (mutacijos *Dnmt3b* gene), Rett sindromas (mutacijos *MeCP2*

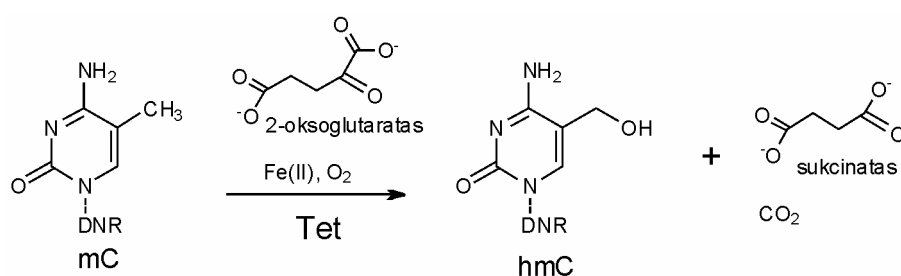
gene)); epigenetinės ligos, sukeltos dėl imprintingo mechanizmo defektų (Angelmano ir Prado-Wilio sindromai); ligos, susijusios su pakitusių pasikartojančių sekų skaičiumi ir jų metilinimu (trapios X sindromas) (Schulz ir Dokun, 2009).

1.1.4 5-hidroksimetilcitozinas – nauja seniai atrasta bazė

5-hidroksimetilcitozinas (hmC) buvo atrastas T-lyginiuose faguose 1953 m. Nuo tada iki 2009 m. buvo manyta, kad hmC yra būdingas tik šiai neląstelinei gyvybės formai (Wyatt ir Cohen, 1953). T-lyginiuose faguose fermentas dCMP hidroksimetiltransferazė sintetina dhmCMP iš dCMP, metilentetrahidrofolato ir vandens. Sintezė vyksta daugiafermentiniame komplekse dNTP sintetazėje, kuri sudaro *E. coli* ir fago baltymai. Čia dhmCMP yra verčiamas į dhmCTP, o pastarasis jau naudojamas DNR sintezėje (Song ir kt., 1999). Taigi, T-lyginiuose faguose vietoje visų citozinių yra hmC, kurie po DNR sintezės toliau modifikuojami, prijungiant gliukozės liekanas (Lehman ir Pratt, 1960; Lunt ir Newton, 1965; Warren, 1980). Gliukozilinima atlieką α ir β gliukoziltransferazės, kurios perneša gliukozę nuo kofaktoriaus uridinil-(1-gliukozil)difosfato (UDP-glc) ant hmC hidroksigrupės, susidarant atitinkamai α arba β glikozidinei jungčiai. Citozino hidroksimetilinimas ir tolimesnės modifikacijos apsaugo T lyginių fagų DNR nuo fago koduojamų nukleazių, tarnauja replikacijos, transkripcijos ir DNR supakavimo signalu, bet svarbiausia funkcija yra apsauga nuo *E. coli* restrikcijos-modifikacijos sistemų (Warren, 1980). Ilgainiui *E. coli* atsirado restrikcijos fermentų, kurie gali kirpti hmC ir glc-hmC turinčią DNR (Janosi ir kt., 1994; Pieper ir kt., 2002; Bair ir Black, 2007).

Ilgą laiką buvo manyta, kad hmC eukariotinėse ląstelėse yra pažaida, kuri atsiranda dėl mC oksidacijos, nors jau 1972 m. pasirodė publikacijos apie didelius hmC kiekius, rastus žinduolių DNR (Penn ir kt., 1972; Penn, 1976). 2009 m. hmC buvo naujai atrastas pelių smegenų ir kitų organų DNR (Kriaučionis ir Heintz, 2009) bei embrioninėse kamieninėse ląstelėse (Tahiliani ir kt., 2009). Bioinformatiniais metodais buvo identifikuoti 3 baltymai: Tet1,

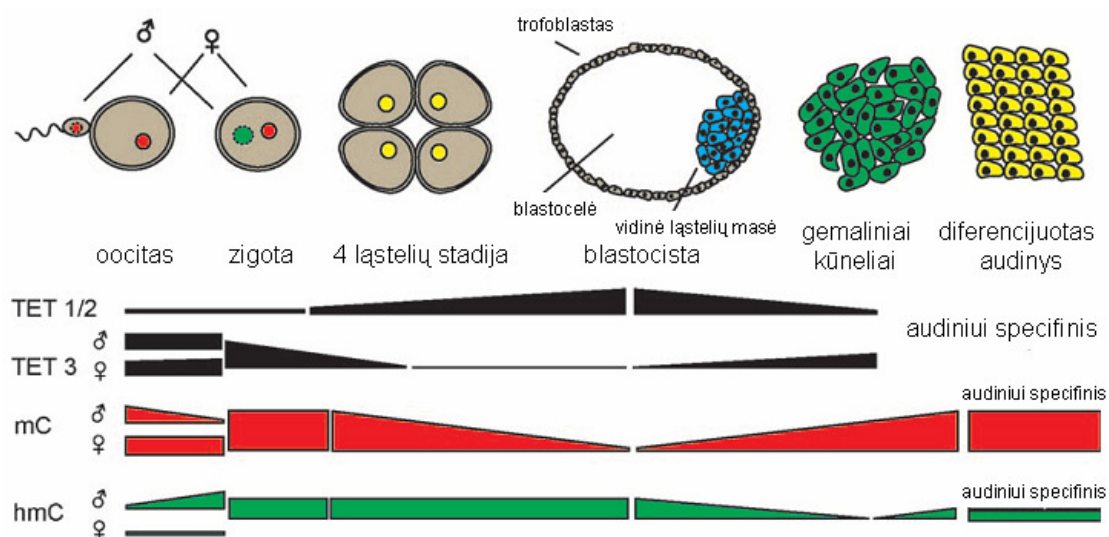
Tet2, Tet3. Jie pasižymi homologija su *Trypanosoma brucei* baltymu JPB2, oksiduojančiu timino metilgrupę (oksiduoti timinai toliau yra modifikuojami, prijungiant gliukozę; tokia modifikuota bazė J sudaro apie 1% visų timinų ir yra būdinga vienalaščiams žiuželiuotiesiems Kinetoplastidų klasės atstovams (*Trypanosoma*, *Leishmania*) ir giminingam dumbliui *Euglena gracilis*; biologinė J bazės funkcija iki šiol nėra iki galo aiški (Sabatini ir kt., 2009)). *In vitro* ir *in vivo* eksperimentai parodė, kad Tet1, 2, 3 oksiduoja mC metilgrupę, susidarant hmC. Šių baltymų veikimui yra būtini 2-oksogliutaratas, deguonis ir Fe(II) (pav. 1.3) (Munzel ir kt., 2011).



Paveikslas 1.3. Tet fermentų katalizuojama reakcija. 5-metilcitozino (mC) metilgrupė yra oksiduojama iki hidrosimetilgupės, susidarant 5-hidrosimetilcitozinui (hmC). Reakcijai būtinas deguonis, divalentė geležis ir 2-oksogliutaratas, kuris dekarboksilinasi iki sukcinato, išsiskiriant anglies dvideginiui.

Kamieninės embrioninės ląstelės pasižymi didele Tet1 ir Tet2 raiška. Manoma, kad šie baltymai yra svarbūs nediferencijuotų ląstelių atsinaujinimo ir neriboto augimo palaikymo veiksniai. Tiksliai Tet1 ir Tet2 veikimo schema nėra aiški. Viena mokslininkų grupė nurodo, kad Tet1 demetilina Nanog (vienas iš kelių gerai žinomų nediferencijuotų ląstelių palaikymo veiksnių) promotorių ir aktyvina jo raišką bei yra pirminis nediferencijuotų ląstelių palaikymo veiksnys (Ito ir kt., 2010). Tačiau kita grupė parodė, kad Tet1 ir Tet2 genuose yra Oct4/Sox2 (kiti du gerai žinomi nediferencijuotų ląstelių palaikymo veiksniai) atpažinimo seka ir kad būtent šie baltymai aktyvina Tet1/Tet2 raišką (Koh ir kt., 2011). Dar vienai mokslininkų grupei atlikus panašius eksperimentus, buvo gauti prieštaraujantys rezultatai: nuslopinus Tet1 geną, embrioninės kamieninės ląstelėse išliko daugiagalės (pliuripotentinės), o pelių Tet1^{-/-} mutantai buvo gyvybingi bei vislūs ir gimdavo tik truputį mažesni už wt peles (Dawlaty ir kt., 2011). Taigi, Tet baltymų reikšmė ląstelių

daugiagališkumo (pliuripotentiškumo) ir neriboto dalijimosi palaikyme išlieka neaiški. Vykstant ląstelių diferenciacijai, Tet1 ir Tet2 raiška krenta iki minimalaus lygio, tačiau Tet3 žymiai išauga (pav. 1.4). Tai rodo skirtingas Tet baltymų funkcijas, vystantis organizmui (Koh ir kt., 2011). Antikūnais prieš Tet1 buvo tirtos Tet1 atpažįstamos DNR sekos. Sekų pasiskirstymas sutampa su hmC padidėjimu (žr. toliau) – Tet1 sąveikauja su genais turtingu euchromatinu, daugiausia su promotoriais ir genais, turinčiais CG saleles. Parodyta, kad Tet1, sąveikaudamas su DNR (ir/ar ją modifikuodamas), ne tik aktyvina genus, palaikančius nediferencijuotas ląsteles, bet taip pat kartu su Polycomb grupės baltymais nuslopiną genus, atsakingus už vystymosi reguliaciją ir diferenciaciją. Taigi, Tet1 gali tiek aktyvinti, tiek slopinti genų raišką, tačiau kiti veikėjai šiuose mechanizmuose dar nėra išaiškinti (Wu ir Zhang, 2011). Tet1 ir Tet2 baltymai jau buvo žinomi seniau, nes su jų mutacijomis yra susijusios kai kurios leukemijos formos (Tahiliani ir kt., 2009; Ko ir kt., 2010; Mohr ir kt., 2011). Tet2 yra ypač svarbus hematogenezėje, formuojantis gerosioms kraujo ląstelių populiacijoms (Ko ir kt., 2011).



Paveikslas 1.4. Vystantis organizmui, kinta 5-metilcitozino (mC), 5-hidroksimetilcitozino (hmC) ir Tet1,2,3 baltymų kiekiai (Munzel ir kt., 2011).

Per 3 metus nuo hmC atradimo mokslininkai pasiūlė keletą metodų, kuriais galima nustatyti bendrą hmC kiekį DNR ir hmC pasiskirstymą genome, t.y. tiksliai identifikuoti hmC pozicijas. Pirmieji hmC kiekio nustatymo metodai buvo radioaktyvūs ir mažiau jautrūs, vėliau pradėti naudoti deuteriu

žymėtas hmC standartas ir masių spektrometrija (Globisch ir kt., 2010; Munzel ir kt., 2010); T4 fagų fermentas gliukoziltransferazė bei tričiu žymėtas kofaktorius UDP-glc (Szwagierczak ir kt., 2010) arba antikūnai (Li ir Liu, 2011). Šie metodai leido tiksliai įvertinti hmC kiekį pelės ir žmogaus organuose. Pelėse daugiausia hmC yra randama smegenų DNR (0.06-0.14% nuo visų nukleotidų), mažesni kiekiai yra inkstuose, širdyje, raumenyse, plaučiuose (~0.03%), o mažiausi – kepenyse, kasoje ir endokrininėse liaukose (sėklidėse, hipofizėje) (0.006-0.012%). mC kiekis visuose audiniuose tuo tarpu yra pastovus (apie 0.9%) (Globisch ir kt., 2010). Žmogaus audiniuose hmC kiekis smegenyse yra 4-10 karto didesnis nei pelėse, o pasiskirstymas tarp audinių irgi yra kitoks: daugiausia hmC yra smegenyse, gaubtinėje ir tiesiojoje žarnose, kepenyse ir inkstuose (0.67-0.38% nuo visų nukleotidų), o plaučiuose, placentoje, širdyje, krūties liaukose hmC kiekis yra daug mažesnis (0.14 - 0.05%) (Li ir Liu, 2011). Įdomu, kad dažniausiai vėžiniuose audiniuose hmC kiekis žymiai sumažėja, o tai gali būti pritaikyta vėžio diagnostikoje (Jin ir kt., 2011).

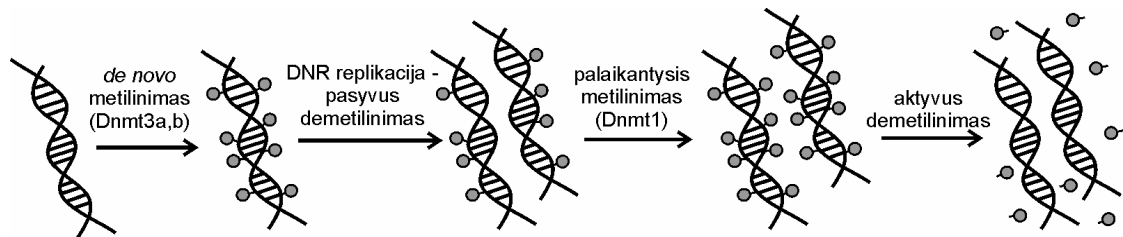
Pirmieji metodai, skirti genomines DNR hmC pozicijoms nustatyti (žr. 3.3.2.2), leido detaliau pažvelgti į hmC pasiskirstymą embrioninėse kamieninėse ląstelėse bei žmogaus ir pelių smegenų DNR. Nustatyta, kad hmC yra daugiau 1) euchromatine ir genuose, lyginant su pasikartojančiais genomo elementais; 2) genų egzonuose, lyginant su intronais; 3) genų promotoriuose ir arčiau genų esančiuose rajonuose nei toliau nutolusiuose. hmC kiekis promotoriuose atvirkščiai koreliuoja su genų raiškos lygiu, o genuose – tiesiogiai (Wu ir Zhang, 2011). Pelės ir žmogaus smegenų hmC pasiskirstymo tyrimai parodė, kad hmC yra daugiau genuose, susijusiuose su hipoksija, angiogeneze ir nervine sistema (neurogeneratyvinėmis ligomis, jonų kanalais, ląstelės adhezijos molekulėmis) (Song ir kt., 2010, a; Jin ir kt., 2011). Pelių smegenėlių ir hipokampo hmC pasiskirstymo tyrimai skirtingais smegenų vystymosi etapais atskleidė, kad bendras hmC kiekis didėja, vystantis smegenims, tačiau kai kuriuose genomo lokusuose hmC kiekis krenta. Smegenyse ir *in vitro* su metilinta DNR sąveikaujantis baltymas MeCP2

neleidžia Tet1 baltymui veikti, t.y. susidaryti hmC iš mC (Szulwach ir kt., 2011). MeCP2 mutacijos pasireiškia protiniu atsilikimu (Rett sindromas). Tai reiškia, kad normalus hmC kiekis ir pasiskirstymas yra būtinas neurogenezėje ir normaliai smegenų veiklai. MeCP2 bei baltymo MBD domenas (nuo angl. methyl-CG binding domain) mažiausiai 10 kartų blogiau sąveikauja su DNR, esant hmC vietoj mC (Valinluck ir kt., 2004), o Dnmt1 labai silpnai metilina savo taikinių (Valinluck ir Sowers, 2007). Taigi, metilgrupės pakeitimas į hidroksimetilo įtakoja baltymų, lemiančių genų raišką, sąveiką su DNR. Tet baltymai taip pat yra susiję su DNR demetilinimu, tačiau aukščiau aptarti faktai rodo, kad hmC turi ir kitokių funkcijų genominiame DNR, ne tik demetilinimo tarpininko (žr. 1.1.5; 3.3.2.1; pav. 3.24). Įdomu, kad daugiašėčiai augalai neturi Tet baltymų homologų, priešingai nei grybai ir kai kurie dumbliai, tačiau hmC kiekis šiuose organizmuose nėra ištirtas (Iyer ir kt., 2009).

1.1.5 DNR demetilinimas

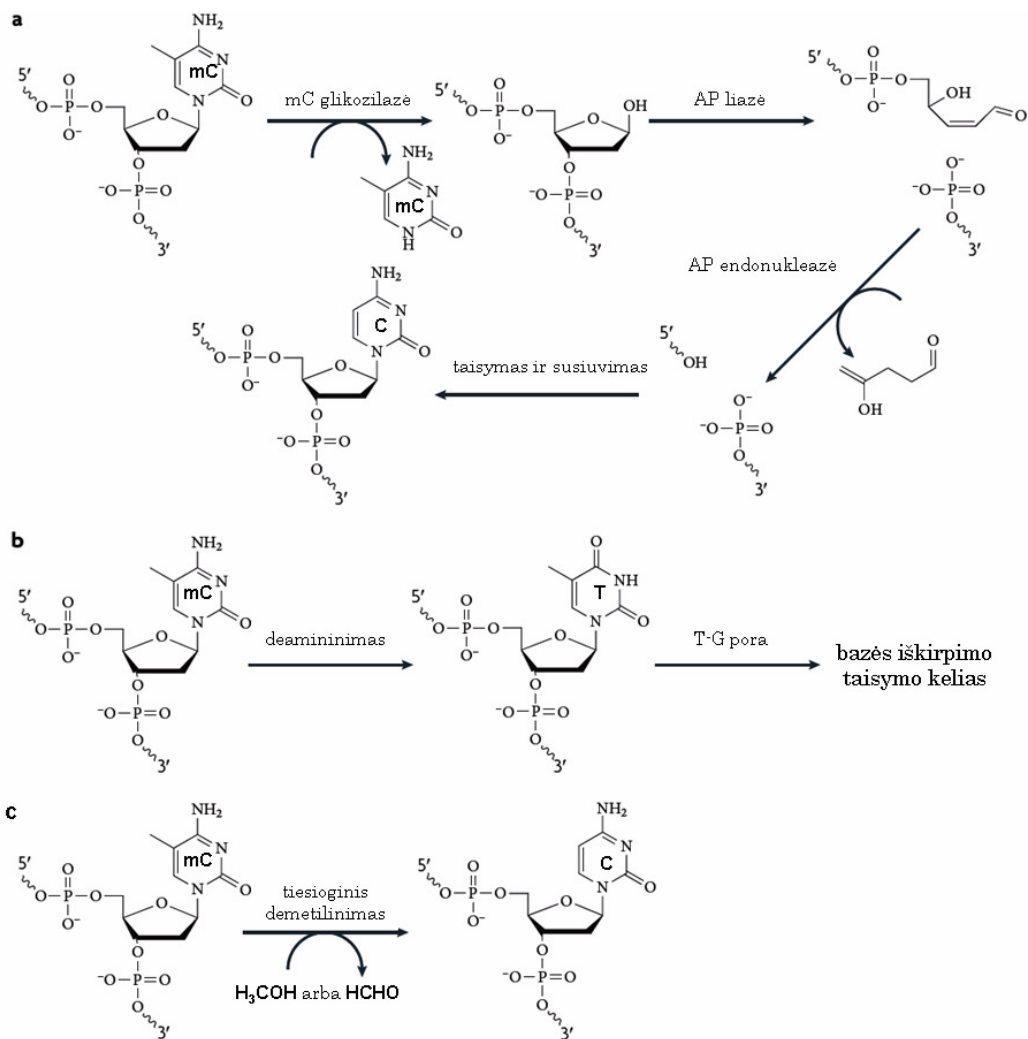
Logiška, kad jei MTazės metilina DNR, o mC buvimas ar nebuvimas nulemia genų raiškos lygį, tai gamtoje turi egzistuoti ir DNR demetilinimo mechanizmas, kuris leistų reaguoti į aplinkos poveikį, išjungiant/įjungiant genus. Ilgą laiką buvo manoma, kad DNR demetilinimas vyksta tik pasyviai, t.y. mC sumažėja dėl DNR replikacijos, kai naujai susintetinta DNR nėra metilinama. Vis dėlto, buvo atskleista, kad DNR gali būti demetilinama ir aktyviai, t.y. nevykstant DNR replikacijai (pav. 1.5), tačiau aktyvaus DNR demetilinimo mechanizmas ar mechanizmai bei fermentai nėra aiškūs iki šiol. Parodyta, kad DNR aktyviai demetilinama: 1) pirminėse lytinėse ląstelėse 9-12 embriono dieną; 2) somatinių ląstelių tam tikruose lokusuose, kai aktyvinami tam tikri genai, kaip atsakas į tam tikrus signalus ir 3) tėvinėje DNR prieš pirmą zigotos pasidalijimą. Tuo tarpu kiaušialąstės DNR yra demetilinama pasyviai, dalijantis ląstelėms. Tėvinės ir motininės DNR nors ir demetilinama globaliai bei skirtingais mechanizmais, tačiau tam tikri regionai, pvz. imprintuojami genai, lieka metilinti (Wu ir Zhang, 2010). Visai neseniai parodyta, kad tėvinės DNR mC nėra demetilinamas iki C, bet verčiamas į hmC

Tet3 oksidazės. Motininė DNR yra apsaugota PGC7/Dppa3/Stella baltymų kompleksu (Iqbal ir kt., 2011; Wossidlo ir kt., 2011). Labai įdomu, kad vienoje ląstelėje esanti DNR yra atskiriama ir parenkama skirtinga demetilavimo programa: pasyvi ir aktyvi. Yra duomenų, kad tėvinei DNR yra būdingesni H3.3 histonai, tuo tarpu motininės DNR H3 histono Lys27 yra mono, di arba tri metilintas (Wu ir Zhang, 2010).



Paveikslas 1.5. De novo ir palaikantis metilinimas bei aktyvus ir pasyvus demetilimas eukariotuose. Palaikantis metiltransferazinis aktyvumas išsaugo jau esantį ląstelėje metilinimo lygį, o *de novo* aktyvumas sukuria naujus modifikuotus taikinius. Pasyvus demetilimas vyksta dalijantis ląstelėms, kai palaikančioji metiltransferazė neveikia, o aktyvus – veikiant baltymams, tada mC kiekis mažėja, nevykstat DNR replikacijai (mC gali būti verčiamas kita modifikacija – hmC). Metilgrupę nurodyta pilku rutuliuku.

Aktyvaus demetilavimo mechanizmas geriausiai suprastas augaluose (pav. 1.6a). *A. thaliana* surastos keturios mC glikozilazės-AP liazės (DME, ROS1 (arba DML1), DML2, DML3), kurių aktyvumai patvirtinti *in vitro* ir *in vivo*. Demetilimas yra vykdomas bazės iškirpimo taisymo keliu (angl. base excision repair, BER), kuriame dalyvauja eilė baltymų: glikozilazės pirmiausia iškerpa mC bazę, AP (apurininė/apiridininė) liazė įveda vgdNR grandinės trūkį, AP endonukleazė iškerpa abazinę ribozę, o vieno nukleotido tarpas yra užtaisomas DNR reparacijos fermentų polimerazės ir ligazės (pav. 1.6a). mC glikozilazių-AP liazių mutacijos *in vivo* sukelia hipermetilinimą skirtinguose genomo lokusuose, taigi, kiekviena mC glikozilazė yra atsakinga už tam tikrą funkciją ir tam tikros genomo vietos demetilimą. Buvo pasiūlyta, kad gyvūnuose timino glikozilazės – TDG ir MBD4 – taip pat gali iškirpti ir mC bazes, tačiau šių glikozilazių *in vitro* tyrimai rodo, kad timinai T-G poroje yra iškerpami žymiai efektyviau nei mC, o tiesioginių *in vivo* įrodymų irgi nėra (Law ir Jacobsen, 2010; Wu ir Zhang, 2010).



Paveikslas 1.6. Aktyvaus demetilinimo būdai. a Įrodytas demetilinimo kelias augaluose taip pat gali būti panašus ir gyvūnuose. b-c Kiti galimi demetilinimo keliai gyvūnuose. Pagal (Wu ir Zhang, 2010).

Kito pasiūlyto demetilinimo kelio pirma stadija būtų mC deamininimas iki T. Po to sektų susidariusios klaidingos T-G bazių poros taisymas bazės iškirpimo keliu (žr. aukščiau) (pav. 1.6b). Citidino deaminazės AID ir APOBEC yra gerai žinomos ir dalyvauja specifiniuose procesuose: antikūnų įvairovės susidaryme ir RNR redagavime (angl. RNA editing). *In vitro* eksperimentai rodo, kad šie baltymai geba deamininti ir mC, tačiau tik viengrandėje DNR. *In vivo* eksperimentai parodė, kad AID prisideda prie nedidelio demetilinimo pirminėse lytinėse ląstelėse. Zebražuvėje padidinta AID, APOBEC ir MBD4 baltymų raiška globaliai demetilino genomą. Jautriais genetiniais eksperimentais nustatyta, kad DNR metiltransferazės taip pat deaminina mC iki T, nors šios reakcijos išeigos yra vos apčiuopiamos.

Parodyta, kad eukariotinės Dnmt3a ir Dnmt3b sąveikauja su TDG ir dalyvauja nuo estrogenų priklausomuose genų promotorių cikliniuose metilinime/demetilinime. Vis dėlto keista, kad tas pats baltymas atlieka dvi priešingas reakcijas. Be to, kad vyktų nuo MTazių priklausomas deamininimas, aplinkoje neturi būti kofaktoriaus SAM, kuris yra gyvybiškai būtinas daugeliui ląstelės procesų (Law ir Jacobsen, 2010; Wu ir Zhang, 2010; Nabel ir kt., 2011).

Dar vienas kelias – nukleotidų iškirpimo taisymas (NER – nucleotide excision repair), kuris paprastai vyksta, esant didelėms pažaidoms, atsirandančioms cheminių reagentų arba radiacijos poveikyje. Kartu su pažaida yra iškerpama 24-32 nukleotidų ilgio DNR grandinė, o trūkį užtaiso reparacijos polimerazė ir ligazė. Yra parodyta, kad GADD45A ir GADD45B baltymai, dalyvaujantys nukleotidų iškirpimo taisyme, gali būti susiję ir su demetilinimu, tačiau ką tiksliai daro šie baltymai nėra aišku (Wu ir Zhang, 2010).

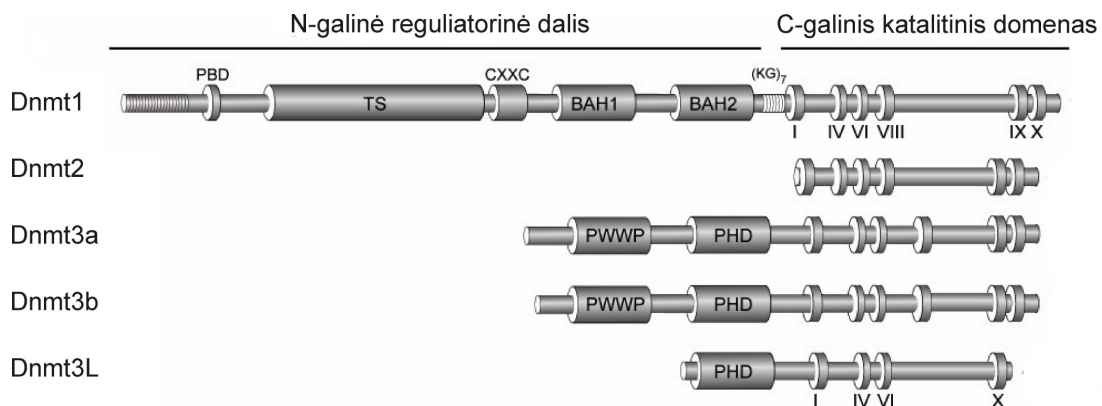
Tiesiausias demetilinimo kelias – tiesioginis metilgrupės nuėmimas nuo mC – reikalauja milžiniškos fermento katalizinės galios, tačiau teoriškai yra įmanomas (žr. 3.3.2.1). Viena mokslininkų grupė parodė, kad šią reakciją katalizuoja MBD2 baltymas (methyl-CG binding domain protein 2), veikiantis be jokių kofaktorių, o metilgrupė, prisijungusi vandens molekulę, yra pašalinama metanolio (Ramchandani ir kt., 1999) arba, po metilgrupės oksidacijos, formaldehido pavidalais (pav. 1.6c) (Hamm ir kt., 2008). Kitiems mokslininkams nepavyko gauti panašių rezultatų, todėl ši teorija yra abejotina (Bhattacharya ir kt., 1999; Wu ir Zhang, 2010).

Per tris metus nuo hmC atradimo atsiranda vis daugiau įrodymų, kad hmC yra aktyvaus demetilinimo produktas, kuris toliau įvairiais būdais virsta į citoziną (žr. 3.3.2.1). Apibendrinant galima teigti, kad žinduoliuose egzistuoja bent keli skirtingi demetilinimo keliai. Tikėtina, kad vieni iš jų yra atsakingi už globalų tėvinės DNR demetilinimą po kiaušialąstės apvaisinimo, kiti – už tam tikrų lokusų demetilinimą ir tam tikrų genų aktyvavimą. DNR demetilimo tyrimai tik prasideda, taigi, demetilinimo mechanizmų detalės, paplitimas skirtinguose organizmuose, audiniuose ir genomo lokusuose, tikėkimės, bus

atskleistos ateityje (Wu ir Zhang, 2010; Bhutani ir kt., 2011; Guo ir kt., 2011; Nabel ir kt., 2011).

1.1.6 Eukariotinių metiltransferazių grupės

Eukariotinės MTazės veikia komplekse su kitais baltymais ir modifikuoja tik dalį genome esančių taikinių. Šių MTazių N-galinė dalis turi specifinius domenų, kurie atsakingi už baltymo-baltymo sąveikas ir tam tikras griežtai apibrėžtas MTazių funkcijas ląstelėje. C-galinė dalis yra atsakinga už katalizę, turi MTazėms būdingus konservatyvius motyvus ir pasižymi homologija su prokariotų MTazėmis (pav. 1.7). Pagal C-galinį katalitinį domeną eukariotinės MTazės yra suskirstytos į 3 grupes: Dnmt1 (kartu apima ir augalų chromometiltransferazės bei grybų Dim-2 fermentus), Dnmt2 ir Dnmt3 (Iyer ir kt., 2011).



Paveikslas 1.7. Žinduolių DNR citozino metiltransferazių šeima. Visos MTazės turi panašų C-galinį katalitinį domeną, sudarytą iš I-X konservatyvių motyvų. MTazės skiriasi savo N-galiniais domenais: PBD – su PCNA sąveikaujantis domenas, TS – su pericentrinio heterochromatinu sąveikaujantis domenas, CXXC – cinko pirštų motyvas, BAH – bromo domenai, (KG)₇ – Lys-Gly pasikartojimų jungtukas, PWWP – Pro-Trp-Trp-Pro motyvas, PHD – augalų homeodomenas (Rottach ir kt., 2009).

Dnmt1 MTazių grupė. Priklausomai nuo sekos Dnmt1 nuo 5 iki 40 kartų geriau metilina hemimetilintus substratus, todėl jai buvo priskirta palaikančiojo metilinimo funkcija (pav. 1.5). Visai neseniai buvo išspręsta Dnmt1-DNR komplekso kristalo struktūra, kuri atskleidė struktūrines detales, kodėl Dnmt1 teikia pirmenybę hemimetilintai DNR (Song ir kt., 2010, b). Dnmt1 C-galinis domenas yra artimesnis prokariotinėms MTazėms nei

eukariotinėms, tačiau be N-galinio domeno yra katalitiškai neaktyvus tiek *in vitro*, tiek *in vivo*. N baltymo gale yra 7 funkciniai domenai, kurie yra atsakingi už importą į branduolį, sąveiką su kitais baltymais ir DNR, stabilumą, dimerizaciją, *de novo* metilinimo dalinį slopinimą, metilinimo ir replikacijos koordinaciją per S-fazę. G1 ląstelės ciklo fazėje Dnmt1 baltymas nukleoplazmoje yra pasiskirstęs tolygiai, o S fazėje randamas replikacijos šakutėse kartu su PCNA (Jurkowska ir kt., 2010).

Dnmt1 mutantinės pelių homozigotos žūsta ankstyvoje embriogenezėje ir pasižymi sutrikusiu imprintingu ir X chromosomos nuslopinimu. Mutantinės homozigotinės embrioninės kamieninės ląstelės pasižymi iki 60 % sumažėjusiu metiliniu, tačiau auga normaliai ir miršta prasidėjus diferenciacijai. Šioms ląstelėms yra būdingas genomo nestabilumas, kuris pasireiškia chromosomų persitvarkymu ir praradimu dėl padidėjusio rekombinacijos dažnio mitozės metu (Goll ir Bestor, 2005; Jurkowska ir kt., 2010). Žinduoliuose yra surastos bent kelios Dnmt1 izoformos, būdingos oocitams ir spermocitams, bei mitochondrijos DNR metilinimą vykdanči Dnmt1 (Jurkowska ir kt., 2010; Shock ir kt., 2011).

Augalai turi kelis *dnmt1* homologus: *Arabidopsis thaliana* – 4, kukurūzai ir ryžiai po 2. *A. thaliana met1* (vienas iš *dnmt1* homologų) mutacija 60% sumažina DNR metilinimo lygį ir pasireiškė fenotipiškai: buvo stebėtas nenormalus augalo organų vystymasis, atsakas į pavasarį, sužydėjimo laikas. Naudojant antiprasminius konstruktus prieš *met1* arba *ddm1* (antra Dnmt1 grupės *A. thaliana* MTazė), buvo pastebėta, kad demetilinimo pobūdis augaluose yra perduodamas iš kartos į kartą. Augalų, kitaip nei gyvūnų, pirminių lytinių ląstelių ir zigotos bei morulės nelydi intensyvus demetilinimas, todėl epigenetiniai pokyčiai, atsirandantys dėl metilinimo mechanizmo mutacijų, gali išlikti daugelyje kartų, netgi vėliau panaikinus tas mutacijas. Tačiau paskutiniai duomenys rodo, kad ir augalų lytines ląsteles bei pradinį gemalo vystimąsi gali lydėti globalus demetilinimas ir metilinimas (Bestor, 2000; Goll ir Bestor, 2005; Law ir Jacobsen, 2010; Meyer, 2011).

Chromometiltransferazės yra palaikančiosios MTazės, metilina CHG sekas, yra surastos tik žiediniuose augaluose ir vienintelės iš MTazių turi chromodomenus (CROMO), kurie būdingi heterochromatiną atpažįstantiems baltymams. *A. thaliana* genomas koduoja tris chromometiltransferazių homologus, tačiau tik vieno iš jų – *cmt3* – mutacija žymiai sumažino metilintų CHG ir padidino aktyvių transpozonų kiekį, tačiau keliose kartose fenotipiškai nepasireiškė (*A. thaliana* yra savidulkis augalas ir normaliai turi kelis aktyvius transpozonus). CHG metilinimas, manoma, išsivystė, kad nuslopintų CG sekų neturinčius transpozonus (Goll ir Bestor, 2005). Grybuose rastos Dim-2 metiltransferazės, nors ir neturi chromodomenų, yra giminingos augalų CMT metiltransferazėms. Dim-2 taip pat specializuojasi transpozonų slopinime. Abi šių MTazių grupės su DNR sąveikauja per histono H3 Lys9met3. CMT atveju sąveika vyksta per chromodomeną, o Dim-2 sąveikauja netiesiogiai per HP1 baltymo chromodomeną. Manoma, kad CMT/Dim-2 šeima atskilo nuo Dnmt1 prieš atsiskiriant augalams ir gyvūnams, pastariesiems anksti praradus šios šeimos atstovus (Zemach ir kt., 2010).

Dnmt2 grupės MTazės. Dnmt2 buvo aptikta dėl ar. homologijos su mC MTazėmis. Ilgą laiką jos metiltransferazinis aktyvumas nebuvo parodytas. Iškristalinius Dnmt2 dvinariame komplekse su SAH ir į išspręstą struktūrą įmodeliavus DNR iš M.HhaI-DNR kristalo struktūros, kilo minčių, kad Dnmt2 substratas yra nenormali B formos DNR (Goll ir Bestor, 2005). Vėliau buvo parodyta, kad žmogaus Dnmt2 vos nustatomu efektyvumu gali metilinti DNR (Hermann ir kt., 2003) ir efektyviai metilina citoziną tRNR^{Asp}, nors ar. sekų palyginiai rodo, kad Dnmt1 yra artimesnė DNR MTazėms nei RNR (Goll ir kt., 2006). Metilintas citozinas yra visai šalia antikodono, o antikodono kilpos seka yra tokia pati eilėje organizmų, turinčių Dnmt2 homologus. Dabar jau yra duomenų, kad Dnmt2 gali metilinti ir kitas RNR. Dnmt2 funkcija nėra aiški: mutantiniai pelių, *A. thaliana*, *D. melanogaster* ir *S. pombe dnmt2* organizmai nesiskyrė nuo wt tipo, tačiau *Dictyostelium discoideum* mutantai pasižymėjo nedideliais vystymosi sutrikimais, o detali zebražuvės mutantų analizė atskleidė letalius retinos, kepenų ir smegenų diferenciacijos defektus. Parodyta,

kad *D. melanogaster*, kuri neturi kitų DNR metiltransferazių tik Dnmt2, mobilūs geno elementai yra intensyviai metilinti ankstyvoje embriogenezėje. Vėliau mC genome beveik nebelieka, o už retroelementų nutildymą yra atsakingas histono H4 Lys20 metilinimas. Vaisinės muselės Dnmt2 mutantuose buvo žymiai sumažėjęs šio histono metilinimas. Taigi, bent jau *D. melanogaster* Dnmt2 metilina ir DNR bei dalyvauja epigenetinėje reguliacijoje (Goll ir Bestor, 2005; Goll ir kt., 2006; Schaefer ir Lyko, 2010)

Dnmt3 MTazių grupė. Žinduolių Dnmt3 šeima turi 3 fermentus: Dnmt3A, Dnmt3B ir Dnmt3L. Pirmieji du fermentai yra aktyvios *de novo* MTazės, o Dnmt3L yra reguliacinis faktorius lytinėse ląstelėse ir metiltransferaziniu aktyvumu nepasižymi. Dnmt3L sąveikauja su Dnmt3A ir Dnmt3B, stimuliuoja jų katalitinį aktyvumą ir yra būtinas oocitų imprintingui bei spermocitų pasikartojančių geno sekų nutildyme. *Dnmt3L* nulinės pelės yra gyvybingos, bet sterilios.

Dnmt3A ir Dnmt3B pasižymi didele sekų homologija, tačiau jų funkcijos tik iš dalies persidengia. Abi šios MTazės dalyvauja skirtingų pasikartojančių geno elementų metilinime, o Dnmt3A taip pat metilina imprintuojamus genus. Yra duomenų, kad Dnmt3B ir Dnmt3A kartu su Dnmt1 dalyvauja pasikartojančių sekų palaikančiame metilinime po DNR replikacijos. Šios metiltransferazės žymiai labiau „mėgsta“ metilinti CG sekas, tačiau geba modifikuoti ir kitas sekas (CA>>CT>CC). *In vitro* ir *in vivo* patvirtinta, kad metilinamos sekos apsuptis yra labai svarbi: labiausiai „mėgstama“ yra puriniais praturtinta seka 5' dalyje, o pirimidiniais – 3'. Didžiausia *Dnmt3a* ir *Dnmt3b* genų raiška yra stebima embrioniniuose audiniuose ir nediferencijuotose ląstelėse. Skirtingos šių MTazių formos (Dnmt3A – 2; Dnmt3B – 7) yra būdingos skirtingiems audiniams (oocitams, vėžiniams ir kt.) – tai rodo skirtingas jų funkcijas, tačiau detalių tyrimų šioje srityje dar labai trūksta (Jurkowska ir kt., 2010).

Dnmt3A nulinės pelės išgyvena, tačiau yra prastos sveikatos ir nugaišta vos sulaukusios brandos. *Dnmt3B* mutantinės pelės žūsta ankstyvoje embriogenezėje (Goll ir Bestor, 2005; Jurkowska ir kt., 2010). *Dnmt3b* yra

vienintelė MTazė, kurios mutacijos sukelia žmogaus ligas. Dnmt3b C-galinio katalitinio domeno mutacijos sukelia ICF sindromą (Imunodeficitas, Centromerų nestabilumas ir veido (Facial) anomalijos), kuris pasireiškia dėl klasikinės satelitinės DNR 1, 9 ir 16 chromosomose demetilinimo. Net esant absoliučiam demetilinimui, tik viena ligonių Dnmt3b geno kopija turėjo mutaciją. Galbūt žmogaus, kaip ir pelių, nulinės *Dnmt3b* geno homozigotos yra letalės (Goll ir Bestor, 2005).

Žiediniai augalai turi DRM MTazes, kurių N-gale yra su ubikvitinu susijęs domenas (UBA), neaptinkamas jokiose kitose citozino MTazėse. DRM šeimos baltymų metilinimas yra priklausomas nuo trumpų RNR, kurios yra pradinis signalas homologinių DNR sekų metilinimui. Nuo RNR priklausomame DNR metilinimo kelyje dalyvauja RNR interferencijos baltymai (Dicer ir Argonautų šeimos nariai), specifinės RNR polimerazės PolIV ir PolV, chromatino permodeliavimo faktoriai ir kiti baltymai. Žinduoliuose ir *D. melanogaster* taip pat buvo surastos mažos RNR – piRNR, kurios dalyvauja transpozonų metiliniame, formuojantis vyriškoms lytinėms ląstelėms (Law ir Jacobsen, 2010). *A. thaliana* DRM2 baltymas *de novo* metilina visas sekas (CG, CHG ir CHH) bei dalyvauja CHH sekų metilinimo palaikyme. DRM2 mutantai blokuoja visą pasikartojančių sekų *de novo* metilinimą *A. thaliana*. DRM3 baltymas neturi kritinių ar. konservuotuose metiltransferaziniuose motyvuose metilinimo reakcijai atlikti, o jo funkcija yra panaši į žinduolių Dnmt3L – aktyvių MTazių pritraukimas prie reikiamų sekų ir aktyvumo stimuliavimas (Henderson ir kt., 2010; Zhang ir kt., 2010).

1.2 DNR citozino-5 metiltransferazės (modelis – M.HhaI)

Bakterijos *Haemophilus haemolyticus* II RM klasei priskirta metiltransferazė M.HhaI yra sudaryta iš 327 ar. ir metilina vidinį citoziną DNR sekoje 5'-GCGC-3' (Kumar ir kt., 1994). M.HhaI yra tyrinėjama jau daugiau kaip 20 metų ir yra pagrindinis modelinis objektas, analizuojant citozino-5 MTazių struktūrą, reakcijos mechanizmą ir bazės išsukimą.

1.2.1 Pirminė ir erdvinė struktūra

Išanalizavus žinomų mC MTazių ar. sekas, buvo nustatyta dešimt konservatyvių 10-20 ar. ilgio motyvų. Šeši iš jų – I, IV, VI, VIII, IX ir X – yra labiau konservatyvūs. Tuo tarpu II, III, V ir VII motyvuose randama didesnė ar. variacija, o kai kuriose MTazėse jie visai neaptinkami. Beje, beveik visi konservatyvūs motyvai, išskyrus IX, yra taip pat būdingi 6mA ir 4mC MTazėms (Cheng ir Roberts, 2001). I-III ir X motyvai formuoja SAM susirišimo centrą, o IV-VIII sudaro katalitinį centrą. Didžiausias variabilus rajonas (kartu su IX konservatyviu motyvu mC MTazėse) yra atsakingas už specifinį metilinamos sekos atpažinimą. Multispecifinėse MTazėse jis yra iki 300 ar. ilgio, monospecifinėse – 80 -120 ar. ilgio (Trautner ir kt., 1996).

Pagal trijų funkcinių vienetų – katalitinio rajono, SAM susirišimo rajono ir taikinio atpažinimo domeno – tarpusavio išsidėstymo tvarką MTazės yra skirstomos į grupes. Tačiau nors trijų funkcinių sričių eiliškumas pirminėje struktūroje gali skirtis, visos bakterinės MTazės formuoja vienodą katalitinio domeno tretinę struktūrą (Fauman ir kt., 1999). DNR MTazių katalitiniai domenai sudaryti iš 5 lygiagrečių ir 2 nelygiagrečių β -juostų, apgaubtų šešiomis α -spiralėmis (β -juostos išsidėsto tokia tvarka: 6 \downarrow 7 \uparrow 5 \downarrow 4 \downarrow 1 \downarrow 2 \downarrow 3 \downarrow , eilė tarp 4 ir 1 juostos gali būti sukeista) (Cheng ir Roberts, 2001). Didžioji dalis DNR mC MTazių konservatyvių motyvų išsidėsto kilpose šalia antrinės struktūros elementų (Kumar et al., 1994). Ši struktūra nuo hidrogenazių nukleotidus rišančio Rossmann struktūrinio motyvo skiriasi tik 7-ta nelygiagrečia β -juosta, kurios Rossmann motyve nėra. Nustatyta, kad toks MTazinis motyvas yra būdingas ir kitoms SAM'ą rišančioms baltymų, RNR, katecholo, glicino, izoflavino MTazėms. Šių baltymų katalitinio domeno išorėje yra išsidėstę motyvai, atsakingi už substrato atpažinimą ir kitas funkcijas. Nors skirtingose MTazių grupėse ar. sekų panašumas gali būti ir visai nedidelis, MTazinis motyvas atlieka panašias funkcijas kofaktoriaus surišime ir katalizėje (Cheng ir Roberts, 2001).

Taikinio atpažinimo domenas labiausiai įvairuoja tiek savo ar. seka, tiek ir tretine struktūra. M.HhaI taikinio atpažinimo domenas su DNR sąveikauja

dviejų Gly turtingų kilpų pagalba. Visi, išskyrus vieną, specifiniai kontaktai sudaromi iš didžiojo DNR griovio pusės. Sąveika su fosfatinėmis grupėmis aprėpia 10 bp, o specifiniai kontaktai su nukleotidais yra sudaromi 4 bp atpažinimo sekos ribose (Klimašauskas ir kt., 1994).

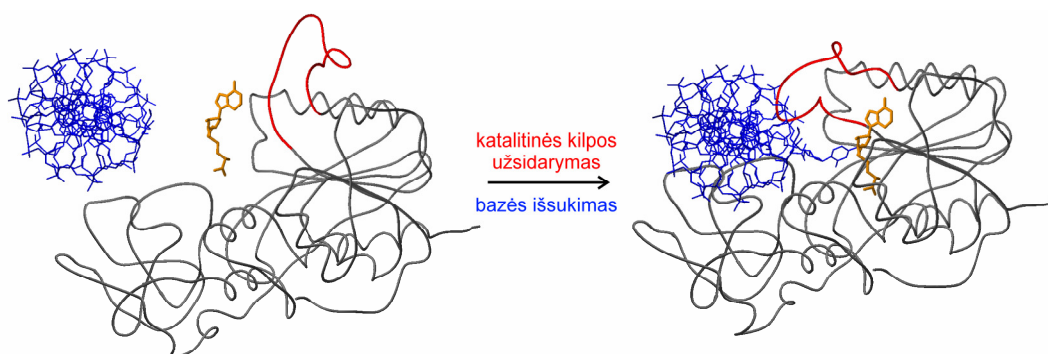
1.2.2 Bazės išsukimas

DNR bazės yra paslėptos dvigubos spiralės struktūroje ir taip apsaugotos nuo cheminių reagentų poveikio. Fermentai, katalizuojantys DNR bazių chemines reakcijas, susiduria su bazių pasiekimo problema. 1994 m. pirmą kartą buvo parodyta, kad M.HhaI išsuka modifikuojamą citoziną 180° kampu iš dvigubos DNR spiralės ir patalpina jį aktyviame fermento centre. Likusi dvigrandė DNR yra B struktūros, beveik nepakitusi (pav. 1.8; 1.12). Išsuktos bazės vietą DNR spiralėje užima Gln237 ir Ser87, kurie kompensuoja heterociklinių bazių, esančių prieš ir po išsukto citozino, prarastas stekingo sąveikas (Klimašauskas ir kt., 1994). Dabar žinoma, kad nukleotido išsukimas yra būdingas daugeliui su DNR sąveikaujančių baltymų (žr. 1.3).

Ilgą laiką buvo bandoma išsiaiškinti du svarbius klausimus apie M.HhaI vykdomą bazės išsukimą: bazė yra išsukama 1) aktyviai ar pasyviai; 2) per didįjį ar mažąjį DNR griovį. Aktyvų baltymo dalyvavimą bazės išsukime patvirtina tiek eksperimentiniai (Daujotytė ir kt., 2004), tiek teoriniai laisvosios energijos skaičiavimo rezultatai (Huang ir kt., 2003), tačiau į antrąjį klausimą iki šiol nėra aiškaus ir vieningo atsakymo. M.HhaI-DNR-SAH kompleksų rentgenostruktūrinė analizė rodo, kad visi, išskyrus vieną, M.HhaI-DNR kontaktai sudaromi iš didžiojo DNR griovio pusės, todėl manoma, kad išsukimas per mažąjį DNR griovį yra struktūriškai palankesnis (Klimašauskas ir kt., 1994; Vilkaitis ir kt., 2001; Neely ir kt., 2005). Vis dėlto laisvosios energijos skaičiavimai rodo, kad energetiškai palankiau būtų citoziną išsukti per didįjį DNR griovį. Tokiu atveju pirmiausia turėtų vykti citozino išsukimas, ir tik po to M.HhaI sudarytų specifinius kontaktus su DNR didžiuoju grioviu (Priyakumar ir MacKerell, 2006).

1.2.3 Katalitinis ir kinetinis veikimo mechanizmas

Kinetinis reakcijos mechanizmas. Pirmiausia buvo pasiūlytas tvarkingos Bi-Bi (bisubstratinis-biproductinis) reakcijos kinetinis mechanizmas: iš pradžių M.HhaI sąveikauja su DNR, o po to formuojasi trinaris M.HhaI-DNR-SAM kompleksas. Po metilgrupės pernešimo iš pradžių turėtų disociuoti SAH, o vėliau – metilinta DNR ir MTazė (Wu ir Santi, 1987). Pagal šį mechanizmą kofaktorių neturėtų sąveikauti su laisvu baltymu, tačiau taip nėra. Vis dėlto, baltymo-DNR kompleksų asociacijos konstantos keturiomis eilėmis geresnės nei baltymo-kofaktorių (Vilkaitis ir kt., 2001; Merkienė ir Klimašauskas, 2005). Taigi, M.HhaI yra būdingas pusiau netvarkingas Bi-Bi kinetinės reakcijos mechanizmas, kuriame M.HhaI labiau "mėgsta" sąveikauti su DNR, o po to su kofaktoriumi.

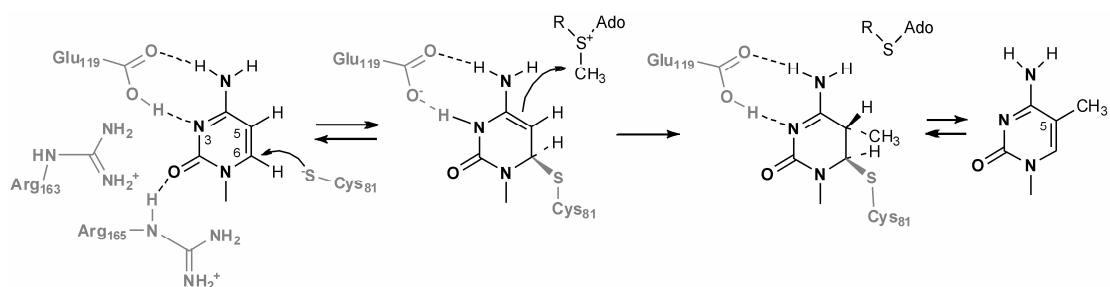


Paveikslas 1.8. M.HhaI sąveikaujant su DNR, tiek baltymas, tiek DNR patiria didelius konformacinius pokyčius. Taikinio bazė yra išsukama 180°C kampu, o katalitinė kilpa pajuda DNR link, užrakindama išsuktą bazę ir kofaktorių baltymo aktyviame centre. DNR pavaizduota mėlyna, kofaktorių – oranžine, baltymas – juoda, o katalitinė kilpa – raudona spalvomis.

Katalitinis reakcijos mechanizmas. Jau 1987 m. buvo pasiūlytas M.HhaI katalitinis veikimo mechanizmo modelis (Wu ir Santi, 1987), kuris vėliau buvo patvirtintas bei papildytas ir yra panašus į kitų fermentų (timidilatsintetazės, tRNR-(uracil-5)metiltransferazės bei dCMP hidroksimetiltransferazės), katalizuojančių metilgrupės pernešimą ant pirimidino C5 atomo (pav. 1.9).

Po M.HhaI asociacijos su DNR, vyksta bazės išsukimas, katalitinės kilpos uždarymas ir nukleofilinė ataka: absoliučiai konservatyvaus Cys81 tiolatas atakuoja išsukto citozino C6 atomą. Kvantiniai-mechaniniai

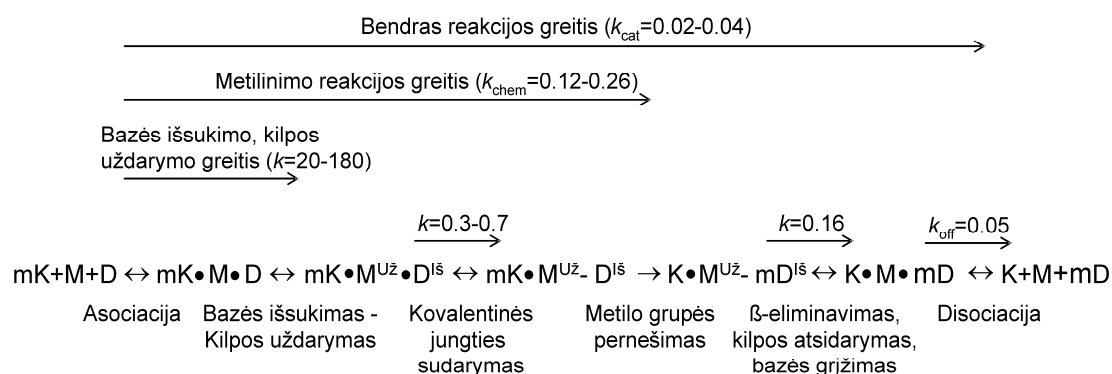
skaičiavimai rodo, kad tiogrupės (-SH) deprotonizacija, susidarant tiolatui ($-S^-$), yra galima dalyvaujant taikinio arba gretimo nukleotido fosfatui, kuris sumažintų protono tiesioginio perėjimo į terpę energiją (Zangi ir kt., 2010). Cys81 nukleofilinė ataka būtų energetiškai palankesnė, jei citozino C6 pozicija taptų labiau elektrofiliška – ką užtikrintų citozino N3 atomo protonizacija arba neigiamo žiedo krūvio sukonzentravimas ties O^2 atomu. Tokius veiksmus aktyviame baltymo centre galėtų atlikti konservatyvios ar. Glu119, Arg165 ir Arg163. Šių ar. svarbą katalizėje įrodo H.HhaI-DNR kristalinės struktūros (Glu119 karboksilgrupė sudaro vandenilinius ryšius su N3 ir N^4 atomais, o Arg165 ir Arg163 teigiamai įkrautos guanidino grupės yra netoli O^2 atomo) (Klimašauskas ir kt., 1994; O'Gara ir kt., 1996), mutatinių variantų tyrimai (Shieh ir kt., 2006; Shieh ir Reich, 2007) ir paskutiniai kvantiniai mechaniniai skaičiavimai (Zangi ir kt., 2010). Neaišku, ar Glu119 yra protonuotas taikinio surišimo metu, tačiau yra pasiūlyti bent du galimi protono atsiradimo keliai: protonas gali ateiti per vandens molekulę iš Arg163 arba kofaktoriaus aminogrupės (Sankpal ir Rao, 2002). Didelės energijos karboanijono susidarymo baltymo-DNR kovalentiniame komplekse leistų išvengti ta pati Glu119 atliekama citozino N3 grupės protonizacija ir/arba Arg165,163 elektrostatinė sąveika su O^2 (Perakyla, 1998; Zangi ir kt., 2010). Kovalentinio fermento-DNR komplekso aktyvintas buvęs inertiškas citozino-5 atomas atakuoja SAM'o elektrofilinį CH_3-S^+ centrą. Cys81 ir citozino-5 nukleofilinės atakos atitinkamai į citozino C6 ir SAM'o sulfonio centrą yra atskirtos laike (Zangi ir kt., 2010; Gerasimaitė ir kt., 2011). Po metilgrupės pernešimo, kuris vyksta pagal S_N2 tipo nukleofilinio pakeitimo mechanizmą, C5 protono β -eliminavimas leidžia atstatyti dvigubą jungtį tarp C5 ir C6 atomų ir regeneruoja laisvą baltymą. Protono-C5 ir tiolato-C6 pašalinimas turėtų vykti vienu metu (Perakyla, 1998). Protono pašalinime dalyvauja taikinio bazės fosfatas ir konservatyvūs Gln82 su Asn304, stabilizuodami baltymo aktyviame centre esantį vandens molekulių tiltelį, kuriuo protonas iš C5 pozicijos pereina į tirpalą (O'Gara ir kt., 1996; Sankpal ir Rao, 2002).



Paveikslas 1.9. M.HhaI katalizuojama kovalentinė taikinio bazės aktyvacija ir metilgrupės pernaša. M.HhaI baltymo motyvai pavaizduoti pilkai (Wu ir Santi; 1987; Klimašauskas ir kt., 1994).

Jau pirmoji rentgeno kristalinė M.HhaI-DNR-SAH struktūra atskleidė, kad M.HhaI sąveikaujant su DNR, tiek DNR, tiek baltymas patiria didžiulius konformacinius pokyčius: 20 ar. (81-100 ar.) katalitinė kilpa pajuda DNR link, užrakindama išsuktą citoziną ir priartindama katalitinį Cys81 prie citozino-5 atomo (pav. 1.8) (Klimašauskas ir kt., 1994). Visai neseniai, naudojant elegantišką metodą, vienu metu tiesiogiai buvo stebėti bazės išsukimo, katalitinės kilpos užsidarymo, kovalentinio komplekso susidarymo bei iširimo reakcijų greičiai. Eksperimentas atliktas naudojant greito maišymo aparatūrą ir stebint citozino UV absorbcijos bei katalinėje kilpoje esančio vienintelio triptofano fluorescencijos pokyčius. Išsukamo citozino hiperchromatinis efektas, atsirandantis dėl prarastų stekingo sąveikų su gretimais guaninais, bei chromoforo praradimas dėl baltymo-citozino kovalentinio komplekso susidarymo ir aromatinės sistemos išardymo, leido įvertinti, kas vyksta su citozinu baltymo-DNR komplekse. Tame pačiame eksperimente stebėti katalinėje kilpoje esančio triptofano fluorescencijos pokyčiai suteikė informacijos apie katalitinės kilpos kinetiką. Nustatyta, kad bazės išsukimas ir katalitinės kilpos uždarymas vyksta labai greitai ($10\text{--}20\text{ s}^{-1}$) ir sinchroniškai, per dvi gerai išreikštas stadijas, tačiau jų prigimtis nėra aiški. Kovalentinio tarpinio baltymo-DNR komplekso susidarymas yra žymiai lėtesnis ($0.3\text{--}0.7\text{ s}^{-1}$) ir priklauso nuo Cys81 nukleofilinės atakos greičio, bet ne nuo citozino išsukimo ir užrakavimo baltymo aktyviame centre. Metilgrupės pernešimas yra atskirtas laike nuo kovalentinio baltymo-DNR komplekso susidarymo (Gerasimaitė ir kt., 2011). Šie duomenys patvirtino ir papildė jau ilgai tyrinėjamą M.HhaI reakcijos mechanizmą. M.HhaI, kaip ir kitų DNR MTazių,

bendras katalitinės reakcijos greitis nėra didelis ($k_{\text{cat}}=0.02-0.04 \text{ s}^{-1}$). Cheminė metilgrupės pernaša vyksta 5-10 kartų greičiau, o reakcijos greitį limituojanti stadija yra SAH'o disociacija iš trinario M.HhaI-DNR^{metilinta}-SAH komplekso (pav. 1.10) (Wu ir Santi, 1987; Vilkaitis ir kt., 2001; Merkienė ir Klimašauskas, 2005; Gerasimaitė ir kt., 2011).



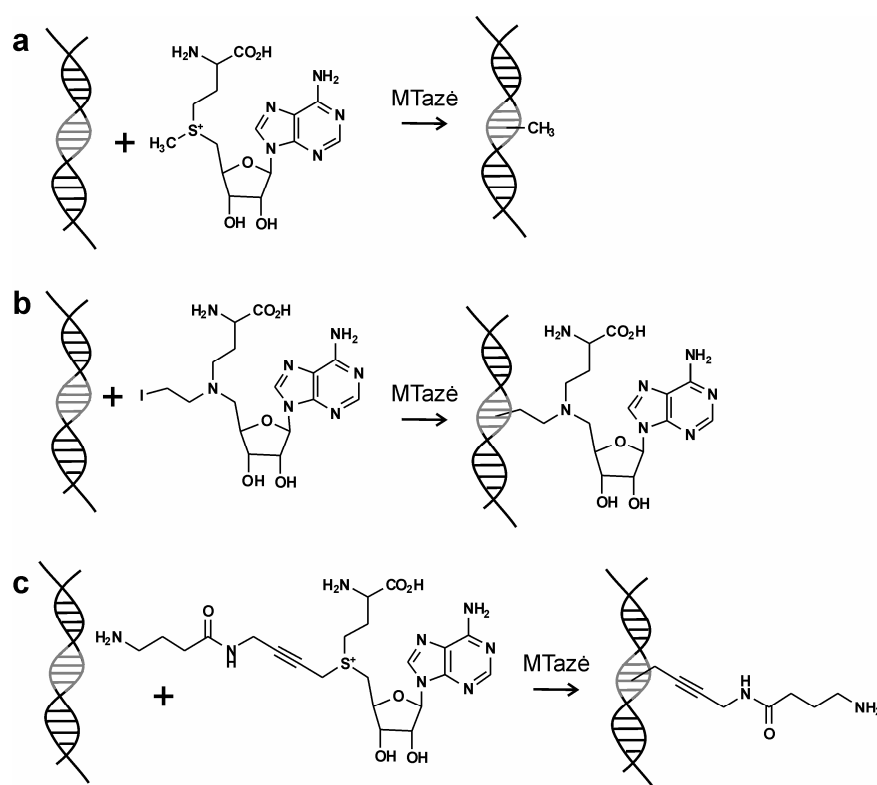
Paveikslas 1.10. M.HhaI kinetinio mechanizmo schema. Pateiktų konstantų reikšmių matavimo vienetai yra s^{-1} . Schemoje naudoti sutrumpinimai atitinka: **mK** – kofaktorius SAM; **K** – kofaktorius be metilgrupės SAH; **M** – M.HhaI; **D** – DNR; **mD** – metilinta DNR; **Už** – uždaryta (užrakinta) katalitinė kilpa; **Iš** – išsukta taikinio bazė; **•** – nekovalentinė asociacija, brūkšnelis reiškia kovalentinę ryšį. Paruošta, remiantis literatūriniais duomenimis (Vilkaitis ir kt., 2001; Daujotytė ir kt., 2004; Merkienė ir Klimašauskas, 2005; Gerasimaitė ir kt., 2011).

1.2.4 DNR metiltransferazių panaudojimas biotechnologijoje

DNR žymėjimas yra plačiai taikomas dirbant su DNR tiek mokslinėse, tiek medicinos laboratorijose. Didelių gamtinių DNR žymėjimas specifinėse sekose yra vis dažniau pritaikomas diagnostikoje. Patogenų identifikavimas, kuris remiasi DNR sekos nustatymu, yra objektyvesnis, tikslesnis ir dažnai greitesnis, lyginant su mikrobu kultivavimo metodais. DNR sekos nustatymas – tai ne tik DNR sekoskaita, kai nustatoma didelė dalis patogeno genomo, bet ir tam tikrų žinomų DNR sekų paieška, kuri remiasi konkrečios DNR suradimu ir signalo perdavimu. Daugelis žymėjimo metodų – PGR, Southern ir Northern blotai, DNR mikrogardelės ir FISH (nuo angl. fluorescent in situ hybridization) – remiasi hibridizacijos principu, kai DNR yra išlydoma aukštoje temperatūroje, ir pagal komplementarumo principą zondas suranda savo seką (Ghosh ir kt., 2006; Juskowiak, 2010). Visai kita strategija – metodai,

leidžiantys pažymėti DNR specifinėse sekose, bet nereikalaujantys DNR denatūracijos, o po to hibridizacijos su zondais. Tokios strategijos įgyvendinimui buvo panaudotos MTazės ir jų sintetiniai kofaktoriai. Pirmiausia, naudojant aziridino ir N-etilhalogenido SAM'o analogus, turinčius funkcinę grupę arba žymenį, MTazių pagalba visas kofaktorius buvo perkeltas ant citozino. MTazės likdavo prisirišusios prie modifikuoto substrato, o jų pašalinimui buvo reikalingos proteinazės (pav. 1.11b) (Pljevaljic ir kt., 2004; Zhang ir kt., 2006). Toks žymėjimo metodas buvo pavadintas SMILing (nuo angl. sequence-specific methyltransferase-induced labelling of DNA). Vėliau buvo parodyta, kad MTazės efektyviai perneša ne tik metilgrupę, bet ir prailgintas grupes (kuriose gali būti funkcinės grupės) nuo sintetinių kofaktoriaus analogų, sulfonio centro atžvilgiu β padėtyje turinčių dvigubas arba trigubas jungtis (pav. 1.11c). Tokie kofaktoriai buvo pavadinti dvigubai aktyvintais dėl pernešamo anglies atomo, esančio tarp dviejų aktyvių grupių – sulfonio ir alilinės – kurios palengvina reakciją, o žymėjimo metodas pavadintas mTAG (nuo angl. methyltransferase-directed transfer of activated groups). Prie funkcinės grupės chemoselektyviai galima prijungti žymę ir taip pažymėti DNR MTazių atpažįstamosiose sekose. Parodyta, kad visų tipų MTazės ($C5$ ir N^4 citozino bei N^6 adenino) perneša prailgintas grupes nuo dvigubai aktyvintų kofaktorių (Dalhoff ir kt., 2006). Šis principas buvo pritaikytas vienos molekulės eksperimentuose, nustatant λ fago DNR kodą (Neely ir kt., 2010). Panašios žymėjimo technologijos yra naudojamos, norint atkurti pilną genomą iš sekoskaitos duomenų ir įvertinti, kuri DNR dalis yra nenusekvenuota. Pagrindinis šio metodo trūkumas – brangi ir sudėtinga kofaktorių sintezė. Be to, wt metiltransferazės dažnai neefektyviai perneša didesnes grupes, todėl reikalinga baltymų mutagenezė. Tačiau gausi DNR metiltransferazių šeima leidžia pažymėti kelis šimtus norimų 2-8 bp ilgio DNR sekų, kurias atpažįsta MTazės (Gottfried ir Weinhold, 2011; Neely ir kt., 2011). Pažymėtina, kad prailgintas grupes nuo sintetinių kofaktoriaus analogų taip pat perneša RNR, baltymų ir mažų molekulių metiltransferazės (Stecher ir kt., 2009; Gottfried ir Weinhold, 2011). Dvigubai aktyvinti kofaktoriai ir

M.SssI buvo pritaikyti genominės DNR tyrimams, siekiant nustatyti mC pozicijas DNR (Kriukienė ir kt., ruošama spaudai).



Paveikslas 1.11. DNR metiltransferazių katalizuojamas metilo (a), prailgintos grupės (c) arba viso kofaktoriaus (b) kovalentinis prijungimas prie DNR. a MTazė perneša metilgrupę nuo natūralaus kofaktoriaus S-adenosil-L-metionino (SAM). **b** Reakcijos metu visas aziridino (arba N-etilhalogenido) kofaktorių yra prijungiamas prie DNR. Sintetinant aziridino kofaktorių, funkcinės grupės arba žymenys gali būti įvedami adenino žiedo C8 arba N6 pozicijose. **c** MTazės efektyviai perneša prailgintą grupę, turinčią funkcinę grupę (-NH₂ arba kitą), ant DNR nuo dvigubai aktyvintų kofaktorių. MTazės atpažįstama seka pavaizduota pilkai juodoje DNR. Paruošta, remiantis literatūriniais duomenimis (Gider ir Weinhold, 2009; Gottfried ir Weinhold, 2011).

1.3 Fermentų vykdomo DNR bazės išsukimo tyrimo metodai

Fiziologinėmis sąlygomis DNR yra B formoje. Tai dvigrandė į spiralę susisukusi DNR struktūra, kurios išorinį apvalkalą sudaro ribofosfatinis karkasas, o šerdį – bazės, sąveikaujančios vandenilniais ryšiais su priešais esančiomis bazėmis, ir stekingo sąveika su gretimomis bazėmis. Baltymai, sąveikaujantys su DNR, geba išardyti tvarkingą DNR spiralę: lenkti, išvynioti ir atskirti DNR grandines. Dar vienas elegantiškas DNR deformacijos būdas – bazės išsukimas iš dvigrandės DNR 180° kampu į aktyvų fermento centrą –

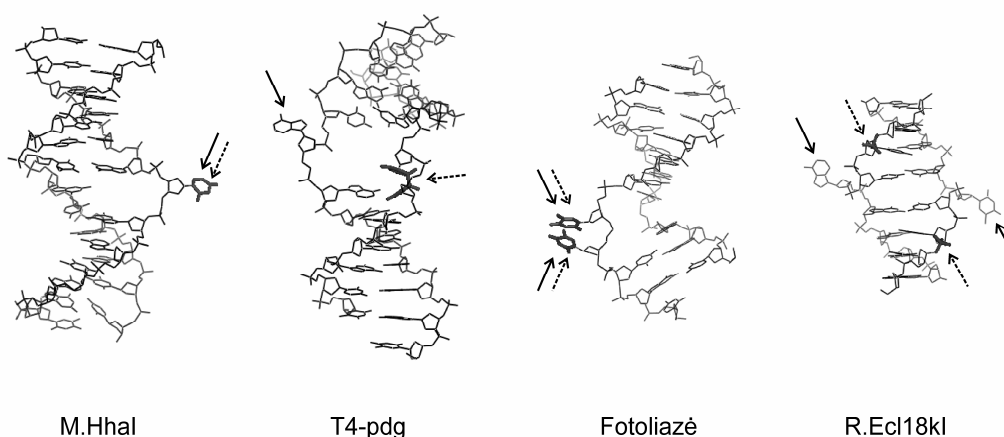
pirmą kartą buvo pademonstruotas, išsprendus trinario komplekso M.HhaI-DNR-SAH erdvinę struktūrą (Klimašauskas ir kt., 1994). Vėliau paaiškėjo, kad bazės išsukimas yra paplitęs reiškinys tarp įvairiausių fermentų grupių, sąveikaujančių su RNR ir DNR. DNR reparacijos fermentai (glikozilazės, AP endonuklezės ir kt.), gliukoziltransferazės, restrikcijos endonuklezės, metiltransferazės ir struktūriniai su DNR sąveikaujantys baltymai išsuka bazes iš DNR (Cheng ir Blumenthal, 1996; Klimašauskas ir Liutkevičiūtė, 2009). Taigi, bazės išsukimas yra plačiai paplitęs reiškinys, nuo jo atradimo pradžios intensyviai tyrinėjamas įvairiais metodais. Tyrinėjimą apsunkina dinamiška šio reiškinio prigimtis ir metodų ribotumas.

Baltymo-DNR kompleksų kristalų struktūrų nustatymas – vienintelis neabejotinas bazės išsukimo įrodymas. Geros skiriamosios gebos struktūriniai duomenys leidžia tiksliai pamatyti baltymo ir DNR sąveikos detales, tačiau gautas vaizdas yra mažiausios laisvosios energijos baltymo-DNR kompleksas su visiškai išsukta baze, todėl apie bazės išsukimo greitį ir tarpines stadijas sužinoma nedaug. Kitas didelis šio metodo trūkumas yra empirinis kristalinimo sąlygų parinkimas, galintis užtrukti neribotą laiką ir nebūtinai baigtis sėkmingai. Šiuo metu yra išspręsta virš 20 skirtingų fermentų struktūrų su išsuktomis bazėmis. Išsukimas yra įvairus: metiltransferazės ir gliukoziltransferazės išsuka modifikuojamus nukleozidus; reparacijos fermentai dažnai išsuka priešais taisomą nukleotidą esančią bazę (Cheng ir Roberts, 2001); fotoliazė – taisomą nukleozidų dimerą (Mees ir kt., 2004), o restrikcijos endonuklezės išsuka bazių porą, taip sutrumpindamos atpažįstamą seką nuo 5 iki 4 bp ilgio (pav. 1.12) (Bother ir kt., 2006).

Priešingai nei kristalografija, branduolių magnetinis rezonansas (BMR) – metodas, galintis suteikti daugiau informacijos apie nukleotido išsukimo dinamiką. Mažų baltymų struktūros jau yra sprendžiamos BMR, tačiau didesniems baltymams dėl jų riboto tirpumo ir sudėtingos duomenų analizės, BMR, turbūt, bus pritaikytas ateityje, vystantis technologijoms. Deja, naudojant branduolių magnetinio rezonanso metodą, iki šiol nėra išspręsta nė viena baltymo-DNR struktūra su išsukta baze. Tačiau BMR buvo naudotas

metiltransferazės ir fotoliazės atliekamam bazių išsukimui tirti, kai DNR buvo pažymėta ^{19}F (Klimašauskas ir kt., 1998), ^{13}C arba ^{15}N (Torizawa ir kt., 2004). BMR taip pat buvo naudotas tiriant DNR "kvėpavimą", t.y. trumpalaikį bazių porų vandenilinių jungčių suardymą ir dalinį bazių išsukimą (apie 30° - 40° (Cao ir kt., 2004)). BMR buvo stebėtas guanino N1 ir timino/uracilo N3 protonų apsikeitimo greitis su terpėje esančiais protonais. Nustatyta, kad A-T bazių pora "įkvėpia" kas 1-5 ms, G-C – kas 10-50 ms, o pats "įkvėpimas" trunka nuo dešimt iki kelių šimtų nano sekundžių (Dornberger ir kt., 1999).

Iš kai kurių biocheminių eksperimentų rezultatų taip pat galima spręsti apie bazės išsukimą. DNR metiltransferazių ir DNR reparacijos fermentų asociacijos konstantos su DNR yra geresnės, jei išsukamos bazės nėra (abazinis taikiny) arba ji yra klaidingai suporuota, lyginant su normalia bazių pora taikinyje (Klimašauskas ir Roberts, 1995; Cheng ir Roberts, 2001; Krosky ir kt., 2005; Gerasimaitė ir kt., 2011). Fermentai dalį energijos, gautos sąveikaujant su DNR, panaudoja bazei išsukti, todėl stebima bazių poros stiprumo ir sąveikos giminingumo atvirkštinė koreliacija.



Paveikslas 1.12. Baltymų-DNR kristalų struktūrose matomos įvairiai išsuktos bazės. Taikinio bazės išsukimas (M.HhaI; PDB kodas 1mht), priešais taikinio basę esančios bazės išsukimas (T4-pdg, taip pat žinomas kaip T4 endonukleazė V; 1vas), pažeistų dinukleotidų išsukimas (DNR fotoliazė; 1tez) ir taikinio centrinės nukleotidų poros išsukimas (R.Ecl18kI; 2fqz). Baltymų modifikuojamos DNR vietos yra paryškintos ir nurodytos punktyrinėmis rodyklėmis, juodomis rodyklėmis nurodytos išsuktos bazės. Baltymai neparodyti.

Kitas metodas, kuris buvo pritaikytas M.HhaI bazės išsukimui tirti, yra citozino prie C5 atomo esančio vandenilio apkeitimas su terpėje esančiu vandeniliu, kuris ateina iš vandens molekulės. Ši reakcija vyksta dvinariuose

M.HhaI-DNR kompleksuose, tik visiškai išsukus taikinio bazę į aktyvų fermento centrą ir katalitiniam cisteinui (Cys81) sudarius kovalentinę ryšį su citozino C6 atomu (susiformuoja 5,6-dihidrocitozino darinys) (Wu ir Santi, 1987). Šis apkeitimas gali būti užfiksuotas, reakcijas vykdant deuteruotame vandenyje arba naudojant tritintą DNR. Pirmuoju atveju po reakcijos atliekama citozino masių spektrometrijos analizė, nes citozino masė padidėja vienetu, o antruoju atveju – stebimas radioaktyvumo pokytis, nes iš DNR radioaktyvus tritis pereina į terpę (Wu ir Santi, 1987; Daujotytė ir kt., 2004). Tai vienas iš kelių eksperimentų, kuriuo galima tirti bazės išsukimą, naudojant natūralų DNR substratą, tačiau šiuo eksperimentu negalima atskirti baltymo sugebėjimo išsukti taikinio bazės ir efektyvaus M.HhaI-DNR kovalentinio komplekso susidarymo.

2-aminopurino (2AP) fluorescencinė spektroskopija yra dažniausiai naudojamas metodas fermentų vykdomam bazės išsukimui tirti. 2AP yra adenino analogas, kurio fluorescencija yra stipriai slopinama dvigrandėje DNR ir žymiai išauga išsukus šią bazę (Holz ir kt., 1998). Fluorescencijos padidėjimas gali siekti nuo keliasdešimt iki kelių kartų, priklausomai nuo to, į kokią aplinką 2AP patenka. Esant nepolinėms ir/arba aromatinėms ar. baltymo aktyviame centre, fluorescencijos pokytis gali būti minimalus. Toks rezultatas nėra bazės išsukimo įrodymas, nes jo prigimtis gali būti kita: DNR lenkimas ar gretimos bazės išsukimas, dėl ko 2AP yra iš dalies eksponuojamas į aplinką. Daugiau informacijos apie skirtingas fluoroforo aplinkas išsukimo metu gauname, naudojant nuo laiko priklausomą (angl. time-resolved) fluorescencinę spektroskopiją, tačiau prietaisai, reikalingi šiems matavimams, nėra plačiai prieinami (Neely ir kt., 2005). 2AP su timinu sudaro beveik kanoninę A-T porą (Goodman ir Ratliff, 1983), taigi, naudojant jį vietoj adenino gaunamas minimalus poveikis bazių poros stiprumui. Tuo tarpu, tiriant citozino išsukimą, sudaroma nekanoninė 2AP-G bazių pora, kuri skiriasi nuo C-G bazių poros tiek struktūriškai, tiek sudaromų vandenilinių jungčių skaičiumi (Law ir kt., 1996; Daujotytė ir kt., 2005; Neely ir kt., 2005), todėl gauti duomenys negali būti vienareikšmiškai pritaikomi natūraliam substratui.

Įvairūs cheminiai reagentai nuo seno buvo naudojami DNR ir RNR struktūroms tirti. Tam tikros DNR vietos padidėjęs jautrumas reagentui paprastai rodo, kad ta vieta yra atviresnė, pvz. dėl bazės išsukimo. Modifikuota vieta dažniausiai identifikuojama po piperidino indukuoto DNR grandinės trūkio ir elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis. Tokie metodai nereikalauja sudėtingos įrangos ir gali būti atliekami paprasčiausioje laboratorijoje, tačiau dažnai cheminiai reagentai reaguoja ne tik su DNR, bet ir su baltymais, juos inaktyvindami. KMnO_4 buvo sėkmingai panaudotas išsuktiems timinams identifikuoti MTazių-DNR kompleksuose (Serva ir kt., 1998), o hidroksilo radikalas – I tipo DNR metiltransferazės M.EcoRI24I bazės išsukimo tyrimams (Mernagh ir Kneale, 1996).

Nors yra sukurta ir išbandyta nemažai metodų fermentų atliekamam bazės išsukimui tirti, dažnai jie yra sudėtingi (kristalografija, BMR), pritaikyti konkreitiems pavieniams atvejams (citozino-5 protono apkeitimas) arba naudoja klaidingai suporuotas bazes (fluorescenciniai, cheminiai). Taigi, naujų paprastų metodų, kurie leistų stebėti natūralių bazių porų išsukimą fermento-DNR kompleksuose, sukūrimas mokslo pasaulyje yra pageidautinas.

2 MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Reagentai

Aukščiausio švarumo 2-chloroacetaldehidai, formaldehidai (37%), acetaldehidai, propanalio, glicino betaino aldehidai, benziloksiacetaldehidai, 2-merkaptioetanolis, L-cisteinas, L-selenocisteinas, 2,2'-diaminodietildisulfido dihidrochloridas, 2-aminoetantiolio hidrochloridas, 2,2'-diaminodietildiselenido dihidrochloridas ir kiti buvo pirkti iš „Sigma-Aldrich“, D,L-1,4-ditiotreitolis (DTT) – iš „Fermento“. Reikiamos švarumo skalės tirpikliai, naudoti HPLC, pirkti iš "Roth".

2.1.2 Radioaktyvios medžiagos

$[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ ir $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{CTP}$, specifinis aktyvumas >2500 Ci/mmol; $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, specifinis aktyvumas >5000 Ci/mmol (“Hartmann analytic”).

2.1.3 Fermentai

Nukleazė P1 pirka iš "Sigma-Aldrich"; šarminės fosfatazės CIAP ir FastAP, DNR polimerazė Klevow Fragment exo⁻, Taq DNR polimerazė, nukleazė BAL31, T4 polinukleotidkinazė, T4 DNR ligazė, restrikcijos endonukleazės ir jų buferiai pirkti iš „Fermento“; M.AluI, M.SssI, M.HaeIII, M.HpaII ir M.MspI pirkti iš „New England Biolabs“. M.HhaI ir jos mutantiniai variantai buvo išgryninti pagal aprašytą metodiką (Vilkaitis ir kt., 2000); pelės Dnmt1 mutantinė baltymo forma be N-galinių 290 ar. (Dnmt1-ΔN) buvo sukonstruota ir išgryninta dr. G. Vilkaičio pagal aprašytas procedūras (Vilkaitis ir kt., 2005); M.SssI buvo sukonstruota ir išgryninta Giedrės Urbanavičiūtės (Kriukienė ir kt., ruošama spaudai). Restrikcijos endonuklezės – R.Ec18kI, R.PspGI ir R.BcnI – naudotos reakcijose su Caa, buvo išgrynintos dr. Gintauto Tamulaičio pagal aprašytas metodikas (Tamulaitis ir kt., 2002; Pingoud ir kt., 2003; Sokolowska ir kt., 2007).

2.1.4 Buferiniai ir kiti tirpalai

M.AluI ir kitų MTazių reakcijos buferis: 25 mM MOPS, 25 mM MES (pH 7.5), 0.5 mM EDTA, 15 mM NaCl, 2 mM 2-merkaptoetanolio, 0.2 mg/ml BSA.

Restrikcijos endonukleazių reakcijos buferis: 33 mM Tris-OAc (pH 7.9), 66 mM K-OAc, 10 mM CaCl₂, 0.2 mg/ml BSA.

P1 nukleazės buferis: 10 mM Na-OAc (pH 5.2), 1 mM Zn-OAc₂.

0.5x TBE – 44.5 mM Tris-HCl (pH 8.0), 44.5 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA.

Tris-OAc/Ca-OAc₂ – 40 mM Tris-OAc (pH 8.3), 10 mM Ca-OAc₂.

M.HhaI aldehydų reakcijos buferis: 50 mM MOPS, 50 mM MES (pH 7.0), 0.5 mM EDTA, 15 mM NaCl, 2 mM 2-merkaptoetanolio, 0.2 mg/ml BSA.

M.HhaI reakcijos buferis (TEN): 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA.

M.HhaI saugojimo buferis: 10 mM K-PO₄ (pH 7.4), 5 mM EDTA, 10 mM 2-merkaptoetanolio, 100 mM NaCl, 50% glicerolio.

Buferiai, naudoti tiolių ir selenolių prijungimui:

Tris-HCl buferis: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5, 8.0 ir 8.0), 0.2 mg/mL BSA, 0.5 mM EDTA.

Citratinis buferis: 15 mM Na-citratas (pH 5.0, 5.5, 6.0 ir 6.5), 0.2 mg/mL BSA.

Fosfatinis buferis: 10 mM Na-PO₄ (pH 6.5, 7.0, 7.5 ir 8.0), 0.2 mg/mL BSA, 0.5 mM EDTA.

Acetatinis buferis: 50 mM Na-OAc (pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 ir 7.4), 0.2 mg/mL BSA.

2.1.5 Sintetiniai oligonukleotidai

Oligonukleotidai buvo susintetinti "MWG Biotech", "Integrated DNA Technologies" arba "Metabion" kompanijose. Oligonukleotidai, turintys hmC,

buvo susintetinti “IBA Nucleic Acids Synthesis”, tačiau po sintezės didelė dalis hmC bazės buvo apsaugota O-cianetilgrupe, kuri buvo pašalinta, inkubuojant oligonukleotidus 0.1 M NaOH 65°C 7 val. Po to oligonukleotidai buvo išsodinti.

Lentelė 2.1. DNR substratai. M – 5-metilcitozinas, H – 5-hidroksimetilcitozinas, taikinio sekos paryškintos, išsukami eksperimentuose stebimi citozinai pabraukti. TLC substratuose pabrauktos bazės yra 5' pažymėtos ³³P (oligonukleotidų pavadinimuose ³³P žymę nurodo “*”, esantis prieš bazę). Pasvirosiomis raidėmis nurodytos DNR polimerazės Klenow Fragment exo⁺ susintetintos nukleobazės.

Seka	Bazių sk.	Pavadinimas
DNR naudota denatūruojančiuose PAA geliuose		
5' -GTAATAGACTGCACCGACCGCCAGGCCGGCGAGCTTTACGAT 3' -ATTATCTGACGTGCTGCGCGGTCCGGCCGCTCGAAATGCTAT	42	vCG/aCG-42
5' -TACAGTATCAGGGCGCTGACCCACAA 3' - TGTCATAGTCCGMGACTGGGTGTTG	25	GCGC/GMGC-25
5' -TACAGTATCAGGGCGCTGACCCACAA 3' - TGTCATAGTCCCMGACTGGGTGTTG	25	GCGC/GMCC-25
5' -TGACCCACGCTCGCCCGGCGACACATTACGT 3' -ACTGGGTGCGAGCGGGCCGCTGTGTAATGCA	31	CCCGG/GGGCC-31
5' -TGACCCACGCTCGCCCGGCGACACATTACGT 3' -ACTGGGTGCGAGCGGGCCGCTGTGTAATGCA	31	CCCGG/GGCC-31
DNR naudota HPLC eksperimentuose		
5' -TAATAATGCGCTAATAATAATAAT 3' -ATTATTA C GCGATTATTATTATTA	24	GCGC/GCGC-24
DNR naudota TLC eksperimentuose		
5' -CCAGCTGCATTAATGAATC	19	*CCN-19
5' -TGACCCACGCTCGCCCGGAGATAAAATTATGT 3' -ACTGGGTGCGAGCGGGCCCTCTATTTAATACA	31	CC*CGG/CCGGG-31
5' -TCGGATGTTGTGGGTGAGCGCATGATAGTGTA 3' -AGCCTACAACACCCAGT C GCGTACTATCACAT	32	G*CG*/GCGC-32
5' -TCGGATGTTGTGGGTGAGCGCATGATAGTGTA 3' -AGCCTACAACACCCAGT C GMGTACTATCACAT	32	G*CG*/GMGC-32
5' -CGCGCCATTCCCTGCGAGCTTTAGGATA 3' -GCGCGGTAAGGACGCTCGAAATCCCTAT	27	AG*CT/AGCT-27
5' -CGGATGTTGTGGGTCA H HGCATCATACTCTA 3' -GCCTACAACACCCAGT C GMGTAGTATGAGAT	31	G*HGC/GMGC-31

2.2 Metodai

2.2.1 DNR manipuliacijos *in vitro* metodai

2.2.1.1 Oligonukleotido 5'-galo fosforilimas

T4 polinukleotidkinazės buferyje sumaišome sintetinį oligonukleotidą (0.5 μM), radioaktyviai žymėtą [γ -³³P]ATP arba [γ -³²P]ATP (0.5 μM) ir bakteriofago T4 polinukleotidkinazę (0.5 a.v./μl). Reakcijos mišinys 15 min

inkubuojamas 37°C temperatūroje, po to fermentas inaktyvinamas pakaitinus 10 min 70°C temperatūroje.

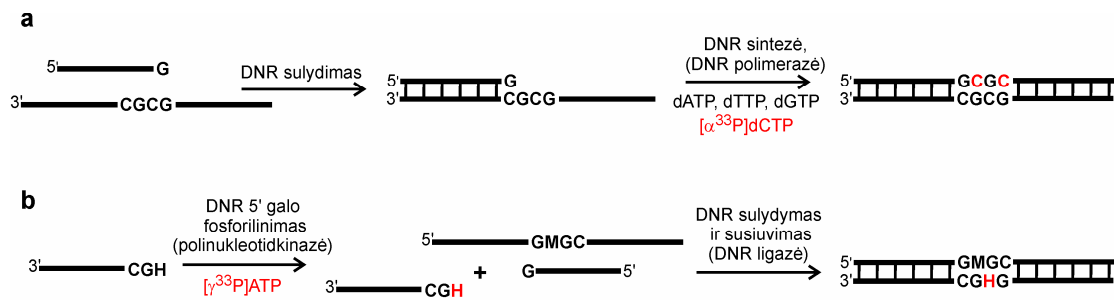
2.2.1.2 Dvigrandžių oligonukleotidų paruošimas

Komplementarūs oligonukleotidai vandenyje sumaišomi moliariniu santykiu 1:1.2 (imamas nežymėtos grandinės perteklius). Ruošiant nežymėtą DNR, abi grandinės sumaišomos vienodais kiekiais. Paruoštas tirpalas talpinamas į termociklerį, kur 3 min palaikoma 85°C temperatūra, o po to atvėsinama 0.01 °C/s greičiu. Arba paruoštas tirpalas dedamas iki 85-95°C temperatūros pašildytą vandens vonią ir leidžiama ataušti iki kambario temperatūros.

2.2.1.3 Oligonukleotidų paruošimas plonasluoksnės chromatografijos eksperimentams

Dvigrandžių oligonukleotidų CC*CGG/CCGGG-31, G*CG*C/GCGC-32, G*CG*C/GMGC-32, AG*CT/AGCT-27 trumpoji grandinė prailginama DNR polimerazės Klenow Fragment exo^- pagalba, laikantis gamintojo rekomendacijų („Fermentas“) (pav. 2.1a). Klenow'o reakcijos buferyje sumaišome dATP, dTTP, dGTP (≥ 2 mM kiekvieno), $d[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{CTP}$ (≥ 1 μM), sulydytą oligonukleotidą (400 nM) ir Klenow Fragment exo^- polimerazę (0.05 a.v./ μl). Reakcijos mišinys 30 min inkubuojamas 37°C temperatūroje, po to DNR polimerazė inaktyvinama, pakaitinus 10 min 75°C temperatūroje, o DNR perlydoma (2.2.1.2).

G*HGC/GMGC-31 substratas paruoštas DNR oligonukleotido 5'-HGCATCATACTCTA 5' galą pažymėjus ^{33}P fosforilinant (2.2.1.1), o po išsodinimo sulydžius su komplementariais oligonukleotidais 5'-CGGATGTTGTGGGTCAG ir 3'-GCCTACAACACCCAGTCGMGTAGTATGAGAT (250 nM) ir susiuvus DNR grandinės trūkį, naudojant DNR ligazę (0.06 a.v./ μl , 2 val, 16 °C) (pav. 2.1b).



Paveikslas 2.1. G*CG*C/GCGC-32 (a) ir G*HGC/GMGC-31 (b) substratų ruošimo schemas. Raudonai nurodyti 5' gale ^{33}P pažymėti nukleotidai, H – 5-hidroksimetilcitozinas, M – 5-metilcitozinas.

2.2.1.4 DNR išsodinimas

DNR išsodinama 3 tūriais 96% šalto etanolio ir 1/10 tūrio Na-OAc (pH 7.0) 3 M. Mėginiai šaldomi 1 val -20°C temperatūroje ir centrifuguojami 16000Xg 10 min, 1-3 kartus plaunami 75% etanoliu ir džiovinami 15-30 min $20-55^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

2.2.1.5 DNR veikimas piperidinu

DNR ištirpinama 40-100 μl 1 M šviežiai skiesto piperidino, inkubuojama 30 min 90°C temperatūroje ir garinama vakuuminiame įrenginyje 45°C temperatūroje iki sausumo.

2.2.1.6 Cheminis DNR sekos nustatymas: purinų takelio paruošimas

Purinų (G+A) takelis buvo ruošiamas pagal tradicines cheminio oligonukleotidų sekos nustatymo metodikas (Sambrook ir Russell, 2001). 4 μl 0.5 mg/ml pBR322 DNR ("Fermentas"), 10 μl 50 nM ^{33}P arba ^{32}P žymėto oligonukleotido ir 3 μl 8.8% HCOOH inkubuojama 15 min 37°C temperatūroje. Po to DNR veikiama piperidinu (2.2.1.5) ir ištirpinama formamide.

2.2.1.7 PGR fragmentų ruošimas

618 bp ir 1032 bp DNR fragmentai buvo paruošti standartiniu PGR metodu, naudojant pradmenų poras 5-AACGTTGTTGCCATTGCTAC ir 5-GCTCATGAGACAATAACCCTGA bei GGGTTACATCGAACTGG ir

GAGCGGATAACAATTTACACAGG bei matricinę pUC19 plazmidę. Sintetinant hmC turinčius DNR fragmentus, vietoje dCTP buvo naudotas dhmCTP. Po PGR reakcijos, DNR išvalyta, naudojant sefadekso G-25 kolonėles arba QIAquick® PGR valymo rinkinį („Qiagen“).

Kiekybinio PGR eksperimentui buvo paruošti du PGR fragmentai: 1) 230 bp specifinis, kuris turi du M.SssI taikinius; 2) 200 bp kontrolinis, neturintis M.SssI taikinių. Fragmentai ruošti, naudojant du rinkinius pradmenų: 1) 5'-GCCCATGTCGCTGTG ir 5'-AAGATGTGTCCHGGCTGGCCTATACTCAGHGC (specifiniam fragmentui; H – 5-hidroksimetilcitozinas); 2) 5'-GCCCACTTCACTTCTTGTG ir 5'-AGGCCAAAAGAAAGAAGAGAT (nespecifiniam fragmentui) bei atitinkamai bet kurios pelės linijos ir pelių linijos C57BL/6J DNR. Po PGR, reikiamo dydžio fragmentai buvo valomi iš agarozinio gelio, naudojant QIAquick® DNR valymo rinkinį („Qiagen“). Šiuos fragmentus ruošė dr. Edita Kriukienė.

2.2.2 Reakcijos su egzogeniniais reagentais

Elektroforetinio DNR frakcionavimo denatūruojančiomis sąlygomis ir TLC eksperimentuose naudota 20 nM DNR koncentracija ir 1-20 kartų didesnis baltymo perteklius, HPLC eksperimentuose naudotos 13 μM DNR ir baltymo koncentracijos. Eksperimente su λ fago DNR naudotos 820 nM taikinių (0.12 μg/μl λ fago DNR) ir 3.3 μM M.HhaI koncentracijos. Galutinės reagentų koncentracijos buvo: 13 mM formaldehido, 400-800 mM acetaldehido, 200 mM propionaldehido, 100-400 mM 2-chloroacetaldehido, 1.2-50 mM L-cisteino, 2-aminoetantiolio, L-selenocisteino, 2-aminoetanselenolio arba DTT, 150-500 mM 2-merkaptioetanolio, 0.5 mM adenzil-5'-tiolio. Reakcija vykdoma iki 2 val 20°C arba 37°C temperatūroje. 2-aminoetantiolis, 2-aminoetanselenolis ir L-selenocistinas prieš kiekvieną reakciją buvo ruošiami šviežiai iš atitinkamų disulfidų arba diselenidų, inkubuojant su 4xDTT pertekliu 10-120 min 20-37° temperatūroje. Po redukcijos reagentai

buvo naudojami be papildomo gryninimo. Po reakcijos DNR išsodinama (2.2.1.4).

2.2.3 Fermento-DNR sąveikos tyrimas elektroforetinio judrumo poslinkio poliakrilamidiniame gelyje metodu

Dvigrandžiai oligonukleotidai, kurių viena grandinė 5'-gale buvo pažymėta ^{32}P arba ^{33}P fosforilinant (2.2.1.1), 20 min k.t. inkubuoti su baltymais su arba be egzogeninio reagento. Mėginiai analizuoti 8% PAA gelyje (akrilamido ir bisakrilamido santykis 19:1), frakcionuojant 0.5xTBE buferyje 45-90 min, esant 10 V/cm įtampai (MTazių mėginiai) arba Tris-OAc/Ca-OAc₂ buferyje 90-180 min, esant 5 V/cm įtampai (REazių mėginiai). Po elektroforezės geliai išdžiovinti ant Whatman 3MM popieriaus ir eksponuoti su fotoekranu. Fotoekranas nuskanuotas FLA-5100 („Fujifilm“) arba Cyclone PhosphorImager („Packard Instrument Co.“) skaneriais. Baltymo-DNR komplekso ir nesurištos DNR zonų intensyvumas įvertintas, naudojant kompiuterines programas MultiGauge arba OptiQuant.

2.2.4 Elektroforetinis DNR frakcionavimas denatūruojančiomis sąlygomis

DNR, kurios viena grandinė 5'-gale buvo pažymėta ^{32}P arba ^{33}P fosforilinant (2.2.1.1), resuspenduota formamide. Elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis vykdyta 15% ar 20% PAA gelyje (akrilamido ir bisakrilamido santykis 19:1) su 7 M urėjos, 1xTBE buferyje 1-2 val, esant 60-65 W galiai. Po elektroforezės gelis fiksuotas 10 min 10% acto rūgšties tirpale, acto rūgštis nuplauta vandeniu, gelis džiovintas ant Whatman 3MM popieriaus ir eksponuotas su fotoekranu.

2.2.5 Vienkryptė ir dvikryptė plonasluoksnė chromatografija

Po reakcijos su egzogeniniu reagentu (2.2.2) DNR išsodinta (2.2.1.4) ir hidrolizuota nukleaze Bal31 (0.1-0.05 a.v./μl, 1-3 val 30°C temperatūroje BaL31 buferyje) arba P1 (0.02-0.01 a.v./μl 1 val 55°C temperatūroje P1

buferyje) iki 5'-NMP. Po to 0.5-2 μ l mėginio užnešta ant 20x10 cm PEI CelluloseF ("Merck") TLC plokštelių. Pirmoji kryptis leista 20 cm tirpale izosviesto rūgštis – vanduo – amoniakas ($\geq 25\%$) (16.5:4.25:1), po to plokštelė džiovinta traukos spintoje 2 val arba per naktį. Atliekant dvikryptę pluonasluoksnę chromatografiją, išdžiovinta TLC plokštelė pasukta 90°C kampu ir leista antroji 10 cm kryptis tirpale amonio sulfatas (sotus tirpalas) – izopropanolis – natrio acetatas (1M) (40:1:9) (Kuchino ir kt., 1987). Po to plokštelė džiovinta 30 min ir eksponuota su fotoekranu. Fotoekranai nuskanuoti, naudojant FLA5100 skanerį ir analizuoti MultiGauge programa (Fujifilm).

2.2.6 Aukšto slėgio skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos metodas

Išsodinti GCGC/GCGC-24 oligonukleotidų dupleksai, tirpinti P1 buferyje ir hidrolizuoti iki nukleotidų nukleaze P1 (0.01 a.v./ μ l, 2 val 55°C). Nukleotidai defosforilinti iki nukleozidų šarmine fosfataze CIAP arba FastAP (0.01 a.v./ μ l, per naktį 37°C). Mėginiai filtruoti per 3000 Da porų dydžio filtrus Microcon koncentratoriuose (arba kaitinti 75°C 15 min, o denatūravusios baltymų nuosėdos nucentrifuguotos 20000Xg 30 min k.t.) ir analizuoti, naudojant integruotą HPLC/ESI-MS "Hewlett-Packard 1100 series" sistemą. Nukleozidų mėginiai buvo užnešti ant Discovery HS C-18 75x2.1 mm kolonėlės ir išplauti, naudojant 2 tirpalų linijinį gradientą (A: 20 mM amonio formiatas (pH 3.5) arba amonio acetatas (pH 5.5) ir B: 80% metanolis), esant 0.3 ml/min tekėjimo greičiui, 30°C temperatūrai ir naudojant metodą: 0–20 min, 0–20% B; 20–22 min, 20–100% B; 22–27 min, 100% B; 27–29 min, 0–100% A. UV spektrai (190–400 nm) pikų maksimumuose užrašyti, naudojant diodinį UV absorbcijos detektorius. Aukštos skiriamosios gebos masės spektrai (ang. k. „high-resolution mass spectra“, HRMS) gauti naudojant Thermo Electron LTQ Orbitrap masių spektrometrą ir nanoelektroišpurškimo jonizatorių (Proxeon NanoSpray ESI) arba Agilent Q-TOF 6520 masių spektrometrą ir dvigubą elektroišpurškimo jonizatorių (Dual-ESI).

2.2.7 Plazmidinės pUC19 DNR žymėjimas M.HhaI taikiniuose

0.2 mg/ml pUC19 DNR (2 μ M M.HhaI atpažinimo taikinių), 8 μ M M.HhaI ir 13 mM formaldehido inkubuota k.t. 30 μ l TEN buferio. Po 1 val į reakciją pridėtas šviežiai skiestas L-cisteinas iki 50 mM galutinės koncentracijos. Dar po valandos reakcijos buvo praskiestos 6 kartus ir baltymai pašalinti vieną kartą ekstrahuojant fenoliu, 2 kartus fenolio/chloroformo/izoamiloalkoholio mišiniu (Roti®-Phenol/C/I) ir 3 kartus chloroformu. Vandeninė fazė buvo atskirta ir DNR išsodinta izopropanoliu (0.9 tūrio bei 1/10 tūrio Na-OAc (pH 7.0), 3 M). Po to modifikuota DNR veikta 250 μ M fluoresceino NHS esteriu (6-[Fluoresceino-5(6)-karboksamido]heksanoinės rūgšties N-hidroksisukcinimido esteris, „Fluka“) 0.15 M natrio bikarbonatiniame buferyje (pH 9.0) k.t. 1.5 val. Po reakcijos DNR išvalyta nuo nesureagavusio dažo, naudojant QIAquick® nukleotidų pašalinimo rinkinį („Qiagen“). Galiausiai, žymėta DNR buvo suhidrolizuota R.FspBI ir analizuota 2% agaroziniame gelyje. Po elektroforezės gelis nuskanuotas FLA-5100 skaneriu, naudojant 473 lazerį, ir po to nudažytas etidžio bromidu.

2.2.8 PGR fragmentų, turinčių hmC, žymėjimas M.SssI taikiniuose

790 ng 618 bp PGR fragmento, susintetinto, naudojant dhmCTP (32 M.SssI taikiniai), ir 790 ng 1032 bp PGR fragmento (67 M.SssI taikiniai) buvo inkubuoti su M.SssI (2.5-3 kartinis perteklius lyginant su taikiniai) ir 12,5 mM 2-aminoetantiolio arba 50 mM DTT 1 val k.t. 30-100 μ l acetatinio buferio (pH 6.0). Po reakcijos DNR išvalyta, naudojant QIAquick® PGR fragmentų valymo rinkinį („Qiagen“). Po to modifikuota DNR veikta atitinkamai 160 μ M Cy5 NHS esteriu („Fluka“) 40 μ l 0.15 M natrio bikarbonatiniame buferyje (pH 9.0) k.t. 2 val arba 30 μ M ATTO-520 maleimidu („ATTO-TEC GmbH“) 60 μ l 500 mM Na-OAc ir 2 mM TCEP (tris(2-karboksietil)fosfinas) tirpale (pH 7.0) per naktį. Po reakcijos DNR išvalyta nuo nesureagavusio dažo, naudojant QIAquick® PGR fragmentų valymo rinkinį („Qiagen“). Galiausiai, žymėta DNR buvo analizuota 1% agaroziniame gelyje. Po elektroforezės gelis

nuskanuotas FLA-5100 skaneriu, naudojant 633 nm (Cy5) arba 473 nm (ATTO-520) lazerį ir po to nudažytas etidžio bromidu.

2.2.9 Žymėjimas biotinu ir hmC turinčios DNR praturtinimas

Eksperimentą atliko dr. Edita Kriukienė. hmC turintis (specifinis, du M.SssI taikiniai su hmC) ir neturintis (kontrolinis, nėra M.SssI taikinių) PGR fragmentai (50 ng kiekvieno, 32 nM M.SssI taikinių koncentracija) buvo inkubuoti su 12 mM 2-aminoetantioliu, esant 4 μM M.SssI 1 val 24°C temperatūroje acetatiniame buferyje (pH 6.0). Po reakcijos DNR išvalyta QIAquick® nukleotidų pašalinimo rinkiniu („Qiagen“) ir pažymėta biotinu, naudojant disulfido-N-hidroksisukcinimido esterį („Sigma-Aldrich“). Žymėjimas vykdytas 0.15 M natrio bikarbonatiniame buferyje 2.5 val k.t. DNR vėl išvalyta QIAquick® nukleotidų pašalinimo rinkiniu ir inkubuota su streptavidinu dengtomis magnetinėmis dalelėmis Dynabeads M-280 („Invitrogen“) 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1 M NaCl buferyje besisukančioje purtyklėje 3 val. Dalelės surinktos magnetiniame stovelyje, 3 kartus plautos inkubavimo buferiu ir galiausiai suspenduotos 10 mM Tris-HCl (pH 8.5). Tiesiai nuo dalelių buvo daromas daugybinis tikro laiko PGR, naudojant Rotor-Gene™ 6000 tikro laiko PGR instrumentą ("Corbett Research") ir tikro laiko PGR rinkinį Maxima™ Probe qPCR Master Mix ("Fermentas"). Galutiniame 25 μl tikro laiko PGR reakcijos tūryje buvo 0.9 nespecifinio ir 0.3 specifinio μM pradmenų ir 0.25 μM dvigubai pažymėto TaqMan zondo (Metabion) (lentelė 2.2). Amplifikacijos programa buvo nustatyta: 95°C 10 min, 40 ciklų 95°C 15 sek, 60°C 1 min. Duomenys analizuojami Rotor-Gene™ programa. Rezultatai pateikti procentais ant dalelių prikibusio DNR kiekio, palyginus su neprikibusia frakcija.

Lentelė 2.2. Pradmenys, naudoti RT-PGR.

Fragmentas	Pradmens pavadinimas	Pradmens seka (5'→3')
Specifinis fragmentas	Specifinis-dir	ATGTGTTGGAGTGTGCCTGA
	Specifinis-rev	GTGGCTCTGATTGATGGCTC
	TaqMan zondas	FAM-TCCCTGTGTGATCACCCCTATGCTTG-BHQ1
Kontrolinis fragmentas	Kontrolinis-dir	CAGGCCTCTTCAAGGGTCA
	Kontrolinis-rev	AAGAGATGAGGGCCTGGG
	TaqMan zondas	JOE-TGGCCCATACCTCTTCAAGGGCA-BHQ1

2.2.10 Cheminė modifikuotų nukleozidų sintezė

5-hidroksimetil-2'-deoksicitidinas (hmC), 5-hidroksimetil-2'-deoksiuridinas (hmU) ir 5-(2-hidroksietiltio)metil-2'-deoksiuridinas (hetmU) buvo chemiškai susintetinti pagal aprašytas metodikas su pakeitimais (Tardy-Planechaud ir kt., 1997; LaFrancois ir kt., 1998). Šių modifikuotų nukleozidų sintezę atliko dr. Viktoras Masevičius.

Adenozil-5'-tiolis buvo susintetintas pagal Pignot ir kt. publikuotą metodiką (Pignot ir kt., 2000), sintezę atliko dr. Milda Malvina Burbulienė ir dr. Viktoras Masevičius.

2.2.10.1 5-hidroksimetil-2'-deoksicitidino (hmC) sintezė

3 ml 20% formaldehido, 0.5 g (1.90 mmol) 2'-deoksicitidino hidroklorido ir 4 ml trietilamino inkubuota, maišant 30 min k.t., o po to patalpinta į sandarų plieninį indą ir laikyta 7 dienas 65°C (reakcijos konversija 50%). Reakcijos mišinys buvo atšaldytas, o vandeninis sluoksnis atskirtas ir praleistas per 4 g katijonito (Dowex 50Wx8 arba panašios H⁺ formos). Produktas eliuotas vandeniu, o apjungtos frakcijos koncentruotos sumažintame slėgyje. Tikslinio produkto išgryninimui naudota silikagelio chromatografija (40–60 μm, eliuentas chloroformas:metanolis 1:1). Išgrynina ~26 mg hmC (9%), kurio ¹H branduolio magnetinio rezonanso (BMR) spektras (300 MHz, DMSO-D₆) visiškai sutapo su literatūroje aprašytu (Tardy-Planechaud ir kt., 1997).

2.2.10.2 5-hidroksimetil-2'-deoksiuridino (hmU) sintezė

hmU buvo sintetinamas taip pat kaip ir hmC, tik iš 0.5 g (2.19 mmol) dU. Galutinėje stadijoje tikslinio produkto išgryninimui naudota silikagelio chromatografija (40–60 μm, eliuentas 90% acetonitrilas). Išgryninta 0.19 g (34%) hm-dU, kurio ¹H BMR spektras (300 MHz, DMSO-D₆) visiškai sutapo su literatūroje aprašytu (Shiau ir kt., 1980); ¹³C BMR spektas yra (75 MHz, DMSO-D₆): δ = 40.47, 56.70, 62.14, 71.25, 84.59, 87.99, 114.96, 137.46, 150.07, 163.35.

2.2.10.3 5-(2-hidroksietiltio)metil-2'-deoksiuridino (hetmU) sintezė

Į polipropileno reakcijos indą supilama hmC (0.042 g; 0.16 mmol) suspensija 0.4 ml 2-merkaptoetanolio ir įlašinama trifluoracto rūgštis (0.015 g; 0.13 mmol; 0.01 ml). Hermetiškas reakcijos indas kaitinamas 130°C temperatūroje 1 val, reakcijos mišinys atšaldomas iki k.t. ir supilamas į 5 ml CH₂Cl₂. Susidariusi suspensija užpilama ant 2 cm silikagelio 40-60 μm sluoksnio. Per šį silikagelio sluoksnį eliuojami 3 tūriai po 15 ml CH₂Cl₂. Produktas iš silikagelio sluoksnio išplaunamas 15 ml metanolio. Metanolis nugarinamas sumažintame slėgyje, likutis chromatografuojamas (silikagelis 40-60 μm, CH₃CN:H₂O – 20:1). Išeiga 28 mg (54%). ¹H BMR (300 MHz, DMSO-D₆): δ = 2.11 (dd, $J_{C2'-C1'} = 6.8\text{Hz}$, $J_{C2'-C3'} = 4.6\text{Hz}$, 2H, C2'), 2.54 (t, $J_{SCH_2-CH_2O} = 6,8\text{Hz}$, 2H, SCH₂CH₂), 3.38 (s, 2H, C₅CH₂S), 3.54 (t, $J_{OCH_2-CH_2S} = 6,8\text{Hz}$ 2H, CH₂CH₂O), 3.58 (t, $J_{C5'-C4'} = 3.9\text{Hz}$ 2H, C5'), 3.80 (td, $J_{C4'-C5'} = 3.9\text{Hz}$, $J_{C4'-C3'} = 2.8\text{Hz}$, 1H, C4'), 4.26 (td, $J_{C3'-C2'} = 4.6\text{Hz}$, $J_{C3'-C4'} = 2.8\text{Hz}$, 1H, C3'), 4,83 (brs, 1H, OH), 5.01 (brs, 1H, OH), 5.30 (brs, 1H, OH), 6.18 (t, $J_{C1'-C2'} = 6.8\text{Hz}$, 1H, C1'), 7.85 (s, 2H, C5), 10.65 (brs, 1H, NH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-D₆): δ = 27.95, 34.49, 40.38, 61.33, 62.08, 71.17, 84.75, 88.08, 111.76, 137.95, 150.96, 163.25. HR-MS: MS1 ([M + Na]⁺, C₁₂H₁₈N₂O₆SNa), suskaičiuota: 341,0778, pamatuota: 341,0779; MS2 ([MS1 minus deoksiribozė], C₇H₁₀N₂O₃SNa) suskaičiuota: 225.0304, pamatuota: 225.0298; MS3 ([MS2 minus SCH₂CH₂OH], C₅H₄N₂O₂Na), suskaičiuota: 147.0165, pamatuota: 147.0158.

2.2.10.4 Fermentiškai susintetinto hetmC deamininimas iki hetmU

hetmC buvo fermentiškai susintetintas iš 1.8 ml reakcijos (2.2.2) ir išgrynintas, naudojant HPLC analitinę koloną (2.2.6). Surinktos frakcijos buvo išgarintos iki sausumo ir inkubuotos su 3 M natrio nitrito 0.3 M Na-OAc (pH 4.5) buferyje 1 val 4°C. Reakcijos pH buvo privestas iki ~8.0 amoniaku ir reakcija inkubuota 4 val 37°C. Po to reakcijos iškart analizuotos HPLC metodu be papildomo gryninimo.

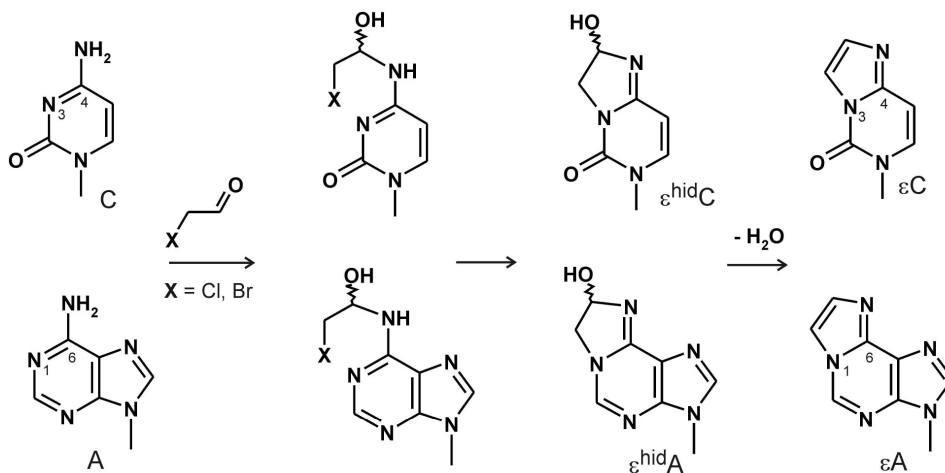
3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 2-chloroacetaldehido panaudojimas, tiriant fermentų vykdomą citozino išsukimą iš DNR spiralės

Fermentų vykdomą bazės išsukimą galima tirti įvairiais metodais (žr. 1.3 skyrių). Dalis jų yra pritaikyti pavieniams atvejams, yra labai sudėtingi ar tiria nenatūralių bazių porų išsukimą. Šiame darbe išbandėme cheminį ekstraspiralinių citozinių modifikacijos metodą, naudojant reagentą 2-chloroacetaldehidą (Caa), kuris yra paprastas, pigus ir gali būti panaudotas tiriant natūralių bazių porų išsukimą baltymo-DNR kompleksuose. Caa reakcijos su heterociklinėmis bazėmis yra neblogai ištirtos, aprašytos ir jau seniai naudojamos antrinėms RNR ir DNR struktūroms nustatyti. Mūsų tikslas buvo jas pritaikyti M.HhaI metiltransferazės ir kitų fermentų katalizuojamam bazės išsukimui tirti.

2-haloacetaldehidai (2-chloroacetaldehidai (Caa) ir 2-bromoacetaldehidai (Baa)) specifiškai reaguoja su viengrandžiais DNR regionais, modifikuodami C, A ir, žymiai silpniau, G bazes. Reakcija vyksta su tais heterociklinių bazių atomais (C – N³ ir N⁴, A – N¹, N⁶ (pav. 3.1)), kurie dvigrandėje DNR sudaro vandenilinius ryšius su priešais esančiomis bazėmis, todėl dvigrandė DNR yra apsaugota, o 2-haloacetaldehidai reaguoja tik su nesuporuotais citoziniais ir adeniniais. Pirmoje reakcijos stadijoje haloacetaldehidai yra prijungiami, susidarant tarpiniam produktui – -CH₂-CHOH- tilteliui tarp egzo ir endo azoto atomų. Antroje stadijoje vyksta dehidratacija, susidarant etenocitozinui ir etenoadeninui (pav. 3.1). Tiek adenino, tiek citozino reakcijos su 2-haloacetaldehidais optimalus pH 4.5-5. Neutraliame pH citozino atveju pirmoji reakcijos stadija vyksta gerai, tačiau dehidratacija labai sulėtėja, todėl šiomis sąlygomis galima stebėti hidratuotą etenocitozino produktą. Caa, būdamas mažiau reaktyvus nei Baa, yra tinkamesnis reagentas baltymo-DNR kompleksų tyrimams, norint išlaikyti šiuos kompleksus aktyvius (Biernat ir kt., 1978;

Krzyzosiak ir kt., 1981). Be to, Caa yra komerciškai prieinamas, todėl savo eksperimentus pradėjome su Caa.



Paveikslas 3.1. 2-haloacetaldehidų (2-chloroacetaldehido ir 2-bromoacetaldehido) reakcija su citozinu ir adeninu. Pirmiausia haloacetaldehido aldehidogrupė reaguoja su egzociklinėmis aminogrupėmis, o po to halometilgrupė reaguoja su endocikliniais azoto atomais. Reakcija vyksta per ilgai gyvuojančią tarpinę stadiją (ε^{hid}C ir ε^{hid}A), susidarant N₃,N⁴-etenocitozinui (εC) ir N₁,N⁶-etenoadeninui (εA).

Caa modifikuotos bazės DNR grandinėje yra identifikuojamos keliais metodais. Eteno bazės negali sudaryti normalių Watson-Crick bazių porų, todėl modifikuota vieta yra taikiny viengrandę DNR kerpančioms nukleazėms, pvz. S1. Kitas metodas, kurį ir išbandėme savo darbe, remiasi DNR sekoskaita Maxam-Gilbert metodu: pakaitinus 90°C 30 min su 1M piperidino, DNR yra fragmentuojama ties Caa modifikuotomis bazėmis (McLean ir kt., 1987; Kohwi-Shigematsu ir Kohwi, 1992).

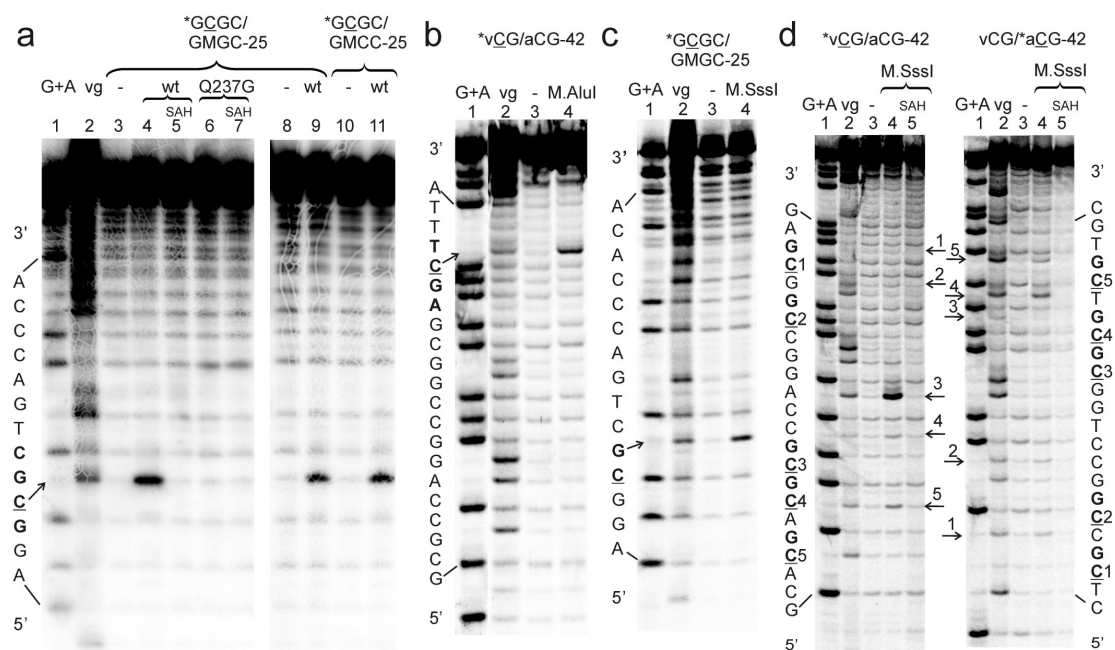
3.1.1 Išsukto citozino identifikavimas 2-chloroacetaldehidu metiltransferazių-DNR kompleksuose

M.HhaI buvo inkubuota su 25 bp dvigrandžiu oligonukleotidu, turinčiu vieną hemimetilintą M.HhaI taikinį, M.HhaI-DNR kompleksas veiktas Caa (2.2.2), o po to DNR – piperidinu (2.2.1.5). Išfracionavus Caa modifikuotą DNR denatūruojančiame PAA gelyje (2.2.4), buvo stebėta fragmentacija ties M.HhaI išsukamu citozinu; fragmentacijos intensyvumas buvo žymiai didesnis nei viengrandės DNR kontrolės, veiktos Caa (pav. 3.2a). Teigiami rezultatai

buvo gauti gana dideliame Caa koncentracijos intervale (10-200 mM Caa), reakcijos inkubuojant kambario ar 37°C temperatūroje.

Su M.HhaI Q237G mutantiniu baltymu, kuris pasižymi sutrikusiu bazės išsukimu, bet yra nepraradęs DNR surišimo funkcijos (Daujotytė ir kt., 2004), kaip ir tikėtasi, nebuvo gauta taikinio citozino modifikacija Caa (pav. 3.2a). Elektroforetinio judrumo poslinkio PAA geliuose metodu (2.2.3) buvo įsitikinta, kad Q237G, panašiai kaip ir wt, po Caa modifikacijos buvo surišęs didžiąją dalį DNR (neparodyta).

M.HhaI išsukamo citozino reaktyvumas reakcijose su Caa buvo išbandytas ne tik natūraliame substrate, bet ir esant klaidingai suporuotoms bazėms taikinyje (C/C, C/A, C/T). Caa yra naudojamas viengrandžiams arba nesuporuotiems citozinams aptikti, taigi, klaidingai suporuotas citozinas gali būti modifikuojamas Caa ir be MTazės. Tačiau mūsų sąlygomis (200 mM Caa, 45 min 20°C temperatūroje) kontroliniame mėginyje be MTazės citozinas nebuvo modifikuojamas (pav. 3.2a, 10 takelis). Esant M.HhaI, kuri geriau rišasi su DNR substratais, taikinio vietoje turinčiais klaidingai suporuotus citozinas (Klimašauskas ir Roberts, 1995), tikslinis citozinas buvo intensyviai modifikuojamas Caa (pav. 3.2a, 11 takelis).



Paveikslas 3.2. MTazių-DNR kompleksų modifikacija chloroacetaldehidu. DNR, kurios viena grandinė buvo žymėta ³³P, po Caa modifikacijos reakcijos analizuota 15% denatūruojančiame PAA gelyje. G+A – purinų takelis; 2-11 takeliai veikti Caa; vg –

viengrandė DNR. MTazių atpažinimo sekos paryškintos, išsukamas citozinas pabrauktas. „**“ nurodo 5' gale pažymėtą DNR grandinę. **a** M.HhaI wt ir Q237G kompleksų su hemimetilinta (*GCGC/GMGC-25) ir taikinio vietoje turinčios C/C bazių porą (*GCGC/GMCC-25) DNR modifikacija Caa; takeliuose 2-11 reakcijos vykdytos 45 min k.t. (2 takelis – 37°C), esant 200 mM Caa, 300 nM baltymo, 280 nM DNR (*GCGC/GMGC-25) (3-7 takeliai) arba 30 nM baltymo ir 10 nM DNR (*GCGC/GMCC-25) (8-11 takeliai) ir 0.1 mM SAH (5 ir 7 takeliai). **b** M.AluI komplekso su DNR, turinčios vieną nemetilintą taikinį, modifikacija Caa. Takeliuose 2-4 reakcijos vykdytos 50 min 37°C temperatūroje, esant 10 a.v./µl M.AluI, 105 nM DNR (*vCG/aCG-42) ir 50 mM Caa. **c** M.SssI-DNR komplekso modifikacija Caa (1 hemimetilintas taikiny). Takeliuose 2-4 reakcijos vykdytos 55 min 20°C temperatūroje (2 takelis – 37°C), esant 100 mM Caa, 0.4 a.v./µl M.SssI ir 20 nM DNR (*GCGC/GMGC-25). **(d)** M.SssI-DNR komplekso modifikacija Caa (5 nemetilinti taikiniai). Takeliuose 2-5 reakcijos vykdytos 65 min 20°C temperatūroje (2 takelis – 37°C), esant 100 mM Caa, 0.8 a.v./µl M.SssI (~400 nM), 20 nM DNR (*vCG/aCG-42 (kairėje) arba vCG/a*CG-42 (dešinėje)) ir 0.1 mM SAH (5 takelis).

Įdomu, kad Caa nemodifikavo taikinio citozino trinariuose M.HhaI-DNR-SAH kompleksuose, nors šie trinariai kompleksai yra stabilesni nei dvinariniai M.HhaI-DNR kompleksai (pav. 3.2; skyrius 3.2)

Parodžius, kad Caa chemija puikiai veikia su M.HhaI, buvo tirtos dar septynios 5mC MTazės: M.SssI, M.AluI, M.HaeIII, M.HpaII, M.MspI, M.DMT1ΔN, M.Eco31IC, ir dvi 4mC MTazės: M.MvaI ir M.BfiC2. Išbandžius daug Caa cheminės reakcijos sąlygų ir optimizavus baltymo-DNR susirišimą reakcijos metu, kuris buvo stebėtas elektroforetinio judrumo poslinkio PAA gelyje metodu, teigiami rezultatai buvo gauti su M.SssI ir M.AluI (pav. 2b,c,d; lentelė 3.1). Neigiamus M.HpaII ir 4mC MTazių rezultatus galima paaiškinti silpna baltymo-DNR sąveika, tačiau M.HaeIII-DNR ir M.MspI-DNR kompleksai buvo stabilūs Caa modifikavimo reakcijos metu. Visų MTazių preparatai neturėjo endogeninio SAM priemaišų, taigi, reakcijos metu susidaręs SAH neturėtų įtakoti rezultato.

Lentelė 3.1. MTazių-DNR kompleksų modifikacijos chloracetaldehidu sąlygos.

MTazė	Atpažinimo seka (išsukama bazė pabraukta)	Baltymo-DNR susirišimas (stebėtas PAA gelyje natyviomis sąlygomis)	Caa konc., M	T, °C	Laikas, min
M.HhaI	G <u>C</u> G <u>C</u>	be Caa pilnas surišimas, su Caa riša >1/2	0.01-0.2	20, 37	15-105
M.AluI	A <u>G</u> <u>C</u> T	be Caa suriša >1/2 DNR, su Caa riša silpnai	0.05-0.2	20, 37	40-60
M.SssI	<u>C</u> G	su ir be Caa pilnas surišimas	0.1-0.3	20	60

Atlikus Caa modifikacijos eksperimentą su DNR substratu, turinčiu penkis M.SssI taikinius, paaiškėjo, kad vieni taikiniai yra labiau modifikuojami nei kiti (pav. 3.2d). Taip pat, įvedus ³³P žymę į viršutinės arba apatinės DNR grandinės 5' galą, stebėjome, kurioje grandinėje taikinio citozinas yra intensyviau modifikuojamas. Pav. 3.2d matyti, kad trečias taikinytis yra modifikuojamas tik vienoje *vCG-42 grandinėje, tačiau visai šalia esantis ketvirtas taikinytis yra modifikuojamas žymiai mažesniu intensyvumu ir abiejose DNR grandinėse, kaip ir penktas bei antras taikiniai. Pirmas taikinytis taip pat modifikuojamas tik vienoje *aCG-42 grandinėje. Toks skirtingas taikinių modifikacijos profilis gali būti apspręstas lokaliais DNR konformacijos ypatumais, dėl kurių gali priklausyti MTazės taikinio pasirinkimas ir Caa reaktyvumas.

3.1.2 Išsukto citozino identifikavimas 2-chloroacetaldehidu restrikcijos endonukleazių-DNR kompleksuose

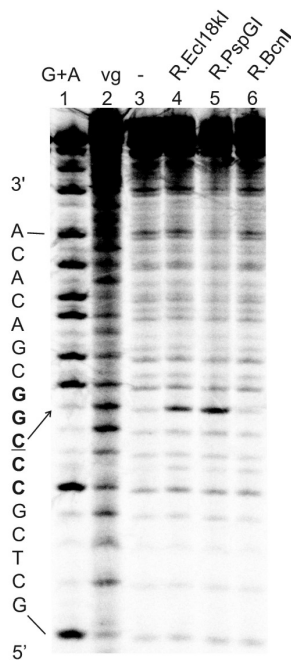
Nusprendėme Caa cheminės modifikacijos metodą išbandyti su kitais DNR išsukimo mechanizmą naudojančiais fermentais – R.Ecl18kI ir R.PspGI. Šie giminingi restrikcijos fermentai atpažįsta pertrauktas pseudopalindromines sekas: R.Ecl18kI – CCNNGG (kur N – bet koks nukleotidas), o R.PspGI – CCWGG (W – A arba T) ir jas hidrolizuoja prieš taikinį. Šie fermentai taikinio centrinę bazių porą visiškai išsuka iš DNR spiralės ir suriša ją specialioje baltymo kišenėje (Bochtler ir kt., 2006; Szczepanowski ir kt., 2008; Tamulaitis ir kt., 2007). Tokiu būdu R.Ecl18kI ir R.PspGI 5 bp atpažinimo seką CCNNGG/CCWGG paverčia į 4 bp seką CCGG.

Kontroliniams eksperimentams pasirinkome restrikcijos endonukleazę R.BcnI, kuri atpažįsta CCSGG seką (S – C arba G) ir hidrolizuoja DNR taikinyje po antrojo citozino. R.BcnI-DNR komplekse DNR mažai skiriasi nuo kanoninės B-formos (Sokolowska ir kt., 2007).

Visi Caa modifikacijos eksperimentai atlikti, naudojant visiškai komplementarų oligonukleotidą su atpažinimo seka CCCGG, taigi R.PspGI atveju buvo naudotas ne laukinio tipo taikinytis. Tačiau yra parodyta, kad

R.PspGI gerai sąveikauja su tokiu taikiniu, nors jo ir nehidrolizuoja (Tamulaitis ir kt. 2008). Mūsų eksperimento sąlygomis (0.1 μ M DNR ir 1 μ M baltymo) R.PspGI buvo surišęs beveik visą DNR (neparodyta).

Teigiami Caa modifikacijos rezultatai R.Ecl18kI ir R.PspGI atveju buvo gauti žymiai griežtesnėmis sąlygomis, lyginant su MTazėmis. Buvo naudota aukštesnė temperatūra (37° vietoje k.t.) ir kelis kartus didesne Caa koncentracija (0.2-1.2 M vietoje 0.05-0.2 M), tačiau šiomis sąlygomis REazė vis dar sąveikavo su DNR (neparodyta). Kaip ir tikėtasi, neigiamos kontrolės R.BcnI atveju zona ties išsukamu citozinu nesiskyrė nuo dvigrandės DNR be baltymo (pav. 3.3). Taigi, parinkus sąlygas ir tinkamas kontroles, Caa gali būti naudojamas ir restrikcijos endonukleazių vykdomam bazės išsukimui tirti.

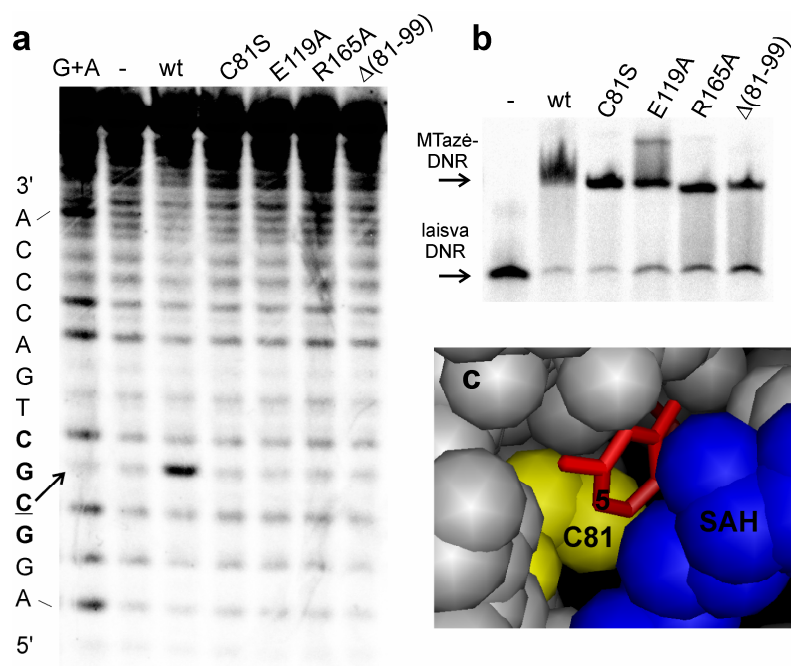


Paveikslas 3.3. Restrikcijos endonukleazių-DNR kompleksų modifikacija 2-chloroacetaldehidu. Po modifikacijos Caa, DNR, vienoje iš grandinių žymėta ^{33}P , analizuota 15% denatūruojančiame PAA gelyje. G+A – purinų takelis; vg – viengrandė DNR; REazių atpažįstama seka paryškinta, išsukamas citozinas pabrauktas. Su 0.4 M Caa inkubuota 40 min 37°C temperatūroje, esant 1 μ M REazių dimero ir 0.1 μ M DNR *CCCGG/GGGCC-31 (viengrandės DNR atveju (2 takelis) reakcija vykdyta 10 min 37°C temperatūroje, esant 0.2 M Caa).

3.2 Netipinės DNR citozino-5 metiltransferazių reakcijos

Su kai kuriais M.HhaI katalitinio centro mutantais – C81S, E119A, R165A bei mutantiniu baltymu su pašalinta katalitine kilpa $\Delta(81-99)$ – nebuvo gauta taikinio citozino modifikacija Caa, nors mutantiniai baltymai sąveikavo su DNR, esant Caa, panašiai kaip ir laukinio tipo baltymas (pav. 3.4a-b). Šiuose baltymuose tikslinė ar. buvo pakeista į mažesnę arba tokio pačio dydžio, bet panaikinant wt ar. funkcinę grupę. Mutantinių baltymų vykdomas

bazės išsukimas buvo tirtas 2-aminopurino (2AP) fluorescenciniu metodu, kuomet taikinio vietoje esančio 2AP fluorescencija žymiai išauga, išsukus jį iš dvigrandės DNR spiralės. Šiuo metodu buvo parodyta, kad mutantiniai baltymai išsuka taikinyje esantį 2AP, tačiau aktyvumo tyrimai parodė, kad baltymai katalitiškai yra neaktyvūs arba silpnai aktyvūs (Mi ir Roberts, 1993; Daujotytė ir kt., 2004; Shieh ir kt., 2006; Shieh ir Reich, 2007). M.HhaI išsuktas taikinio citozinas baltymo aktyviame centre yra apsuptas konservatyvių ir katalizei būtinų ar.: Glu119 sudaro vandenilines jungtis su citozino N3 ir N⁴ atomais, Arg165 ir Arg163 elektrostatiškai sąveikauja su citozino O2 atomu, o katalitinis Cys81 sudaro kovalentinę jungtį su citozino C6 atomu (žr. 1.2.3 skyrių, pav. 1.9) (Klimašauskas ir kt., 1994). Tokio citozino-5 padėtis yra aktyvinta, taigi, būtent su šiuo atomu galėtų reaguoti Caa. Nesuporuoto ir ne MTazės aktyviame centre esančio citozino atveju aldehidinė grupė prisijungia prie egzociklinio N⁴ atomo, o chlormetilgrupė reaguoja su endocikliniu N3 atomu (Kusmierė ir Singer, 1982).



Paveikslas 3.4. M.HhaI laukinio tipo ir katalitinio centro mutantų kompleksų su DNR modifikacija chloroacetaldehidu. a Po modifikacijos vienoje grandinėje ³³P pažymėta DNR analizuota 15% denatūruojančiame PAA gelyje. G+A – purinų takelis. 2-7 takeliai 45 min veikti 200 mM Caa k.t., esant 500 nM M.HhaI (wt arba nurodyto mutanto) ir 370 nM DNR (*GCGC/GMGC-25 – vienas hemimetilintas taikiny). M.HhaI atpažinimo seka paryškinta, išsukamas citozinas pabrauktas. **b** DNR-baltymo komplekso stabilumas tirtas elektroforetinio

judrumo poslinkio PAA gelyje metodu po 10 min inkubacijos su 200 mM Caa k.t. e M.HhaI aktyviame centre esantis SAH (mėlynas) blokuoja reagentų priėjimą prie citozino (raudonas) (PDB struktūros kodas 1mht).

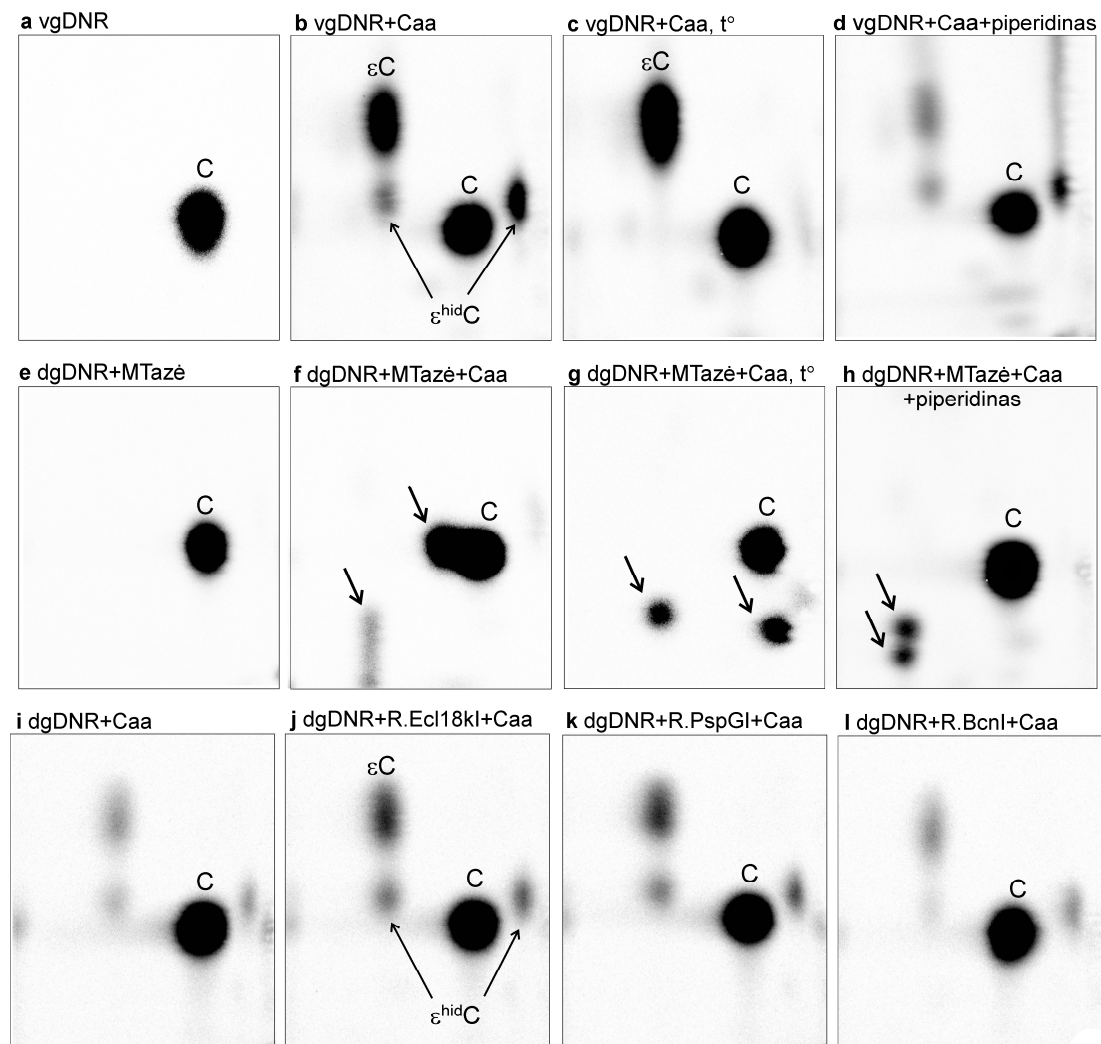
Tokia hipotezė galėtų paaiškinti, kodėl reakcija nevyksta, esant SAH: MTazei surišus kofaktorių, citozino-5 atomas tampa neprieinamas išoriniams reagentams (pav. 3.4c). Hipotezei patikrinti, reakcijos produktus, susidariusius MTazių-DNR kompleksuose ir viengrandėje DNR, ištyrėme plonasluoksnės chromatografijos (TLC) metodu bei kombinuotu aukšto slėgio skysčių chromatografijos masių spektrometrijos (HPLC-MS) metodu (3.2.3).

3.2.1 2-chloroacetaldehido ir citozino reakcijos produktų analizė plonasluoksnės chromatografijos metodu

Kontrolinės viengrandės DNR CCN-19 5' gale esantis citozinas buvo pažymėtas ^{33}P fosforilinant, tuo tarpu DNR substratai MTazėms ir REazėms buvo paruošti, naudojant skirtingo ilgio oligonukleotidų dupleksus, kurių vienas (trumpesnis) buvo prailgintas DNR polimerazės Klenow pagalba, vietoje taikinio citozino įjungiant $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{-dCMP}$, o vietoje kitų nukleotidų – nežymėtus dNTP (2.2.1.3). DNR substratų seka pasirinkta taip, kad žymė būtų įvedama tik taikinio citozinoose (2.1.5). Po Caa reakcijos DNR hidrolizuota iki 5'-dNMP ir analizuota dvikryptės plonasluoksnės chromatografijos metodu (2D-TLC), kur stebimi pažymėti nukleotidai. Kontrolinėje viengrandėje DNR po Caa reakcijos šalia pagrindinės citozino dėmelės buvo stebėtos papildomos trys mažesnio intensyvumo dėmelės, iš kurių viena (aukščiausiai užkilusi) piperidino poveikyje žymiai sumažėjo, o dvi iš jų ilgai šildant beveik išnyko ir perėjo į aukščiausią dėmelę (pav. 3.5a-d). Ilgai šildant stabili hidratuota etenocitozino forma ($\epsilon^{\text{hid}}\text{C}$) dehidratuojasi (Kryzosiak ir kt., 1981) ir pereina į ϵC , taigi, galima teigti, jog aukščiausiai užkilusi dėmelė yra 5'- $\text{d}\epsilon\text{CMP}$. Mūsų eksperimente stebime dvi 5'- $\text{d}\epsilon^{\text{hid}}\text{CMP}$ dėmeles todėl, kad po pirmos krypties TLC plokštelė yra džiovinama per naktį, taigi, dalis 5'- $\text{d}\epsilon^{\text{hid}}\text{CMP}$ dehidratavosi ir antra kryptimi judėjo kaip 5'- $\text{d}\epsilon\text{CMP}$. Caa reakciją atlikus su nežymėtu 5'- dCMP ir didelį jo kiekį (≥ 20 nmol) užnešus ant TLC plokštelės kartu su žymėta viengrande DNR po Caa modifikacijos ir DNR hidrolizės, UV šviesoje

matėsi analogiškos dėmelės, kurios visiškai sutapo su radioaktyviomis dėmelėmis (neparodyta).

REazė-DNR kompleksus paveikus Caa, buvo stebėtos analogiškos dėmelės kaip ir viengrandės DNR atveju (pav. 3.5i-l). R.Ecl18kI-DNR ir R.PspGI-DNR kompleksuose po Caa modifikacijos 5'-dεCMP ir 5'-dε^{hid}CMP dėmelių intensyvumas padidėjo apie 3 kartus lyginant su kontrolinėmis dvigrandės DNR be baltymo bei R.BcnI-DNR reakcijų analogiškomis dėmelėmis.



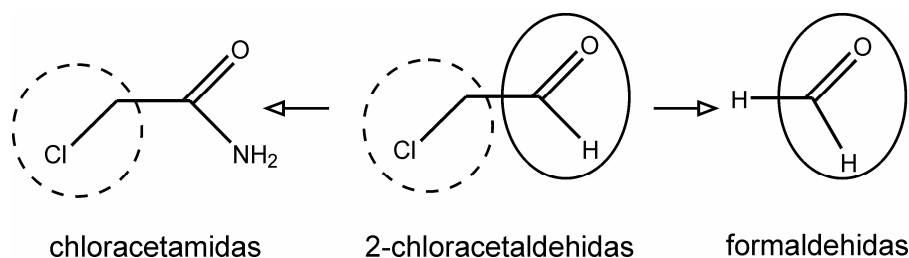
Paveikslas 3.5. 2-chloroacetaldehidu modifikuotų ³³P žymėtų citozinų analizė dvikryptės plonasluoksnės chromatografijos metodu. Viengrandės DNR (vgDNR; a-d), M.SssI-DNR komplekso (e-h) ir REazių-DNR kompleksų (i-l) modifikacija Caa. Reakcijos, kuriose buvo 20 nM *CCN-19 DNR (a-d), 20 nM CC*CGG/CCGGG-31 DNR ir 0.4 a.v./μl M.SssI (e-h) arba 100 nM CC*CGG/GGGCC-31 DNR ir 1 μM REazės dimero, inkubuotos su 400 mM Caa 1 val 37°C temperatūroje (b-d, i-l) arba su 100 mM Caa 50 min 20°C temperatūroje (f-h). Kontroliniai mėginiai a ir e buvo inkubuojami be Caa. Mėginiai c ir g buvo papildomai inkubuoti 2 val 85°C temperatūroje, o d ir h – veikti piperidinu. Po reakcijos modifikuota DNR buvo fermentiškai hidrolizuota iki 5'dNMP ir analizuota 2D-TLC. εC ir ε^{hid}C dėmelės

buvo priskirtos pagal literatūros duomenis (Krzyzosiak ir kt., 1981).

MTazių-DNR kompleksus paveikus Caa, 2D-TLC buvo stebėtas kitoks dėmelių pasiskirstymas, lyginant su kontroline viengrande DNR arba dvigrande DNR be baltymo (pav. 3.5e-h). Eksperimentai buvo atlikti su M.HhaI, M.AluI ir M.SssI fermentais ir visais atvejais buvo gautos vienodos dėmelės, kurių judrumai žymiai skyrėsi nuo kontrolinės viengrandės DNR po Caa reakcijos gautų citozino darinių. Tolimesniame etape susidariusius produktus identifikavome HPLC-MS metodu (skyrius 3.2.3). Taigi, 2D-TLC eksperimento rezultatai rodo, kad Caa su MTazių išsuktu citozinu reaguoja kitaip nei su viengrandžiais citozinais. Tuo tarpu DNR-REazių kompleksuose fermento išsuktas citozinas Caa modifikuojamas tradiciškai, susidarant ϵC ir $\epsilon^{\text{hid}}\text{C}$ formai.

3.2.2 Metiltransferazių katalizuojama aldehidų reakcija su taikinio citozinais, susidarant 5-(1-hidroksialkil)citozinams

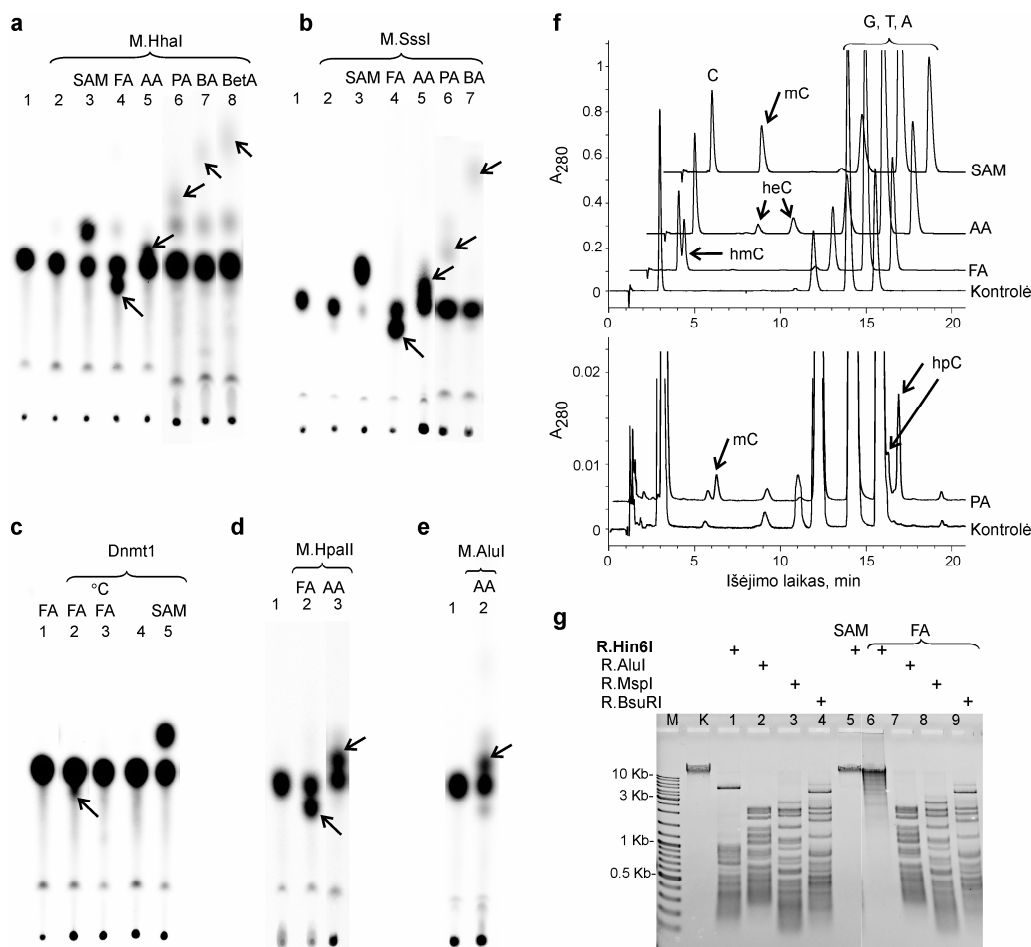
Caa yra bifunkcinis reagentas, turintis du elektrofilinius centrus: aldehido ir chlormetilo. Norėdami išsiaiškinti, kuri grupė reaguoja su MTazių išsuktais citozinais, išbandėme du monofunkcinius reagentus: formaldehidą (FA) ir chloracetamidą (pav. 3.6). Reakcijose buvo naudoti 31 arba 25 bp DNR substratai, turintys vieną M.HhaI taikinį. Po reakcijos DNR fermentiškai fragmentuota iki 5'-NMP arba iki nukleozidų, kurie buvo analizuojami TLC arba HPLC-MS metodais (2.2.2; 2.2.5; 2.2.6). Su chloracetamidu reakcija nebuvo stebima, tačiau su formaldehidu buvo gauta papildoma dėmelė TLC bei nauja smailė HPLC (pav. 3.7). Nustatčius šios smailės aukštos skiriamosios gebos masę (HRMS), buvo identifikuota molekulinė susidariusio junginio formulė ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_5$), kuri atitinka formaldehido prijungimo prie citozino produkto masę. Tikėtina, jog tai – 5-hidroksimetilcitozinas (hmC), kuris galėtų susidaryti formaldehidui prisijungus prie MTazių aktyvinto citozino-5 atomo.



Paveikslas 3.6. Chloracetamido, 2-chloroacetaldehido ir formaldehido struktūrinės formulės. Chlormetilgrupės apvestos punktyru, o aldehydinės – nepertraukta linija.

Tai, kad formaldehidus yra prijungiamas į citozino-5 padėtį, patvirtina trys faktai: 1) taikinyje esant mC, reakcijos su aldehidais nevyksta; 2) tik katalitiškai aktyvios metiltransferazės geba prijungti aldehidus prie taikinio citozino – būtina citozino-5 atomo aktyvacija; 3) vykdant reakcijas deuteruotame vandenyje, susidariusių produktų masės nesikeičia (pav. 3.8c). MTazės, jei reakcijoje nėra kofaktoriaus, geba apkeisti prie taikinio citozino-5 atomo esantį protoną su terpėje esančiu protonu. Jei reakcijos vyksta deuteruotame vandenyje, citozino masė padidėja vienetu (Wu ir Santi, 1987; Daujotytė ir kt., 2004). Esant pakaitams prie citozino-5 atomo, vandenilio atomo nebėra, todėl šis apkeitimas neįmanomas. Galiausiai hmC tapatumas buvo patvirtintas tiesiogiai chromatografiškai palyginus chemiškai susintetintą (2.2.10.1) ir reakcijose su MTazėmis susidariusį hmC (pav. 3.8a-b, lentelė 3.2).

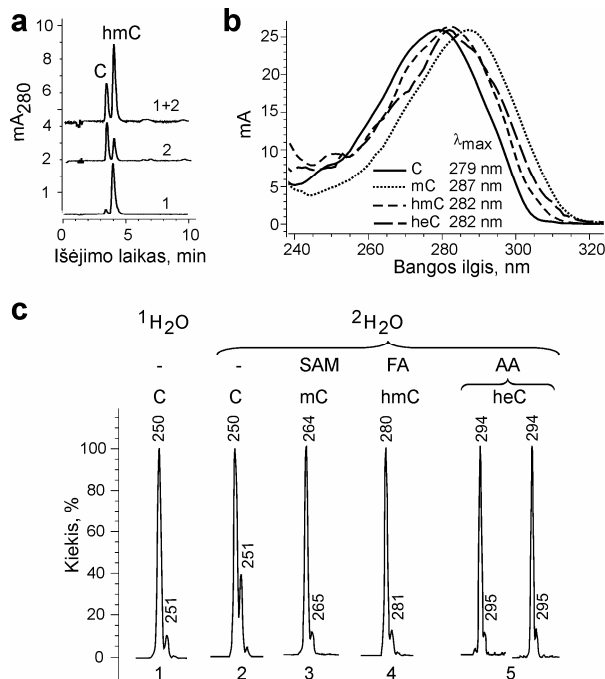
Tolimesniame etape buvo išbandyti keli aldehidai (acetaldehidus, propanalis, glicino betaino aldehidus, benziloksiacetaldehidus) ir kitų elektrofilų klasių atstovai: ketonai (acetonas, hidroksiacetonas, etilacetoacetonas); alkenai (akrilamidas, akrilonitrilas, metilakrilatas, akroleinas) ir sulfonai (metilvinilsulfonas, sulfolenas). Reakcijos produktai tirti TLC ir HPLC-MS metodais, o nauji dariniai identifikuoti pagal citozinui būdingą UV absorbcijos spektrą ir HRMS (pav. 3.8b; lentelė 3.2). Iš visų išbandytų reagentų teigiami rezultatai gauti tik su aldehydinę grupę turinčiais junginiais. Daugiausia produkto – 5-hidroksimetilcitozino (hmC) – susidaro M.HhaI-DNR kompleksus veikiant formaldehidu (FA) – net 60-90% taikinių yra modifikuojama. Pailginus šį reagentą viena -CH₃ grupe (acetaldehidus, AA) arba dviem -CH₃ grupėmis (propanalis, PA) – produkto susidaro mažiau.



Paveikslas 3.7. Citozino-5 metiltransferazės prijungia trumpus alifatinius aldehidus prie taikinio citozino. a-d TLC eksperimentai, kur 20 nM G*CG*C/GCGC-32 oligonukleotido ir 125 nM M.HhaI (a), 20 nM CC*CGG/CCGGG-31 ir 0.8 a.v./μl M.SssI (b), 20 nM G*CG*C/GMGC-32 ir 6.6 μM Dnmt1-ΔN (c; kontrolinis mėginys 3 buvo pakaitintas 75°C 15 min prieš įdedant FA (Dnmt1 inaktyvavimas karščiu)), 40 nM CC*CGG/CCGGG-31 ir 600 nM M.HpaII (d), arba 105 nM AG*CT/AGCT-27 ir 10 a.v./μl M.AluI (e) buvo inkubuota su 200 μM SAM, 13 mM formaldehido (FA), 800 mM acetaldehido (AA), 200 mM propanolio (PA), 100 mM benziloksiacetaldehido (BA) arba 100 mM glicino betaino aldehido (BetA) 1 val k.t. Modifikuota DNR buvo fermentiškai suhidrolizuota iki 5'NMP ir analizuota TLC. f HPLC eksperimente 13 μM GCGC/GCGC-24 DNR ir 13 μM M.HhaI buvo inkubuota su reagentais aukščiau nurodytomis sąlygomis. Su AA ir PA dėl reakcijos metu susidariusio chiralinio centro gautas stereoizomerų mišinys. Su PA matosi nedidelis mC kiekis, kuris atsiranda dėl endogeninio SAM priemaišų baltymo preparate. Po modifikacijos DNR fermentiškai suhidrolizuota iki nukleozidų, kurie analizuoti HPLC. g λ fago DNR inkubuota su M.HhaI, esant SAM arba FA, ir po fragmentacijos su nurodytomis su REazėmis frakcionuota agaroziniame gelyje. M – DNR ilgio markeris (GeneRuler™ DNA Ladder), K – λ fago kontrolė.

Su kitomis MTazėmis (M.SssI, M.HpaII, M.AluI) buvo pastebėta ta pati tendencija – didėjant aldehido molekulei, mažėja modifikuoto produkto išeiga. HPLC taip pat buvo identifikuotas vienas Caa reakcijos produktas, kurio masė, izotopų pasiskirstymas ir UV spektras visiškai atitiko 5-(1-hidroksi-2-

chloretil)citoziną (hcC) (žr. 3.2.3). Su didesniais aldehidais (glicino betaino aldehidu ir benziloksiacetaldehidu) nedidelės modifikacijos išeigos buvo stebėtos TLC metodu, tačiau tikslinės masės nebuvo rastos HPLC-MS metodu. Svarbu paminėti, kad eukariotinė MTazė Dnmt1 taip pat modifikavo savo taikinius, prijungdama FA (pav. 3.7a-f; lentelė 3.2).



Paveikslas 3.8. Citozino-5 metiltransferazės prijungia trumpus alifatinis aldehidus prie taikinio citozino-5 atomo, susidarant 5-(1-hidroksialkil)citozinams. **a** HPLC chromatogramas: 1 – chemiškai susintetinto hmC; 2 – DNR nukleozidų, gautų po GCGC/GCGC-24 oligonukleotido inkubacijos su M.HhaI ir FA; 1+2 – sumaišyti 1 ir 2 mėginiai. **b** Modifikuotų citozinių UV spektrai (pH 3.5). **c** Modifikuotų nukleozidų MS spektrai, gauti po M.HhaI inkubacijos su oligonukleotidu GCGC/GCGC-24 be reagento (2), su SAM (3), FA (4) arba AA (5) 60% deuteruotame vandenyje. Kontrolinis mėginys 1 inkubuotas paprastame vandenyje.

Lentelė 3.2. Citozino-5 metiltransferazių katalizuojamas taikinio citozino modifikavimas aldehidais.

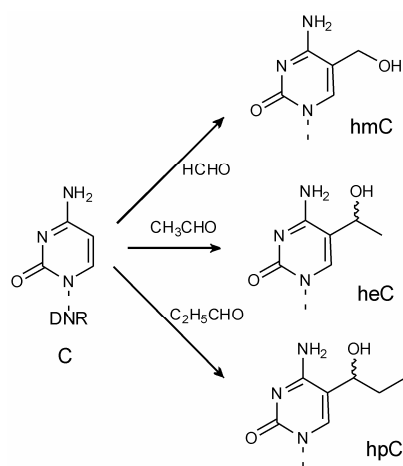
Egzogeninis aldehidas/ susidaręs produktas	MTazių taikinio citozino modifikacijos išeiga TLC (HPLC), %				Modifikuotų nukleozidų HRMS, m/z	
	HhaI	SssI	AluI	HpaII	Molekulinė formulė (M^+)	Pamatuota/ Terorinė
Formaldehidas (FA)/ 5-hidroksimetil-dC (hmC)	60 (90)	65	-	50	$C_{10}H_{16}N_3O_5$	258.1085/ 258.1084
Acetaldehidas (AA)/ 5-(1-hidroksietil)-dC (heC)	40 (60)	60	30	40	$C_{11}H_{18}N_3O_5$	272.1243/ 272.1241
Propanalis (PA)/ 5-(1-hidroksipropil)-dC (hpC)	6 (8)	4	3	0	$C_{12}H_{20}N_3O_5$	286.1398/ 286.1398
Chloroacetaldehidas (Caa)/ 5-(1-hidroksi-2-chloretil)-dC (hcC)	8 (10)	30 (8)	10	0	$C_{11}H_{17}N_3O_5Cl$	306.0852(32)*/ 306.0851(33)
Benziloksiacetaldehidas	2 (0)	5	0	0	$C_{18}H_{24}N_3O_6$	378.166/ nerasta
Glicino betaino aldehidas	2 (0)	-	-	-	$C_{14}H_{25}N_4O_5$	329.1819/ nerasta

,-^c – eksperimentai neatlikti;

,*^c – skliausteliuose nurodyta antros pagal kiekį tikslinės masės intensyvumas (%), palyginus su daugiausia esančia mase.

Siekiant išsiaiškinti, ar hmC yra įvedamas tik M.HhaI taikinio sekose ir DNR nėra modifikuojama nespecifiškai, buvo atliktas eksperimentas su λ fago DNR. Po reakcijos su FA, DNR hidrolizuota skirtingomis restrikcijos endonukleazėmis. Rezultatai rodo, kad tik su R.Hin6I (kuri atpažįsta tą pačią seką kaip ir M.HhaI) gautas beveik pilnas apsaugojimas nuo DNR hidrolizės, tuo tarpu kitos REazės sukarpė savo taikinius, kaip ir kontroliniuose takeliuose. Taigi, M.HhaI prijungia FA specifiskai, savo taikiniuose (pav. 3.7g).

Taigi, citozino-5 metiltransferazės geba prijungti trumpus alifatinis aldehydus savo taikiniuose, susidarant 5-(1-hidroksialkil)citozinams (pav. 3.9).



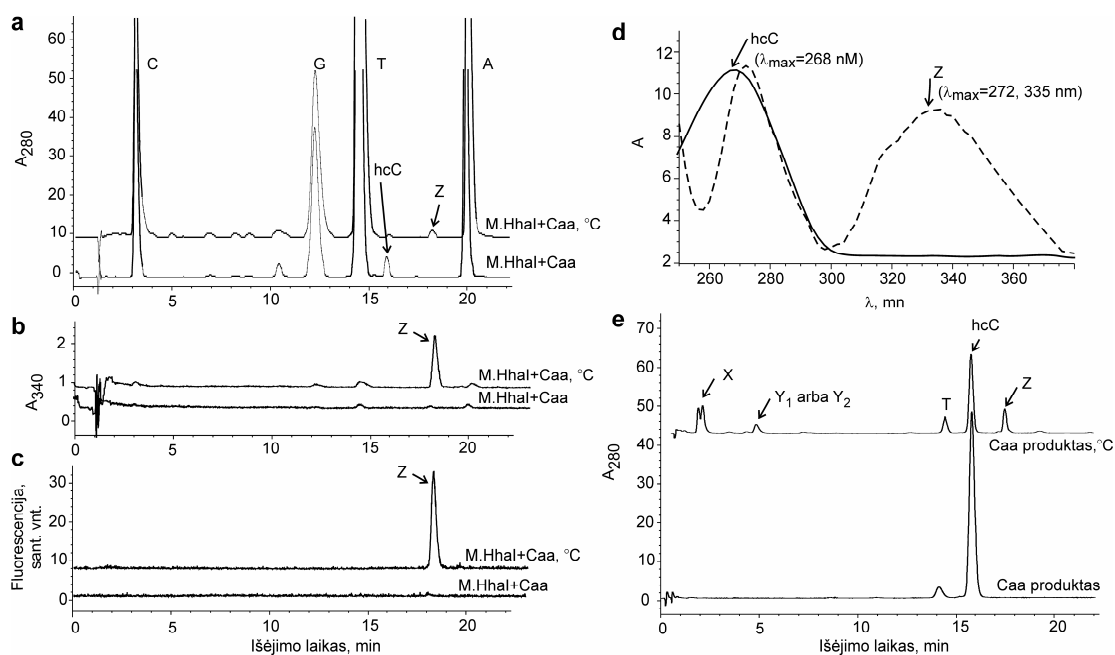
Paveikslas 3.9. Citozino-5 metiltransferazių katalizuojamas trumpų alifatinų aldehydų prijungimas į citozino-5 padėtį. Metiltransferazės prijungia formaldehidą, acetaldehidą arba propanalį, susidarant 5-hidroksimetil-2'-deoksicitozinui (hmC), 5-(1-hidroksietil)-2'-deoksicitozinui (heC) ir 5-(1-hidroksiopropil)-2'-deoksicitozinui (hpC).

3.2.3 2-chloroacetaldehido ir citozino reakcijos produktų tyrimas skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos metodu

TLC metodu nustatėme, kad MTazių-DNR kompleksus veikiant Caa, susidaro du produktai, kurie šildant ir piperidino poveikyje kinta (pav. 3.5e-h). Nusprendėme identifikuoti šiuos produktus HPLC-MS metodu. 24 bp DNR substratas, turintis vieną M.HhaI taikinį, buvo inkubuotas su M.HhaI ir Caa, modifikuota DNR fermentiškai fragmentuota iki nukleozidų, kurie galiausiai analizuoti HPLC-MS metodu. Pagal HRMS ir UV spektrus bei remiantis analogiškėmis reakcijomis su kitais aldehydais (žr. 3.2.2 skyrių), buvo nustatytas pirminis Caa reakcijos produktas – 5-(1-hidroksi-2-chloretil)-2'-deoksicitozinas (hcC). Po pakaitinimo, kaip ir tikėtasi iš 2D-TLC eksperimento rezultatų, hcC smailė išnyko ir buvo identifikuotas kitas produktas. Tikėtina, kad tai – C₅,N⁴-eteno-2'-deoksicitozinas (Z), kurio UV spektras ir

fluorescencijos signalas ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$) bei HRMS duomenys atitiko literatūroje aprašytą junginį (Woo ir kt., 1996) (pav. 3.10a-d, 3.11; lentelė 3.3).

Panašiai kaip ir TLC eksperimentuose, HPLC analizei buvo paruošti mėginiai, kurie po Caa reakcijos dar buvo kaitinami su piperidinu, tačiau papildomų produktų surasti nepavyko. Per analitinę atvirkštinių fazių kolonėlę išgryninus pakankamą hcC kiekį ir pakaitinus, be Z produkto buvo identifikuoti dar du papildomi citozino dariniai: 5-(1,2-dihidroksietil)-2'-deoksicitozinas (X) (pav. 3.10e, 3.11; lentelė 3.3) ir C5,N⁴-(1-hidroksietil)-2'-deoksicitozinas (Y₁) arba 5-(1-oksoetil)-2'-deoksicitozinas (Y₂). Y₁ ir Y₂ citozino darinių elementinė sudėtis ir molekulinė masė yra vienodos, be to, teoriškai galimi, tačiau mažiau tikėtini ir kiti Y dariniai, turintys tokią pačią masę. Turimi UV, HRMS bei MS/MS duomenys nėra pakankami šių darinių struktūrinėms formulėms įrodyti, tačiau paveiksle 3.11 nurodome galimus struktūrinių formulių variantus (X, Z ir Y₁ arba Y₂).



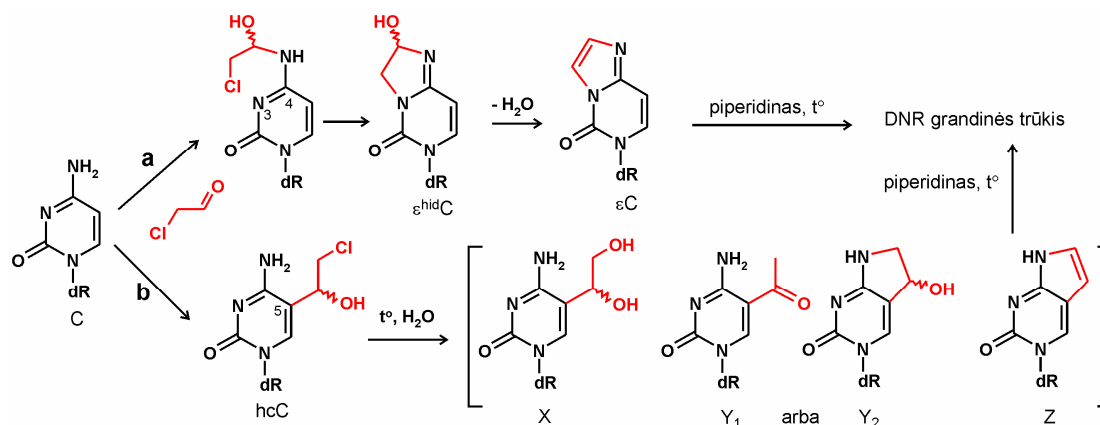
Paveikslas 3.10. M.HhaI-DNR komplekso modifikacija 2-chloroacetaldehidu bei nukleozidų, gautų po DNR fermentinės hidrolizės, analizė aukšto slėgio skysčių chromatografijos metodu. UV chromatogramos, esant 280 nm (a) arba 340 nm (b) bangos ilgiui ir fluorescencinė chromatograma ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$) (c). Reakcijos vykdytos, esant 13 μM GCGC/GCGC-24 DNR, 13 μM M.HhaI ir 200 mM Caa 1 val k.t. Viršutinėse chromatogramose mėginiai papildomai pakaitinti 2 val 85°C. d Citozino darinių UV absorbcijos spektrai (pH 5.5). e 5-(1-hidroksi-2-chloretil)-2'-deoksicitidinas (hcC) buvo

išgrynintas (apatinė chromatograma) ir pašildytas 2 val 85°C (viršutinė chromatograma). Po pakaitinimo pagal HRMS ir UV duomenis identifikuoti 3 papildomi citozino dariniai: X (atsiskiria du stereozomerai), Z ir Y (tikėtinos mažiausiai dvi skirtingos Y struktūrinės formulės, kurių masės vienodos – Y₁ ir Y₂ (pav. 3.11, lentelė 3.3)).

Lentelė 3.3. M.HhaI katalizuojamas taikinio citozino modifikavimas 2-chloroacetaldehidu.

Susidaręs produktas	Gautų reakcijos produktų HRMS, m/z		
	Molekulinė formulė	Terorinė	Pamatuota
5-(1-hidroksi-2-chloretil)-dC (hcC)	C ₁₁ H ₁₇ ClN ₃ O ₅ +H ⁺	306.0851/ 308.0826 (33)	306.0852/ 308.0820 (32)*
X 5-(1,2-dihidroksietil)-dC	C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O ₆ +H ⁺	288.1190	288.1188
Y1 C5,N ⁴ -(1-hidroksietil)-dC arba Y2 5-(1-oksoetil)-dC	C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₅ +H ⁺	270.1084	270.1082
Z C5,N ⁴ -eteno-dC	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₄ +Na ⁺	274.0798	274.0796

,* – skliausteliuose nurodyta antros pagal kiekį tikslinės masės intensyvumas (%), palyginus su daugiausia esančia mase.



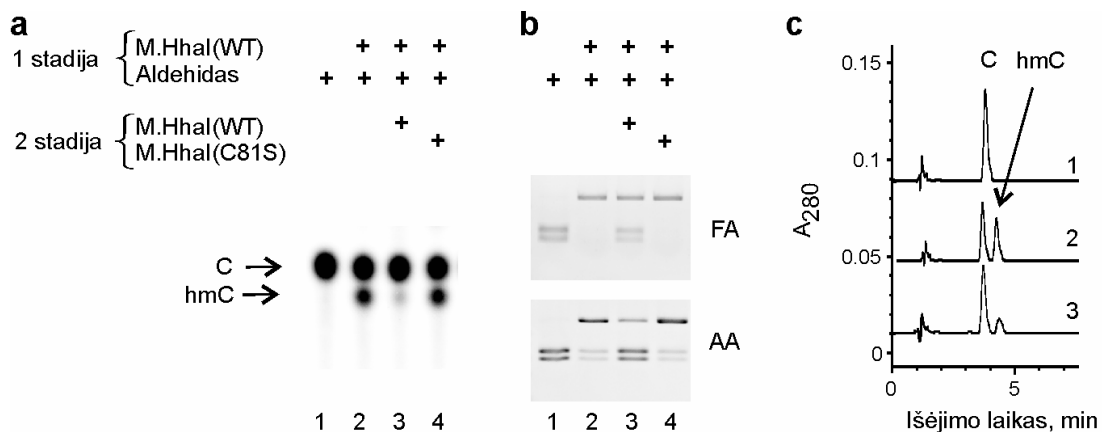
Paveikslas 3.11. 2-chloroacetaldehido reakcijos su viengrandžiais citoziniais. **a** Caa reaguoja su nesuporuotais citoziniais viengrandėje DNR susidarant N⁴,N³-(1-hidroksietil)citozinui (ε^{hid}C), kuris po dehidracijos virsta N³,N⁴-etenocitozinu (εC) (Kusmieriek ir Singer, 1982); veikiant piperidinu, ties εC skyla DNR grandinė. **b** Siūloma MTazių reakcijos schema su Caa: pirmiausia susidaro 5-(1-hidroksi-2-chloretil)-dC (hcC), kuris po pakaitinimo virsta į tris skirtingus produktus: X (5-(1,2-dihidroksietil)-dC), Z (C5,N⁴-eteno-dC) ir Y1 (5-(1-oksoetil)-dC) arba Y2 (C5,N⁴-(1-hidroksietil)-dC). Pateiktos labiausiai tikėtinos citozino darinių struktūrinės formulės. Vienas ar kelį iš jų reaguoja su piperidinu, skylant DNR grandinei.

Tikėtina, kad Z, taip pat kaip ir εC, dėl didelio dvinario aromatinio žiedo turi silpnesnę N-glikozidinę jungtį (taip pat kaip ir purinai, lyginant su pirimidiniais), kuri skyla kaitinant, o piperidino poveikyje ties susidariusiais abaziniais taikiniai atsiranda DNR grandinės trūkiai. Taigi, ties Z ar kitu citozino dariniu, gautu pašildžius hcC, skyla DNR grandinė 30 min kaitinant 90°C su 1 M piperidino (pav. 3.11).

3.2.4 Metiltransferazių katalizuojamas 5-(1-hidroksialkil)citozinių vertimas į nemoifikuotus citozinius

Buvo įdomu, ar MTazės katalizuoja grįžtamą reakciją, t.y. ne tik taikinio citoziną verčia į hmC esant FA, bet ir hmC verčia į citoziną. Po reakcijos su FA, DNR buvo išgryninta ir po to papildomai inkubuota su MTazėmis be aldehydų.

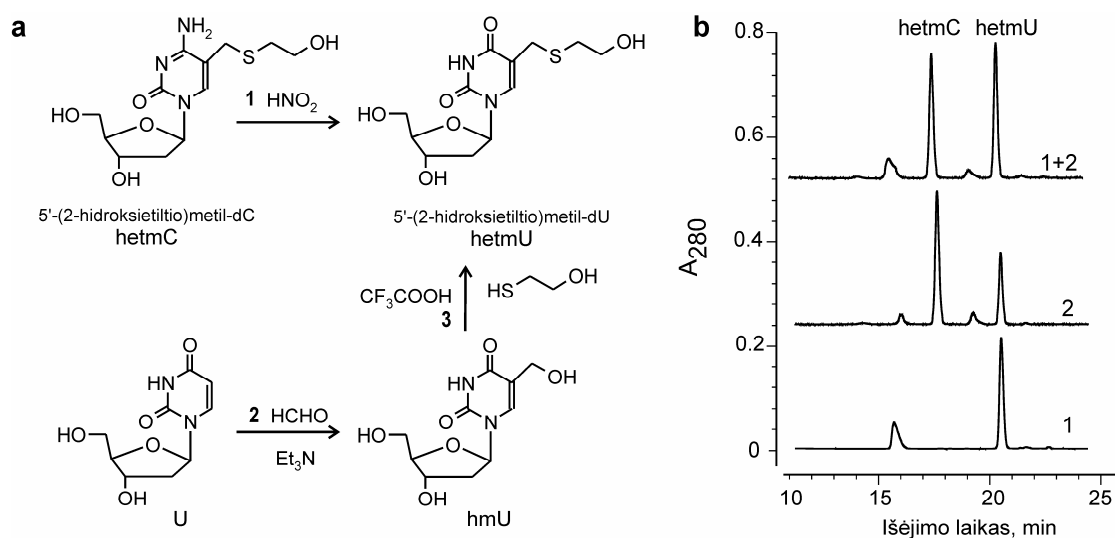
TLC ir HPLC eksperimentai bei sumažėjęs PGR fragmento, turinčio vieną M.HhaI taikinį, apsaugojimas nuo R.Hin6I hidrolizės parodė, kad tiek hmC tiek, heC kiekis po papildomos inkubacijos su M.HhaI mažėja, o citozino – daugėja. Eksperimentai su M.HhaI C81S mutantu parodė, kad šiai reakcijai, kaip ir metilinimui bei aldehydų prijungimui, yra būtinas katalitinis Cys81 (pav. 3.12). Kitos išbandytos MTazės – M.SssI ir M.HpaII – taip pat katalizuoja 5-hidroksialkilintų citozinių vertimą į citozinius (neparodyta).



Paveikslas 3.12. 5-(1-hidroksialkil)citozinių vertimas į citozinius, dalyvaujant citozino-5 metiltransferazei M.HhaI. **a** 20 nM G*CG*C/GCGC-32 oligonukleotido ir 125 nM M.HhaI wt buvo inkubuota su FA 1 val k.t. (1 stadija). Po to DNR išsodinta etanoliumi ir papildomai inkubuota su 750 nM M.HhaI wt arba katalitiniu mutantu C81S (2 stadija) bei analizuota TLC metodu. **b** 100 nM 618 bp PGR fragmentas, turintis vieną M.HhaI taikinį, panašiai kaip ir **a** paveikslo dalyje, pirmiausia inkubuotas su 50 nM M.HhaI ir 13 mM FA (viršutinis gelis) arba 0.8 M AA (apatinis gelis) 1.5 val k.t., bei po DNR išvalymo papildomai inkubuotas su 800 nM M.HhaI wt arba C81S 2 val 37°C. Po to DNR hidrolizuota R.Hin6I ir analizuota agaroziniame gelyje. **c** Analogiškas eksperimentas kaip **a** paveikslo dalyje (chromatogramos 1-3 atitinka **a** dalies takelius 1-3): 13 μM GCGC/GCGC-24 oligonukleotido ir 15 μM.HhaI wt buvo inkubuojama su FA 1 val k.t. (1 stadija). Po to DNR išsodinta etanoliumi ir papildomai inkubuota su 15 μM M.HhaI wt 1 val k.t. (2 stadija) bei analizuota HPLC metodu.

3.2.5 Metiltransferazių katalizuojama 5-hidroksimetilcitozino reakcija su tioliais ir selenoliais

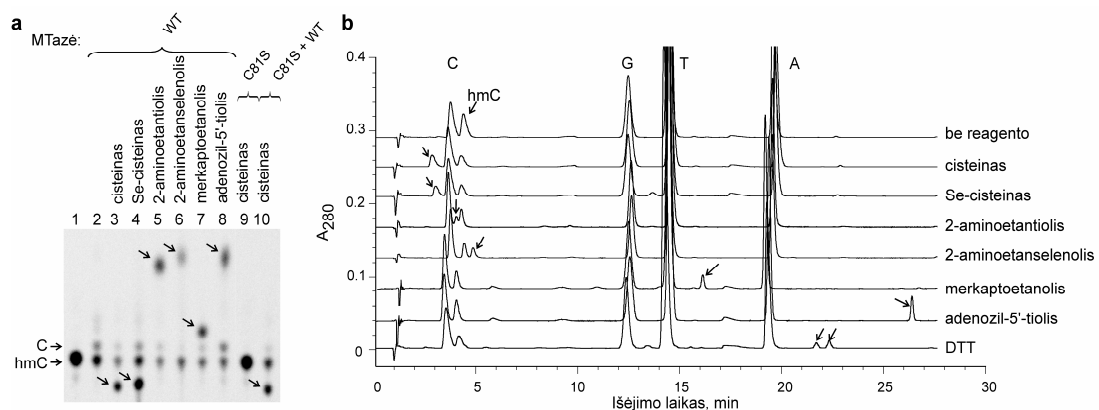
Analizuojant M.HhaI katalizuojamo hmC vertimo į citoziną reakcijų HPLC chromatogramas, buvo identifikuota papildoma smailė, kurios UV spektras buvo panašus į citozino. Pritaikius HRMS analizės metodą, buvo nustatyta šio junginio molekulinė formulė ir įtarta, jog tai – 5-(2-hidroksietil)tiometil-dC (hetmC) – naujas citozino darinys, susidaręs hmC hidroksigrupę pakeitus merkaptoetilhidroksigrupe, kuri ateina iš 2-merkaptoetanolio, o pastarasis reakcijos mišinyje atsiranda iš M.HhaI saugojimo buferio. Po to šis junginys buvo įrodytas, tiesiogiai chromatografiškai palyginus chemiškai susintetintą 5-(2-hidroksietil)tiometil-dU (hetmU) (2.2.10.3) su M.HhaI pagalba gautu hetmC, kuris nitritine rūgštimi buvo deaminintas iki hetmU (2.2.10.4) (pav. 3.13, lentelė 3.4).



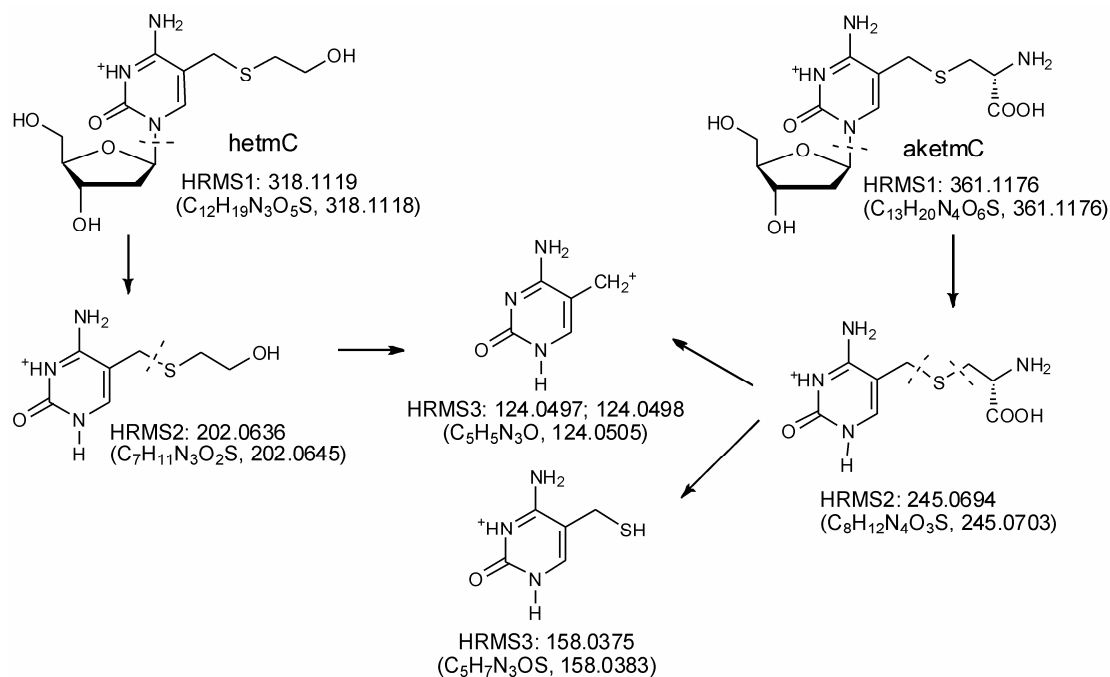
Paveikslas 3.13. Citozino-5 metiltransferazių katalizuojamo tiolių ir selenolių prijungimo prie hmC reakcijos produktų identifikavimas. a Citozino darinio 5-(2-hidroksietil)tiometil-dC (hetmC), MTazių fermentiškai susintetinto iš hmC ir 2-merkaptoetanolio, deaminavimo reakcija su nitritine rūgštimi iki 5-(2-hidroksietil)tiometil-dU (hetmU) (1) bei dviejų stadijų cheminė hetmU standarto sintezė (2, 3). **b** Chemiškai susintetinto standarto hetmU (1), MTazių fermentiškai susintetinto ir išgryninto hetmC dalinis deaminavimas iki hetmU (2) bei 1 ir 2 sumaišytų mėginių (1+2) 280 nm HPLC metodu gautos UV chromatogramos.

Analogiškomis sąlygomis buvo išbandyta keli tioliai ir selenoliai: Cys, Se-Cys, 2-aminoetantiolis, 2-aminoetanselenolis, tioadenozinas ir DTT. Reakcijos produktų ieškota TLC metodu, naudojant 31 bp DNR substratą

G*HGC/GMGC-31, turintį vieną hemimetilintą hemihidroksimetilintą M.HhaI taikini (2.2.1.3; 2.2.5), arba HPLC-MS metodu, naudojant 24 bp DNR substratą GCGC/GCGC-24, turintį vieną nemetilintą taikinį, kuris pirmoje stadijoje buvo hidroksimetilintas, veikiant metiltransferaze ir FA (2.2.2; 2.2.6). Rezultatai parodė, kad M.HhaI geba didelėmis išieigomis prijungti minėtus nukleofilus prie hmC. M.SssI kiek mažiau efektyviai vykdo tiolių ir selenolių prijungimą. Šiai reakcijai, kaip ir prieš tai minėtoms (aldehidų prijungimui prie taikinio citozino ir hidroksimetilgrupės nuėmimui nuo hmC) yra būtinas katalitinis Cys81 (pav. 3.14; lentelė 3.4). Susidariusių citozinių darinių struktūras patvirtina HRMS, UV spektrai bei MS1-MS3 duomenys (lentelė 3.4, pav. 3.15). Su kitų tipų nukleofilais, pvz. hidrazinu, p-nitrofenoliu, fenoliu, metanoliu, natrio sulfidu, natrio azidu, kalio bromidu, natrio jodidu, panašios reakcijos produktų nebuvo rasta (neparodyta).



Paveikslas 3.14. Citozino-5 metiltransferazių atliekamas tiolių ir selenolių prijungimas prie 5-hidroksimetilcitozino. **a** 10 nM DNR oligonukleotido G*HGC/GMGC-31 buvo inkubuota su 200 mM M.HhaI Q82A/Y254S/N304A arba C81S, esant 12 mM cisteino, selenocisteino, 2-aminoetantiolio, 2-aminoetanselenolio, 150 mM 2-merkaptioetanolio arba 0.5 mM adenozil-5'-tolio 1.5 val k.t. Po reakcijos DNR fermentiškai sufragmentuota iki 5'-dNMP ir analizuota TLC metodu. **b** 13 μM GCGC/GCGC-24 dvigrandžio oligonukleotido pirmiausia inkubuota su 13 μM M.HhaI ir 13 mM FA 1 val k.t., o po DNR išsodinimo, DNR papildomai inkubuota su 13 μM M.HhaI, esant 50 mM cisteino, selenocisteino arba DTT, 12 mM 2-aminoetantiolio arba 2-aminoetanselenolio, 500 mM 2-merkaptioetanolio, 0.5 mM adenozil-5'-tolio 1.5 val k.t. Po to DNR fermentiškai sufragmentuota iki nukleozidų ir analizuota HPLC metodu.



Paveikslas 3.15. Reakcijos produktų 5-(2-hidroksietil)tiometil-2'-deoksicitidino (hetmC) ir 5-(2-amino-2-karboetil)tiometil-2'-deoksicitidino (aketmC) tyrimas MS/MS metodu. Teorinės masės ir molekulinės formulės pateiktos skliaustuose.

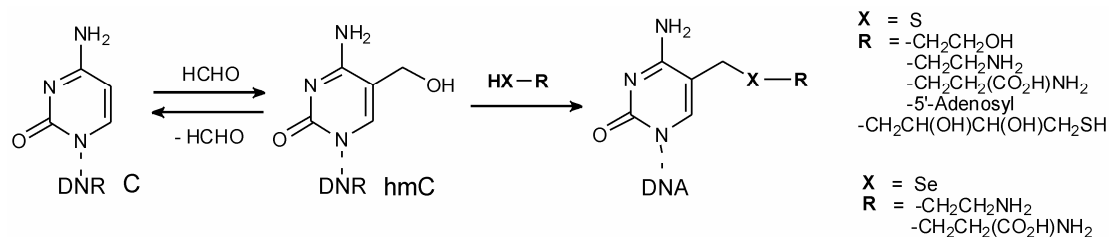
Lentelė 3.4. Citozino-5 metiltransferazių katalizuojamas 5-hidroksimetilcitozino modifikavimas selenoliais ir tioliais.

Egzogenis reagentas/ susidaręs produktas	Modifikacijos išeiga TLC (HPLC), %		HRMS, m/z	
	HhaI	SssI	Molekulinė formulė (M ⁺)	Pamatuota/ Terorinė
2-merkaptoetanolis/ 5-(2-hidroksietil)tiometil-dC (hetmC)	55 (22)	10	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	318.1119/ 318.1118
L-cisteinas (Cys)/ 5-(2-amino-2-karboetil)tiometil-dC (aketmC)	60 (36)	10	C ₁₃ H ₂₀ N ₄ O ₆ S	361.1176/ 361.1176
L-selenocisteinas (Se-Cys)/ 5-(2-amino-2-karboetilseleno)tiometil-dC	60 (27)	-	C ₁₃ H ₂₀ N ₄ O ₆ Se	409.0621/ 409.0622
2-aminoetantiolis/ 5-(2-aminoetil)tiometil-dC	75 (25)	60	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₄ S	317.1277/ 317.1278
2-aminoetanselenolis/ 5-(2-aminoetilseleno)tiometil-dC	75 (41)	14	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₄ Se	365.0725/ 365.0723
adenozil-5'-tiolis/ 5-(5-adenozil)tiometil-dC	50 (24)	-	C ₂₀ H ₂₆ N ₈ O ₇ S	523.1718/ 523.1718
D,L-1,4-ditiotreitolis (DTT)/ 5-(2,3- dihidroksi-4-merkaptobutil)tiometil-dC	n. (30)	-	C ₁₄ H ₂₃ N ₃ O ₆ S ₂	394.1105/ 394.1101

"-" – reakcija nebuvo atlikta;

"n." – nenustatyta, nes TLC su DTT nesimato papildomų dėmelių.

Taigi, citozino-5 MTazės geba prijungti formaldehidą, susidarant 5-hidroksimetilcitozinui taikinyje. MTazės taip pat katalizuoja grįžtamą reakciją: hmC vertimą į citoziną bei gali toliau modifikuoti hmC, prijungdamos tiolius ir selenolius, susidarant 5-chalkogenometilcitozinams (pav. 3.16).



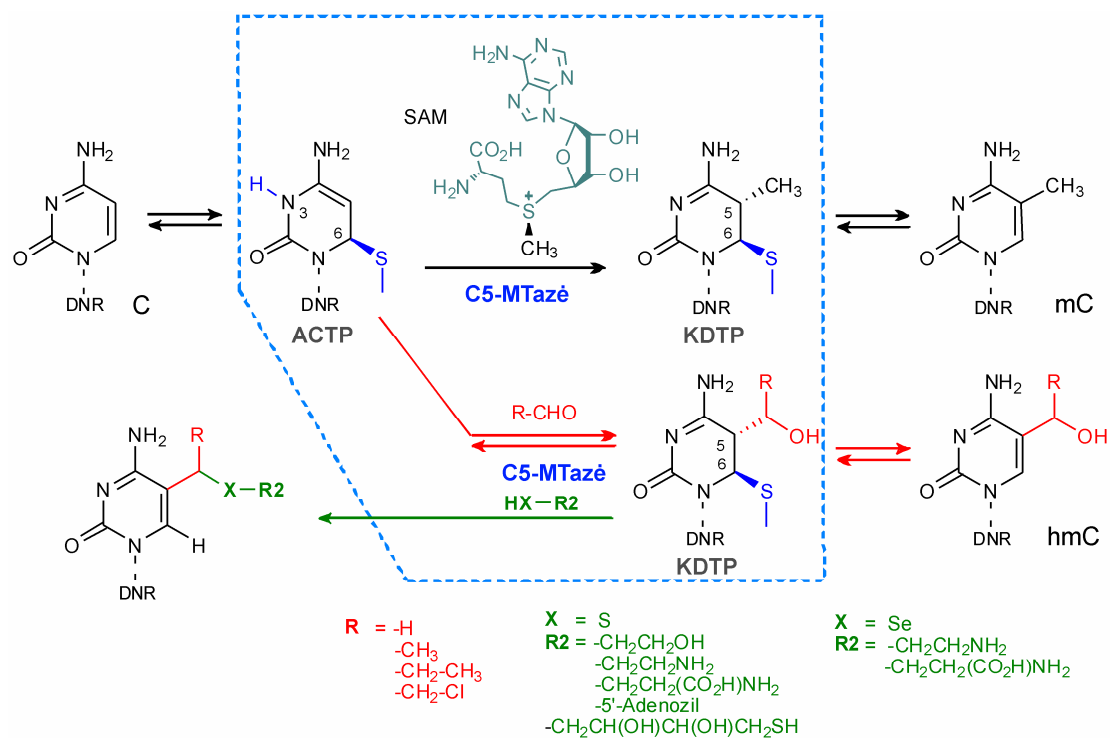
Paveikslas 3.16. Netipinės citozino-5 metiltransferazių reakcijos. Formaldedido prijungimas, susidarant 5-hidroksimetilcitozinui (hmC), pastarojo vertimas į citoziną bei tolimesnė hmC modifikacija tioliais arba selenoliais (HX-R), susidarant 5-chalkogenometilcitozinams.

3.2.6 Netipinių metiltransferazių katalizuojamų reakcijų mechanizmai

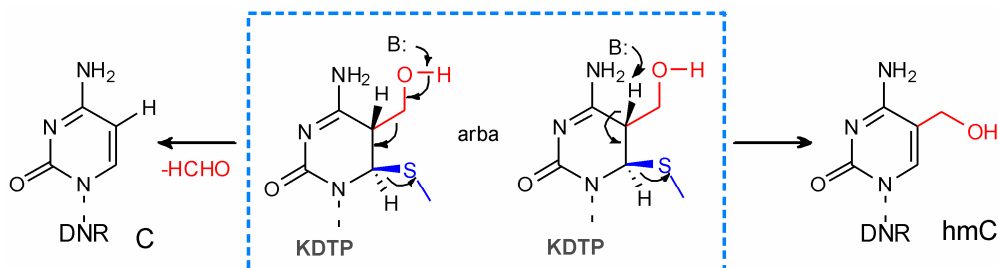
Visoms trimis aukščiau aprašytoms netipinėms metiltransferazių reakcijoms – aldehydų prijungimui, susidarant 5-(1-hidroksialkil)citozinams, pastarųjų konversijai iki citozino bei tolimesnei modifikacijai tioliais ir selenoliais – yra reikalingos katalitiškai aktyvios MTazės. Taigi MTazės šiose reakcijose dalyvauja atpažindamos savo taikinio seką, išsukdamos bei aktyvindamos modifikuojamą citoziną (pav. 3.17).

Metilgrupė nuo kofaktoriaus SAM yra pernešama, vykstant S_N2 tipo nukleofilinio pakeitimo reakcijai. Metiltransferazė aktyvina citozino-5 padėtį dėka katalitinio Cys (M.HhaI atveju – Cys81) sudaromos kovalentinės jungties su citozino C6 atomu. Tokio aktyvinto citozino tarpinio produkto (ACTP) C5 atomas yra nukleofilas ir atakuoja SAM metilgrupės anglies atomą, kuris turi dalinį teigiamą krūvį, susidarant 5,6-dihidrocitozinui (kovalentinis 5,6-dihidrocitozino tarpinis produktas (KDTP) (Wu ir Santi, 1987; Klimašauskas ir kt., 1994). Kai reakcijoje nėra SAM, baltymas taip pat geba sudaryti kovalentinę jungtį su citozino C6 atomu (Wu ir Santi, 1987), taigi, citozino-5 padėtis yra aktyvinta ir egzogeniniai elektrofilai (aldehidai) yra prijungiami, vykstant nukleofiliniam pridėjimui (pav. 3.17). Susidariusiame tarpiniame kovalentiniame 5,6-dihidrocitozino komplekse (KDTP) baltymas-citozinas-aldehidai, skylant baltymo-citozino kovalentinei jungčiai, priklausomai nuo to, ar deprotonuojasi prie C5, ar prie egzociklinės hidroksigrupės esantis

vandenilis, atitinkamai susidaro hidroksialkilintas citozinas arba citozinas. Reakcija yra žymiai pastūmėta į citozino susidarymo pusę, kai nėra egzogeninių aldehydų ir esant aukštesniam terpės pH – bazė padeda deprotonizuotis citozino hidroksigrūpei (pav. 3.18, 3.20b).

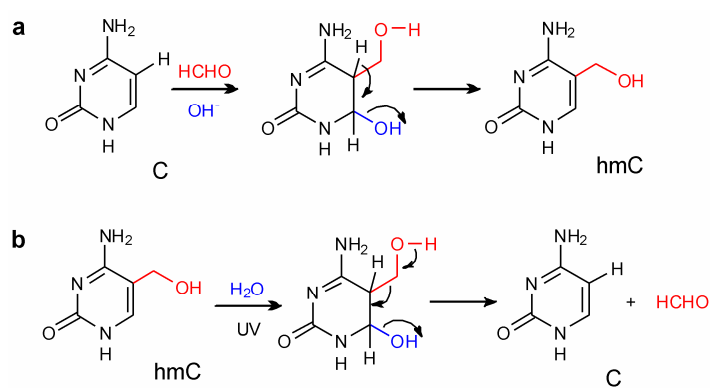


Paveikslas 3.17. Citozino-5 metiltransferazių katalizuojamos reakcijos. MTazės prijungia metilgrupę prie citozino, vykstant S_N2 reakcijai tarp aktyvinto citozino tarpinio produkto (ACTP) ir kofaktoriaus SAM. Reakcija vyksta per kovalentinį 5,6-dihidrocitozino tarpinį produktą (KDTP), galiausiai susidarant mC. ACTP gali dalyvauti grįžtamoje nukleofilinio prijungimo reakcijoje su egzogeniniais aldehydais, susidarant 5-(1-hidroksialkil)citozinams, o pastarieji gali būti toliau modifikuojami, prijungiant tiolius arba selenolius. MTazės ir jų katalitiniai motyvai parodyti mėlynai, reakcijos, vykstančios fermentų aktyviame centre, yra apibrėžtos mėlynu punktyru, aldehydai parodyti raudonai, tioliai/selenoliai – žaliai.



Paveikslas 3.18. Citozino-5 metiltransferazės aktyviame centre esančio kovalentinio 5,6-dihidro-5-hidroksimetilcitozino tarpinio produkto (KDTP) nykimas. KDTP deprotonuojasi C5 ar egzociklinės hidroksigrūpės padėtyje, susidarant atitinkamai 5-(1-hidroksialkil)citozinui (dešinėje) arba citozinui (kairėje). MTazės ir jų katalitiniai motyvai parodyti mėlynai, reakcijos, vykstančios MTazės aktyviame centre, yra apibrėžtos mėlynu punktyru, aldehydai parodyti raudonai.

Formaldehidas taip pat gali būti prijungiamas pirimidinų C5 padėtyje, vykdant cheminę sintezę griežtomis bazinėmis sąlygomis (Cline ir kt., 1959; Alegria, 1967). Šiomis sąlygomis DNR nėra stabilus (65°C, pH>11, 7 paros), todėl reakcijas galima atlikti tik su nukleotidais, nukleozidais arba bazėmis. Su citozinu taip pat stebima efektyvi pašalinė reakcija – deaminimas, susidarant uracilui. hmC sintezės tarpinis produktas, spėjama, galėtų būti aktyvintas citozinas, 6 padėtyje prisijungęs hidroksigrupę. Šis tarpinis produktas yra panašus į MTazės aktyvintą citozino-baltymo kovalentinį tarpinį produktą (ACTP). Toks pat tarpinis produktas yra siūlomas tiesioginėse C susidarymo iš hmC reakcijose, išskiriant formaldehidui, kas buvo stebėta UV šviesos arba šarmų poveikyje (pav. 3.19) (Cline ir kt., 1959; Alegria, 1967; Privat ir Sowers, 1996).

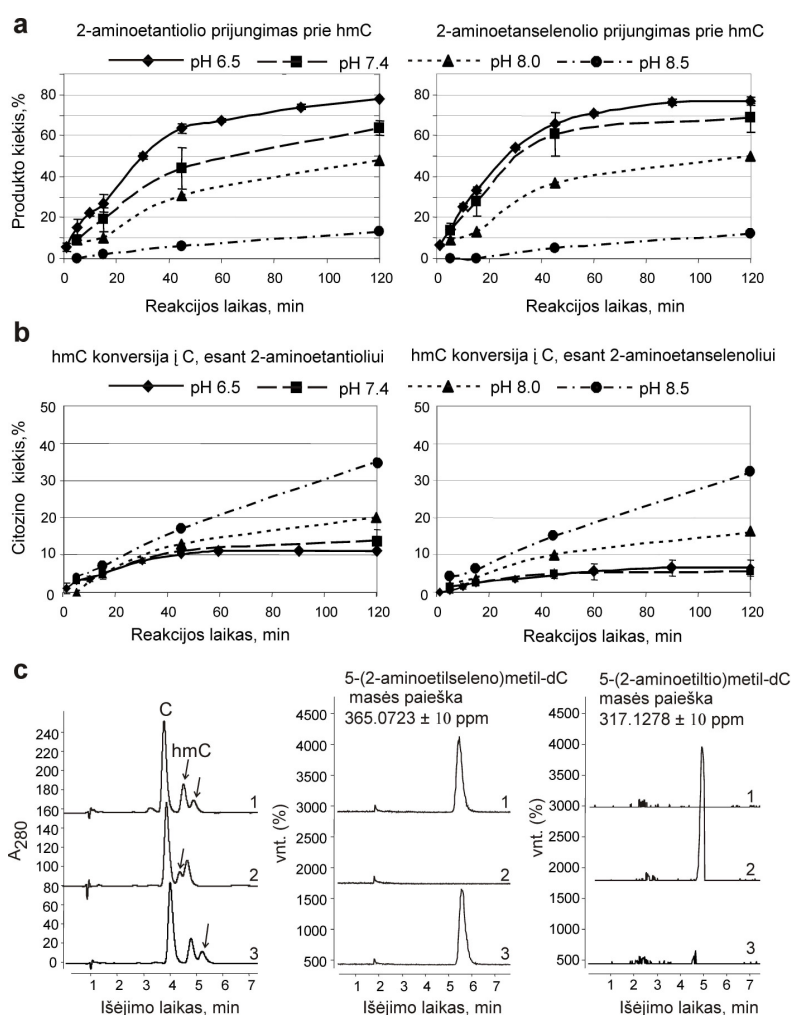


Paveikslas 3.19. Nefermetinė citozino reakcija su formaldehidu bei 5-hidroksimetilcitozino dehidroksimetilinimas. **a** Cheminė hmC sintezė iš citozino ir formaldehido, esant aukštam pH. **b** hmC vertimas į citoziną UV poveikyje. Abiejų reakcijų siūlomas tarpinis produktas yra 6-hidroksi-6,5-dihidrocytozinas (Cline ir kt., 1959; Alegria, 1967; Privat ir Sowers, 1996).

Grįžtamos aldehidų reakcijos su egzociklinėmis aminogrupėmis, susidarant N-hidroksialkilintiems nukleobazių dariniams, yra gerai žinomos ir vyksta, esant žymiai griežtesnėms sąlygoms – 100 ir daugiau kartų didesnėms FA koncentracijoms (Beland ir kt., 1984). Tokios reakcijos apsprendžia formaldehido toksiškumą ląstelėms ir yra naudojamos fiksuojant ląsteles, nes susidaro daugybinės baltymo-DNR ir baltymo-baltymo sąsuvos (Solomon ir Varshavsky, 1985; Wang ir kt., 2007). MTazių katalizuojamos reakcijos vyksta specifinėse MTazių atpažįstamosiose sekose, modifikuojant taikinio citozinas švelniomis sąlygomis, kuriomis nebuvo stebėta nei baltymo-DNR sąsuvų, nei N-hidroksialkilintų nukleobazių (neparodyta).

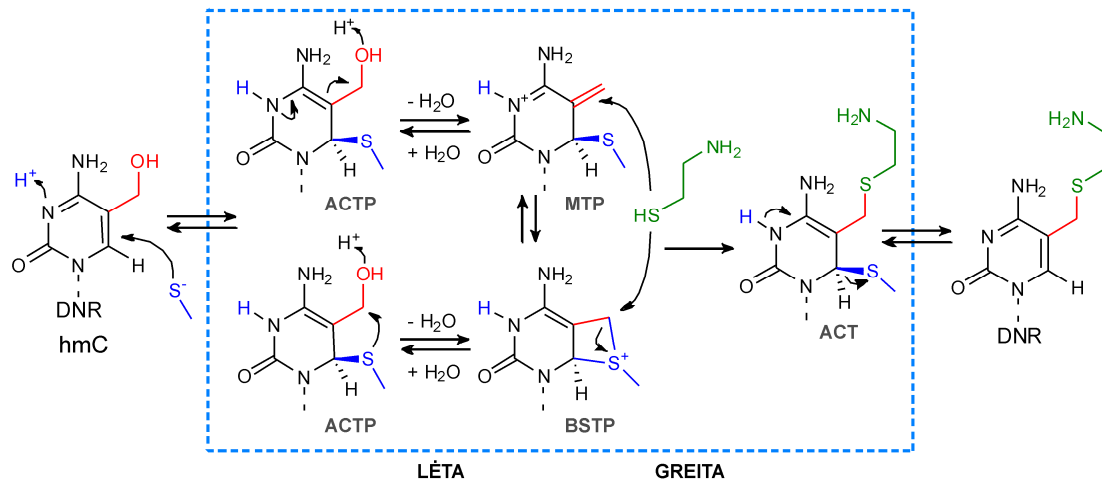
Tikėtinas tiolių ir selenolių prijungimo prie hmC mechanizmas yra S_N2 reakcija, kuomet nukleofilas tiesiogiai atakuoja protonuotą hidroksigrupę. Tokiu atveju rūgštinėje terpėje reakcijos su selenoliais turėtų vykti žymiai geriau, lyginant su tioliais, dėl skirtingų šių junginių pK_a (pvz., Cys pK_a yra 8.3, o Se-Cys – 5.2 (Wessjohann ir kt., 2007)), o reakcijos efektyvumas turėtų stipriai priklausyti nuo reagentų koncentracijos. Tačiau, detaliau ištyrus šias reakcijas, paaiškėjo, kad tiolių ir selenolių prijungimo prie hmC reakcijos greičiai yra labai panašūs ištirtame pH intervale (5.5-8.5), reakcijos efektyviausiai vyksta rūgštiniame pH 5.5-6.5 (tioliai – visiškai protonuoti, o selenoliai – visiškai deprotonuoti), esant tioliui ir selenoliui reakcijos mišinyje, pirmenybė yra teikiama selenoliui (netgi esant 10-kartiniam tiolio pertekliui), o 0.01-10 mM tiolių ar selenolių koncentracijų intervale produkto susidarymo kiekis kito nežymiai (iki 2 kartų) (pav. 3.20). Šiuose eksperimentuose buvo naudotas M.HhaI mutantinis baltymas Q82A/Y254S/N304A, turintis praplėstą kofaktoriaus surišimo centrą (kuriame didelės ar. buvo pakeistos mažesnėmis), nes pradiniuose eksperimentuose pastebėjome, kad šis trigubas mutantas truputį efektyviau prijungia tiolius ir selenolius, bei ne taip efektyviai dehidrosimetilina hmC, lyginant su wt baltymu. Naudojant M.SssI wt baltymą taip pat buvo pastebėta, kad tiolių ir selenolių prijungimas efektyviausiai vyksta rūgštiniame pH (5.5-6.5), o dehidrosimetilinimas – neutraliame ir baziniame pH (7.0-8.5) (neparodyta). Šie pastebėjimai aiškiai parodo, kad reakcijos greitį riboja aktyvaus tarpinio produkto susidarymas, kuris efektyviausiai vyksta rūgštinėje terpėje, o nukleofilo stiprumas apsprendžia tik galutinį reakcijos produktą, bet ne reakcijos greitį. Reakcija gali vykti pagal pasiūlytus fermentų timidilatsintetazės (Barrett ir Maltby, 1998) bei deoksicitidino hidrosimetiltransferazės (Graves ir kt., 1992) modelius: aktyvinto citozino tarpinio produkto (ACTP) hidroksigrupę dehidrosilina terpėje esanti rūgštis, susidarant 5-metilenio tarpiniam produktui (MTP), kuris yra stiprus elektrofilas. Šio aukštos energijos ekzometileno junginio galima būtų išvengti, jei vyksta intramolekulinė prie citozino C6 atomo prisijungusios baltymo Cys sieros ataka į hidrosimetilgrupę, susidarant papildomą keturnarį

žiedą turinčiam bicikliniam sulfonio tarpiniam produktui (BSTP) (pav. 3.21). Šiam keliui yra reikalingas aktyvaus centro konformacinis plastiškumas, kuris, pagal molekulinės dinamikos skaičiavimus, yra galimas M.HhaI (Lau ir Bruice, 1999). Vis dėlto, koks tiksliai tarpinis produktas susidaro – egzometileno ar biciklinis – nėra iki galo išsiaiškinta, tačiau abiejais atvejais po nukleofilo (tiolio arba selenolio) pridėjimo arba atakos susidaro naujas produktas. Jei prijungiamas vanduo, susidaro 5-hidroksimetilcitozinas. Esant aukštesniam pH, nukleofilo prijungimo išeigos mažėja ir kartu vyksta konkurencinė reakcija – 5-hidroksimetilintų citozinių konversija į citozinas.



Paveikslas 3.20. Citozino-5 metiltransferazių katalizuojamų tiolių ir selenolių prijungimo prie 5-hidroksimetilcitozino bei pastarojo konversijos į citoziną reakcijų tyrimas. a, b Viename eksperimente įvertintos tiek tiesioginės (hmC tolimesnis modifikavimas tioliais ir selenoliais (a)), tiek grįžtamos (hmC vertimas į C (b)) reakcijos išeigos, esant skirtingiems pH (pH 6.5 ir 7.4 – acetatinis buf., pH 8.0 – fosfatinis buf., pH 8.5 – Tris-HCl buf.). Reakcijos vykdytos, esant 20 mM G*HGC/GMGC-31 oligonukleotido, 200 nM M.HhaI Q82A/Y254S/N304A mutantinio baltymo ir 12 mM reagento; susidarę produktai analizuoti TLC metodu. c Reakcijos eiga, kai tiolis ir selenolis yra kartu vienoje reakcijoje.

UV chromatograma (kairėje) bei tikslinių hmC ir 2-aminoetanselenolio (viduryje) arba 2-aminoetantiolio (dešinėje) kondensacijos produktų masės paieškos. Reakcijos vykdytos, esant 13 μM GCGC/GCGC-24 oligonukleotido (pirmiausia modifikuoto M.HhaI ir FA, susidarant hmC), 13 μM M.HhaI wt ir 1.2 mM 2-aminoetanselenolio (1), 1.2 mM 2-aminoetantiolio (2) arba 0.6 mM abiejų reagentų (3) ir analizuotos HPLC-MS metodu.

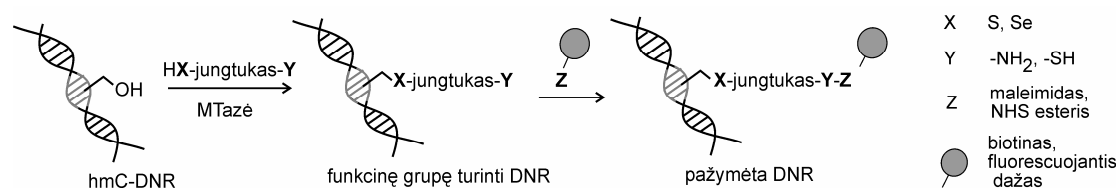


Paveikslas 3.21. Siūlomas citozino-5 metiltransferazių katalizuojamas tiolių/selenolių kondensacijos su 5-hidroksimetilcitoziniu mechanizmas (pavyzdžiu naudojamas hmC ir 2-aminoetantiolis). Reakcija vyksta per aktyvintą citozino tarpinį produktą (ACTP), kuris dėl rūgštinės dehidratacijos virsta aktyviu 5-metilenų tarpiniu produktu (MTP) arba bicikliniu sulfonio tarpiniu produktu (BSTP). Vienas iš jų toliau dalyvauja greitame tiolių/selenolių prijungime. MTazės ir jų katalitiniai motyvai parodyti mėlynai, reakcijos, vykstančios fermentų aktyviame centre, yra apibrėžtos mėlynu punktyru, aldehydai parodyti raudonai, tioliai/selenoliai – žaliai.

3.2.7 Metiltransferazių katalizuojamų netipinių reakcijų panaudojimas

2009 m. pelių smegenų ir kamieninių ląstelių DNR buvo atrastas hmC (Kriaučionis ir Heintz, 2009; Tahiliani ir kt., 2009). Nuo pat atradimo pradžios hmC yra intensyviai tyrinėjamas, tačiau jo vaidmuo epigenetikoje ir DNR demetilinime iki šiol nėra visiškai išaiškintas (žr. 1.1.4 ir 1.1.5). Šios šeštos bazės tyrimus stabdo metodų, galinčių atskirti mC nuo hmC, stoka. Be to, cheminiam hmC įvedimui į sintetinius oligonukleotidus buvo reikalingas sintezės optimizavimas (Munzel ir kt., 2010). Kokybiškų DNR substratų, turinčių hmC bazes, stoka pristabdė hmC *in vitro* tyrimus. MTazių katalizuojamas formaldehido prijungimas prie taikinio citozino, susidarant hmC, suteikė unikalią galimybę paruošti eilę DNR substratų, turinčių

hidroksimetilintą citoziną, kurių nebuvo galima gauti nei PGR, nei cheminės oligonukleotidų sintezės keliu. hmC atradimas žinduolių DNR paskatino panaudoti atrastas MTazių reakcijas genomines DNR tyrimams hmC analizei. MTazių katalizuojamas tiolių ir selenolių, turinčių funkcines grupes, prijungimas prie hmC įgalina chemiškai atskirti hmC nuo C ir mC genomineje DNR. Šia linkme praktiškai išbandėme tris reagentus, turinčius merkaptogrupę: 2-aminoetantiolį, cisteiną ir DTT. Pirmieji du turi funkcines aminogrupes, prie kurių chemoselektyviai galima prijungti žymę, naudojant *N*-hidroksisukcinimido (NHS) esterį. DTT atveju viena merkaptogrupė yra prijungiama prie hmC, o antroji gali būti panaudota prijungiant žymenis, turinčius maleimidą.



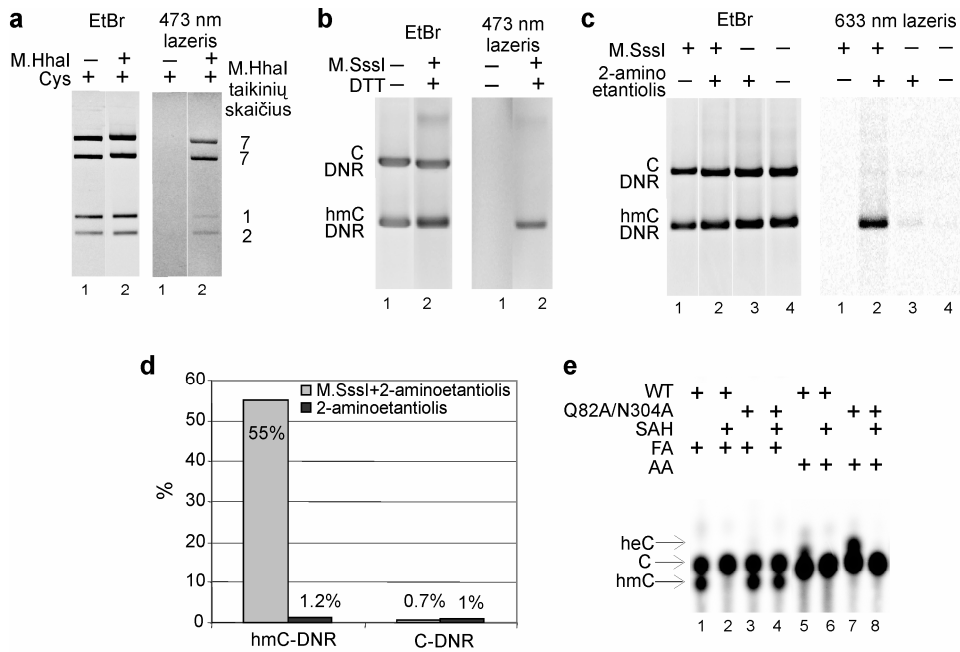
Paveikslas 3.22. Sekai specifinio kovalentinio 5-hidroksimetilcitoziną turinčios DNR žymėjimo schema. Pirmoje stadijoje MTazė modifikuoja savo taikinyje esantį hmC tioliais ir selenoliais (HX), turinčiais funkcines grupes (Y, -SH arba -NH₂), prie kurių antroje stadijoje yra prijungiama žymė (pilkas rutuliukas, biotinas arba fluorescencinis dažas) per specifinę grupę (Z, maleimidas arba NHS esteris). MTazės taikinytis parodytas pilkai.

Siekiant tiksliai įvertinti reakcijų išėigas ir foną, atlikome žymėjimo ir tikro laiko PGR (TL-PGR) eksperimentus. TL-PGR eksperimentuose buvo naudoti du PGR fragmentai, kurių vienas turėjo du M.SssI taikinius su hmC (tikslinis žymėjimo išėigai įvertinti naudotas PGR fragmentas), o kitas neturėjo (fono įvertinimui naudotas PGR fragmentas). Po reakcijos su M.SssI ir 2-aminoetantioliu modifikuota DNR buvo atskiriama nuo nmodifikuotos DNR, naudojant biotino NHS esterį bei streptavidinu dengtas magnetines daleles. Tikslinės ir foninės DNR kiekis, esantis ant magnetinių dalelių, apskaičiuotas TL-PGR metodu ir palygintas su terpėje likusiu DNR kiekiu. Nustatyta, kad ~50% tikslnio PGR fragmento ir tik ~1% nespecifinio foninio PGR fragmento "prilimpa" prie magnetinių dalelių (pav. 3.23d). Po to tokią hmC praturtintą DNR frakciją galima tirti mikrogardelėmis arba nustatyti DNR seką.

Kitame eksperimente naudojome du PGR fragmentus, kurių vienas buvo kontrolinis, skirtas žymėjimo fonui stebėti, o kitas, tikslinis, susintetintas vietoje dCTP naudojant dhmCTP, taigi, visi citozinai buvo pakeisti į hmC. Tokie PGR fragmentai toliau buvo žymimi, naudojant M.SssI ir 2-aminoetantiolį arba DTT, o po to fluorescencinius dažus Cy5 NHS esterį arba ATTO-520 maleimidą. Su abiem reagentais buvo gautas selektyvus tikslinio PGR fragmento žymėjimas (pav. 3.23b,c).

Kita sritis, kur galima pritaikyti netipines MTazių reakcijas – kovalentinis DNR žymėjimas specifinėse sekose. Prieš kelis metus DNR metiltransferazės ir brangūs sintetiniai kofaktoriaus analogai pradėti naudoti DNR pažymėti specifinėse sekose (žr. 1.2.4 ir 3.3.2.2). Pritaikius netipines MTazių reakcijas, taip pat galima pažymėti DNR specifinėse MTazių atpažįstamosiose sekose, panaudojant paprastus ir pigius cheminius reagentus. DNR paeiliui veikiant formaldehidu ir tioliu ar selenoliu, bei esant MTazei, sekai specifiskai prijungiami du junginiai. Naudojant formaldehidą, o po to cisteiną bei prie įvestos aminogrupės chemoselektyviai prijungus fluoresceino NHS esterį, sekai specifiskai M.HhaI taikiniuose pažymėjome plazmidinę DNR. Fluorescencijos intensyvumas plazmidinės DNR fragmentuose po REazių hidrolizės pasiskirstė pagal M.HhaI taikinių kiekį (pav. 3.23a).

Kitas paprastesnis žymėjimo būdas būtų didesnių aldehydų, turinčių funkcinę grupę, panaudojimas. Tačiau wt tipo MTazės neefektyviai prijungia didesnius nei FA aldehydus. Išbandžius M.HhaI mutantinį baltymą Q82A/N304A, turintį praplėstą kofaktoriaus surišimo centrą, paaiškėjo, kad jis efektyviau nei wt prijungia AA bei geba prijungti FA, reakcijos mišinyje esant kofaktoriaus analogui SAH (wt baltymą SAH visiškai užslopino) (pav. 3.23e). Taigi, tikėtina, kad kryptinga baltymų inžinerija gali pagerinti baltymų, kurie prijungia didesnius aldehydus, efektyvumą.



Paveikslas 3.23. Sekai specifinis kovalentinis 5-hidroksimetilcitoziną turinčios DNR žymėjimas ir praturtinimas. **a** Plazmidinės pUC19 DNR žymėjimas fluorescuojančia grupe, naudojant M.HhaI, formaldehidą, cisteiną ir fluoresceino NHS esterį. Po žymėjimo reakcijos DNR buvo sufragmentuota su R.FspBI ir analizuota agaroziniame gelyje. Pirmiausia gelis nuskanuotas, naudojant 473 nm lazerį, o po to nudažytas etidžio bromidu. **b-c** Dviejų PGR fragmentų mišinio, kurių vienas tikslinis buvo susintetintas naudojant dhMCTP (hmC DNR), o kitas kontrolinis – dCTP (C DNR), žymėjimas, naudojant M.SssI, DTT ir ATTO-520 maleimidą (**b**) arba M.SssI, 2-aminoetantiolį ir Cy5 NHS esterį (**c**). Po elektroforezės agaroziniame gelyje DNR pirmiausia buvo vizualizuota naudojant reikiamą lazerį (473 nm (**b**) arba 633 nm (**c**)) ir po to nudažyta etidžio bromidu (EtBr). **d** PGR fragmentų mišinys, turintis arba neturintis hmC (hmC-DNR (2 M.SssI taikiniai) ir C-DNR (nėra M.SssI taikinių), buvo veikiamas 2-aminoetantioliu, esant M.SssI. Po to prie įvestos aminogrupės prijungtas biotino NHS esteris ir biotinu modifikuota DNR atskirta nuo nemodifikuotos, naudojant streptavidinu padengtas magnetines daleles. Kiekvieno fragmento kiekis buvo įvertintas, atliekant tikro laiko PGR tiesiai nuo dalelių, ir palygintas su terpėje likusiu DNR kiekiu. **e** Padidinus kofaktoriaus surišimo kišenę (mutantinis baltymas Q82A/N304A), M.HhaI geba prijungti formaldehidą (FA) reakcijoje esant SAH bei didesne išėiga nei wt prijungti acetaldehidą (AA). Reakcijos vykdytos, esant 20 nM DNR G*CG*C/GMGC-32, 560 μM SAH (takeliai 2, 4, 6, 8), 125 nM M.HhaI wt (takeliai 1, 2, 5, 6) arba Q82A/N304A (takeliai 3,4, 7, 8), 13 mM FA (takeliai 1–4) arba 0.8 M AA (takeliai 5–8) 1 val k.t. Modifikuota DNR buvo sufragmentuota iki 5'-dNMP ir analizuota TLC.

3.3 Rezultatų aptarimas

3.3.1 Cheminis fermentų vykdomo citozino išsukimo tyrimo metodas

Paprastas, pigus ir sudėtingos įrangos nereikalaujantis cheminis fermento išsuktų citozinių identifikacijos metodas gali būti taikomas tiek DNR citozino-5 metiltransferazėms, tiek restrikcijos endonukleazėms.

Metiltransferazių atveju reakcija vyksta švelniomis sąlygomis, tačiau yra būtinas ne tik bazės išsukimas bet ir citozino žiedo aktyvacija, susidarant baltymo-citozino kovalentiniam kompleksui. Reakcijose su MTazėmis keičiasi Caa specifiskumas: susidaro kiti reakcijos produktai nei viengrandės DNR ar REazių-DNR kompleksų atvejais. Reikia nepamiršti, kad choracetaldehidas yra stiprus elektrofilas ir reaguoja ne tik su DNR, bet ir su baltymų nukleofiliniais centrais (aminogrupėmis bei sieros atomą turinčiomis ar.). Manome, kad dėl šių pašalinių reakcijų didelėse Caa koncentracijose bei naudojant bromoacetaldehidą, kuris yra stipresnis elektrofilas, gali vykti baltymo inaktyvacija.

3.3.2 Netipinės DNR citozino-5 metiltransferazių katalizuojamos reakcijos

Atrastos netipinės MTazių reakcijos – trumpų alifatinių aldehydų prijungimas į citozino-5 padėtį, susidariusių 5-(1-hidroksialkil)citozinių vertimas į citozinius bei tolimesnė 5-(1-hidroksialkil)citozinių modifikacija prijungiant tiolius ir selenolius – yra įdomios keliais aspektais. Visų pirma, yra labai netikėta, kad DNR citozino-5 metiltransferazės, kurios paprastai perneša metilgrupę nuo kofaktoriaus SAM, taip pat geba panaudoti visai į kofaktorių nepanašius junginius: 1) aldehydus, prijungdamos juos į citozino-5 padėtį ir 2) tiolius arba selenolius, kuriais toliau modifikuojamas taikinyje esantis hmC. Pastarosiose reakcijose MTazės atpažįsta bei modifikuoja pakitusį DNR substratą – vietoje taikinio citozino turintį hmC.

Netipinės metiltransferazių reakcijos buvo atrastos tuo pačiu metu kaip ir šešta – hmC – bazė genominėje eukariotų DNR. Šis sutapimas paskatino įsijungti į metodų, kurie įgalintų nustatyti hmC pozicijas genominėje DNR, kūrimo lenktynes ir leido pasiūlyti galimas veikėjus, kurie dalyvauja atsirandant hmC bei demetilinant DNR eukariotiniuose organizmuose.

3.3.2.1 Metiltransferazių katalizuojamų netipinių reakcijų sąsaja su 5-hidroksimetilcitozino atsiradimu ir demetilinimu eukariotinėje DNR

In vivo ir *in vitro* eksperimentų rezultatai rodo, kad Tet baltymai verčia mC į hmC. Manoma, kad tai yra pagrindinis hmC atsiradimo kelias eukariotinėje DNR (Tahiliani ir kt., 2009). Teoriškai metiltransferazės taip pat galėtų prisidėti prie hmC kiekio padidėjimo, nes formaldehido koncentracijos ląstelėse gali būti panašios į naudotas mūsų eksperimentuose (Heck ir Casanova, 2004), o mūsų rezultatai rodo, kad pelės MTazė Dnmt1, nors ir žymiai mažesnėmis išieigomis nei prokariotinės MTazės, prijungia formaldehidą prie citozino, susidarant hmC (pav. 3.7c). Aldehydų prijungimas į citozino-5 padėtį yra galimas, tik jei MTazė nėra prisijungusi kofaktoriaus SAM. Ląstelėje SAM kiekis yra didelis, nes jis dalyvauja daugelyje gyvybei būtinų procesų. Tačiau didelės daugiadomeninės eukariotinės MTazės gali turėti specialius mechanizmus, kurie užblokuotų SAM'o patekimą į aktyvų fermento centrą. Neatmetama galimybė, kad tam tikrose ląstelės vietose SAM kiekis gali būti minimalus.

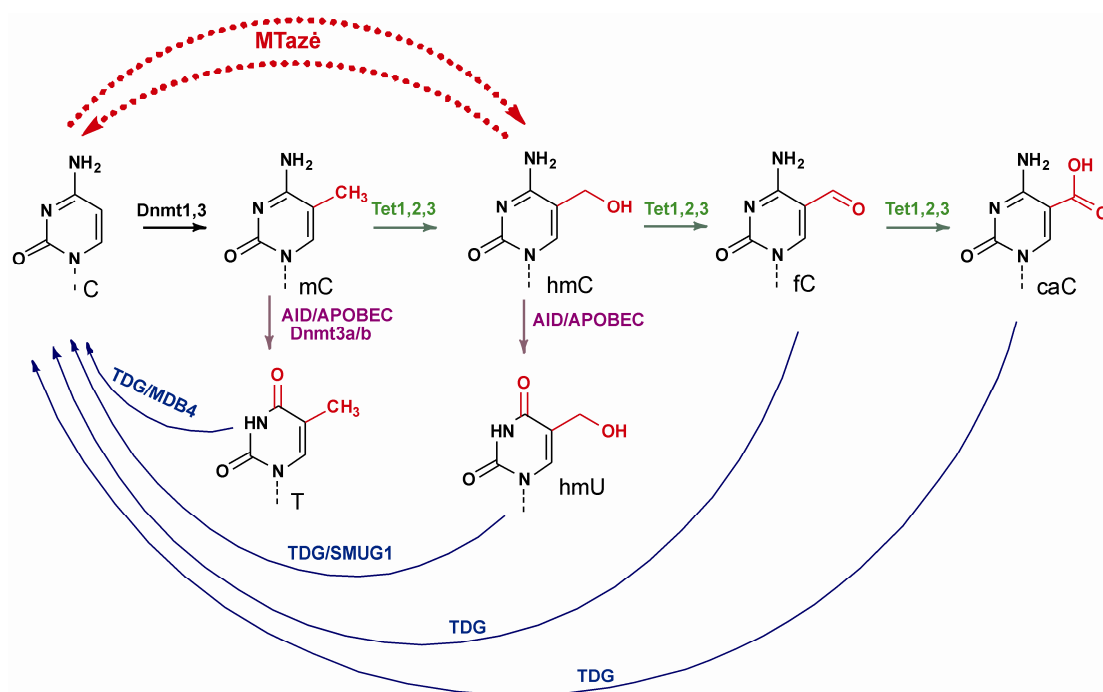
Įdomu, kad eukariotinių ląstelių mitochondrinėje DNR taip pat buvo surastas mC ir hmC. Parodyta, kad metiltransferazės Dnmt1 genas turi alternatyvią transliacijos pradžią, kuri koduoja signalinį peptidą, nukreipiantį Dnmt1 į mitochondrijas. TET baltymų atveju panašių signalinių sekų nėra, taigi, neaišku, iš kur hmC atsiranda mitochondrinėje DNR (Shock ir kt., 2011). Neatmetama galimybė, kad tam tikromis sąlygomis ir konkrečioje vietoje MTazės gali prijungti formaldehidą savo taikiniuose, susidarant hmC *in vivo* (pav. 3.24).

Vienas iš pasiūlytų DNR demetilinimo kelių yra tiesioginis metilo grupės nuėmimas nuo mC. C-C jungties nutraukimui yra reikalinga milžiniška energija, kuri sumažėtų, jei metilo grupė būtų oksiduojama iki hidroksigrupės, aldehidinės arba karboksigrupės. Metilo grupės pašalinimą nuo azoto atomų katalizuoja *E. coli* alkilintų DNR pažaidų taisymo fermentas AlkB, kuris oksiduoja 1-metiladeniną ir 3-metilcitoziną iki hidroksimetilintų darinių, nuo kurių spontaniškai atskylant aldehidui, yra ištaisoma pažaida (Sedgwick ir kt.,

2007). Panašus mechanizmas yra būdingas ir histonų demetilazėms. Nors C-C ryšio nutraukimas reikalauja daugiau energijos nei C-N, timino bazės skaldymo kelyje, dalyvaujant dviems fermentams, timino metilo grupė yra oksiduojama pirmiausia iki hidroksimetilgrupės, po to iki formilo ir galiausiai iki karboksigrupės, kuri yra pašalinama anglies dvideginio pavidalu, susidarant uracilui. Panašus reakcijos mechanizmas buvo pasiūlytas fermentiniame DNR demetilinimo kelyje, kai tik buvo atrasti Tet baltymai, naudojantys tokius pačius kofaktorius kaip ir ankščiau minėti fermentai: 2-oksogliutaratą, deguonį ir geležį (Wu ir Zhang, 2010). Tet baltymai efektyviai oksiduoja mC metilgrupę iki hidroksimetilgrupės, susidarant hmC, tačiau tolimesnė oksidacija iki 5-formilcitozino (fC) ir 5-karboksicitozino (caC) nėra efektyvi ir pradžioje net liko nepastebėta (He ir kt., 2011; Ito ir kt., 2011), o fC ir caC tarpinių produktų išmatuojamo kiekio nepavyko surasti gamtinėje DNR (Globisch ir kt., 2010). Tačiau pasitelkus jautresnius metodus labai maži fC ir caC kiekiai (100 ir daugiau kartų mažesni nei hmC) buvo surasti embrioninėse kamieninėse ląstelėse ir įvairiuose audiniuose (Ito ir kt., 2011; Pfaffeneder ir kt., 2011). Mūsų atrasta formaldehido pašalinimo nuo hmC C5 atomo reakcija, aktyviai veikiant MTazei, leidžia geriau suprasti galimus fermentinio DNR demetilinimo kelius, kurie iki šiol dar nėra iki galo išaiškinti. Mūsų eksperimentai rodo, kad demetilinimas gali vykti per hmC tarpinį produktą, kuris virsta į citoziną, aktyviai dalyvaujant fermentui. *In vivo* šią reakciją galėtų vykdyti specialus baltymas, naudojantis panašų į MTazių citozino aktyvacijos mechanizmą. Mažai tikėtina, kad MTazės *in vivo* ne tik metilina, bet ir demetilina DNR, nors vienas tyrimas atskleidė, kad eukariotinės MTazės gali būti susijusios su DNR demetilinimu (pav. 2.24) (Metivier ir kt., 2008).

Naujausi kitų mokslininkų *in vitro* ir *in vivo* eksperimentai parodė, kad fC ir caC bazės yra efektyviai iškerpamos TDG glikozilazės (He ir kt., 2011; Maiti ir Drohat, 2011). Kitas tyrimas atskleidė, kad smegenyse hmC yra deamininamas iki hmU AID/APOBEC dezaminazių, o hmU bazė yra iškerpama iš DNR TDG/SMUG1 (SMUG1 – hmU glikozilazė) glikozilazių (pav. 3.24) (Cortellino ir kt., 2011; Guo ir kt., 2011). Taip pat yra pasiūlyta,

kad fC ir caC gali tiesiogiai virsti į citoziną, dalyvaujant specialioms fermentams: deformilazei ir dekarboksilazei (Wu ir Zhang, 2010; Pfaffeneder ir kt., 2011). Beje, hmC glikozilaziniu aktyvumu pasižymi veršiuko užkrūčio liaukos ekstraktai (Cannon ir kt., 1988), taigi, toliau tyrinėjant demetilinimą, gali atsirasti ir daugiau svarbių veikėjų. Įdomu, kad hmU ir hmC glikozilazės, TET baltymai ir hmC yra tik tuose eukariotuose, kurie turi mC, tačiau jie nebūdingi prokariotams, mielėms ir drozofiloms, kurie neturi arba turi labai mažus mC kiekius (Cannon ir kt., 1988; Boorstein ir kt., 1989; Cannon-Carlson ir kt., 1989; Song ir kt., 2010, a).



Paveikslas 3.24. Aktyvaus DNR demetilinimo mechanizmai žinduoliuose. Žalioomis rodyklėmis nurodytas 5-metilcitozino (mC) oksidacijos kelias iki 5-karboksicitozino (caC) per 5-hidroksimetilcitozino (hmC) ir 5-formilcitozino (fC) tarpines stadijas; oksidaciją atlieka oksigenazės Tet1,2,3. Alyvinėmis rodyklėmis nurodytas deaminavimo kelias, kuriame dalyvauja deaminazės AID ir APOBEC, bei, galbūt, DNR metiltransferazės Dnmt3a ir Dnmt3b; mC ir hmC yra deamininami iki timino (T) ir 5-hidroksimetiluracilo (hmU). Mėlynomis rodyklėmis nurodytas bazių iškirpimo taisymo kelias, kuriame dalyvauja glikozilazės TDG, MBD4 ir SMUG1. Raudonomis punktyrinėmis rodyklėmis nurodytos DNR citozino-5 metiltransferazių netipinės reakcijos – hidroksimetilinimas ir dehidroksimetilinimas, kurios dar nėra patvirtintos *in vivo*.

3.3.2.2 Metiltransferazių katalizuojamų netipinių reakcijų panaudojimas

Prieš 3 metus atradus hmC eukariotinėje DNR, reikėjo sukurti naujus metodus hmC pozicijų nustatymui. Auksiniu standartu laikytas ir dažniausiai naudotas metodas mC pozicijoms nustatyti yra DNR sekos nustatymas po natrio bisulfito reakcijos. Deja, šiuo metodu negalima atskirti mC nuo hmC, nes 5 padėtyje modifikuoti citozinai, priešingai nei nemonifikuoti, nėra deamininami (citozinai deamininasi iki uridinių ir yra nuskaityti kaip U-A pora, o mC ir hmC yra normaliai perskaityti, kaip C-G poros) (pav. 3.25). Metilinimui jautrios restrikcijos endonukleazės, naudojamos mC tyrimams, taip pat neatskiria skirtingų pakaitų citozino-5 padėtyje, ir tik metodai, kurie pagrįsti mC antikūnais arba su mC sąveikaujančiais baltymais, leidžia atskirti metilintą citoziną nuo nemonifikuoto arba hidrosimetilinto (Huang ir kt., 2010; Jin ir kt., 2010; Nestor ir kt., 2010). Taigi, reikėjo ne tik atidžiai peržiūrėti DNR metilinimo duomenis, nes juose vietoje mC gali būti ir hmC, bet taip pat sukurti naujus metodus, kurie leistų atskirti metilinimą nuo hidrosimetilinimo. Per 3 metus kartu su mūsų siūlomą metodu, hmC pozicijoms nustatyti buvo pasiūlyta keletas būdų, kurie remiasi skirtingais principais:

1) REazių panaudojimu. Kai kurios REazės (R.MspI, R.GlaI, R.MspJI) geba kirpti DNR esant mC ir hmC, tačiau pastarąjį gliukozilinus, panaudojant fagų gliukoziltransferazes, DNR jau nėra karpoma (Zheng ir kt., 2010; Davis ir Vaisvila, 2011). Kitos REazės specifiskai karpą hmC turinčią DNR (PvuRtsII) (Szwagierczak ir kt., 2011; Wang ir kt., 2011).

2) Vienos molekulės naujų DNR sekoskaitos technologijų panaudojimu, kurios geba atskirti hmC nuo mC be jokių papildomų etapų (Flusberg ir kt., 2010; Wallace ir kt., 2010; Wanunu ir kt., 2010).

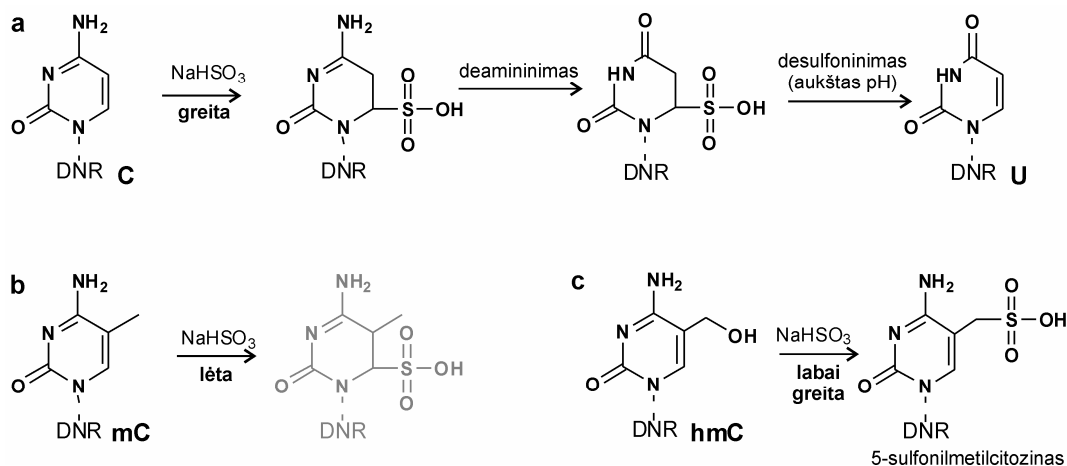
3) Tripanosomos baltymo, sąveikaujančio su J baze, panaudojimu, kuris taip pat specifiskai riša gliukozilintą hmC (Robertson ir kt., 2011).

4) Tikslinė hmC oksidacija, dėl kurios piperidino poveikyje atsiranda DNR grandinės trūkiai (Okamoto ir kt., 2011).

5) Gliukozilinto hmC oksidacija natrio perjodatu. Oksiduoiant atsiveria gliukozės žiedas, ir susidaro dvi aldehydgrupės, prie kurių gali būti prijungtos dvi reporterinės molekulės (pav. 3.26a) (Pastor ir kt., 2011).

6) Antikūnais prieš hmC arba prieš 5-sulfonilmetilcitoziną, kuris susidaro, hmC veikiant natrio bisulfitu (pav. 3.25c) (Ficz ir kt., 2011; Jin ir kt., 2011; Pastor ir kt., 2011).

7) Modifikuotais T4 fago gliukoziltransferazių kofaktorių analogais. Sintetiniai kofaktorių analogai, gliukozės šeštos hidroksigrupės vietoje turintys azido (Song ir kt., 2010, a) ar aldehydgrupės (Song ir kt., 2011, b), yra pritaikyti atskirti hmC turinčią DNR frakciją, naudojant biotiną su triguba jungtimi ir biotino-hidroksiamino konjugatą (pav. 3.26b). Abu kofaktoriai taip pat gali būti naudojami kombinacijose su RE, ekzonukleaze III ar DNR polimerazėmis, norint tiksliai nustatyti hmC pozicijas (Song ir kt., 2010, a; Song ir He, 2011; Song ir kt., 2011, b).

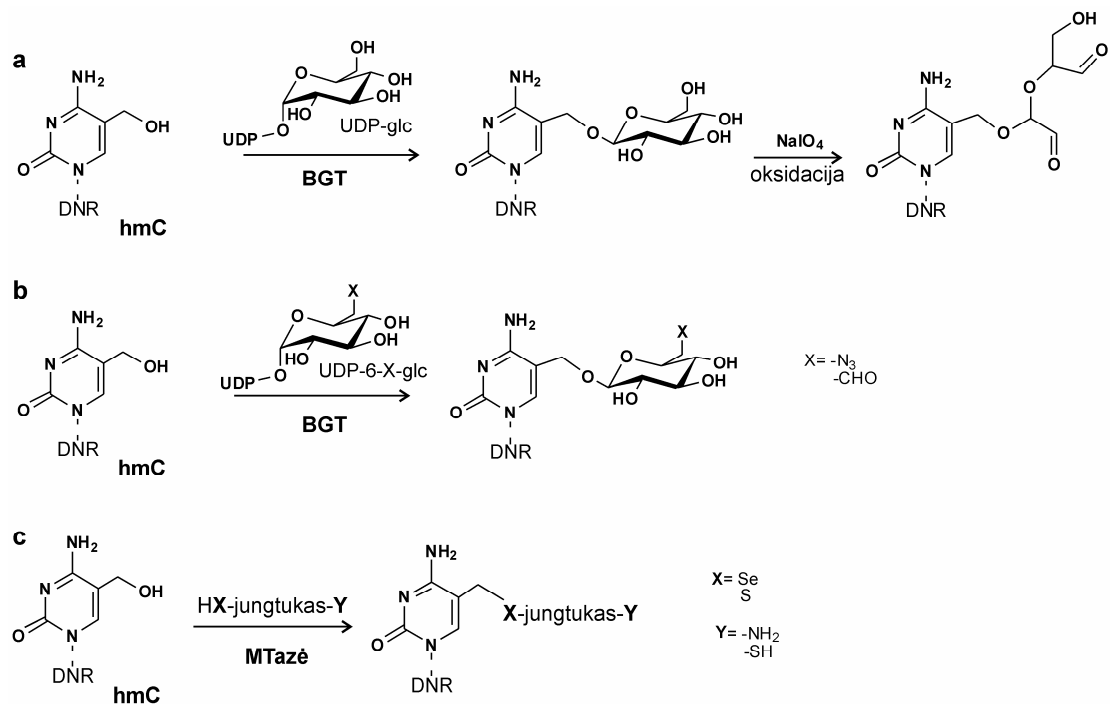


Paveikslas 3.25. Citozino (a), 5-metilcitozino (b) ir 5-hidroksimetilcitozino (c) reakcijos su natrio bisulfitu (NaHSO₃) (Huang ir kt., 2010).

Daugumos šių metodų veikimas yra pademonstruotas su kontrolinėmis DNR ir reikalauja papildomo optimizavimo, norint juos taikyti genominės DNR tyrimams hmC pozicijų identifikavimui. Tik paskutiniai 3 metodai buvo išbandyti praktiškai, tiriant genominę DNR. Svarbiausios metodo savybės, kurias nori pasiekti metodų kūrėjai, yra vieno nukleotido skiriamoji geba bei galimybė tirti visą genomą, t.y. labai svarbu, kad po manipuliacijų su hmC

turinčia DNR, ją toliau būtų galima naudoti sekoskaitoje arba mikrogardelėse. Dabar šiuos abu kriterijus atitinka vienintelis paskutinis metodas kombinacijoje su vienos molekulės tikro laiko DNR sekoskaita (angl. single-molecule, real-time (SMRT) DNA sequencing), kuomet DNR polimerazė sustoja ties papildomai modifikuotomis hmC bazėmis, leisdama tiksliai identifikuoti hidrosimetilintą citoziną (Song ir kt., 2011, a). Tikėtina, kad ir mūsų metode prie įvestų funkcinių grupių prijungus dideles chemines grupes, galima gauti efektyvius DNR polimerazių stojimus, o tai leistų pasiekti vieno nukleotido skiriamąją gebą. Kitas mūsų siūlomo metodo privalumas – galimybė ištirti visas CG sekas genome, panaudojus M.SssI. Eukariotuose (pvz. žinduolių somatinėse ląstelėse) mC, taigi, tikėtina, kad ir hmC, yra randamas beveik tik CG sekose. Kartu taikant seniau sukurtą mTAG (žr. toliau ir 1.2.4), naudojant panašias eksperimentines procedūras, būtų galima tirti tiek mC, tiek hmC pozicijas genominiame DNR.

Kita sritis, kur galima pritaikyti netipines MTazių reakcijas – kovalentinis DNR žymėjimas specifinėse sekose. Metodai, skirti DNR žymėti specifinėse sekose, yra vis plačiau taikomi tiek mokslinėse, tiek medicinos laboratorijose (Ghosh ir kt., 2006). Prieš kelis metus DNR metiltransferazės pradėtos naudoti DNR pažymėti specifinėse sekose (Dalhoff ir kt., 2006; Lukinavičius ir kt., 2007). Šis naujas mTAG metodas susideda iš dviejų žingsnių: pirmiausia nuo dvigubai aktyvinto sintetinio kofaktoriaus ant DNR MTazė perneša funkcinę grupę (pav. 1.11c) (pvz.: amino, merkaptio, alkino ir kt.), prie kurios antrame žingsnyje yra prijungiama reporterinė grupė (pvz.: biotinas, fluorescuojantis dažas), panaudojant gerai žinomas chemoselektyvias reakcijas su funkcinėmis grupėmis. mTAG metodas yra selektyvus ir specifiškas, tačiau sąlyginai brangus dėl sudėtingos kofaktorių sintezės. Pritaikius netipines MTazių reakcijas, paeiliui veikiant formaldehidu ir cistaminu (arba 2-aminoetantioliu ar DTT) bei esant MTazei, galima pažymėti DNR specifinėse MTazių atpažįstamosiose sekose, naudojant paprastus ir pigius cheminius reagentus (pav. 2.23a-c).



Paveikslas 3.26. Fermentinis 5-hidroksimetilcitozino modifikavimas DNR. **a, b** T4 fago β -gliukoziltransferazė (BGT) perneša gliukozės liekanas nuo natūralaus (a) arba sintetinio kofaktoriaus uridinil-(1-gliukozil)difosfato (UDP-glc arba UDP-6-X-glc) (b) ant 5-hidroksimetilcitozino (hmC). Prijungta gliukozės liekana yra oksiduojama natrio perjodatu, susidarant dviems aldehydgrupėms (a). Naudojant sintetinį kofaktoriaus analogą, gliukozės šeštos hidroksigrupės vietoje turintį funkcines azido arba aldehydgrupes (UDP-6-N₃-glc arba UDP-6-CHO-glc), funkcinės grupės yra prijungiamos prie hmC (b). **c** DNR citozino-5 metiltransferazės modifikuoja savo taikinyje esantį hmC, hidroksigrupę pakeisdamos tioliais arba selenolais, turinčiais funkcines amino arba merkaptogrupes. Įvestos funkcinės grupės (aldehido, azido, amino ar merkpto) toliau naudojamos, prijungiant biotiną ir atskiriant hmC turinčią DNR frakciją. Paruošta, remiantis letaratūriniais duomenimis (Song ir kt., 2010, a; Munzel ir kt., 2011; Pastor ir kt., 2011; Song ir kt., 2011, b).

IŠVADOS

1. Pademonstruota, kad 2-chloracetaldehidas gali būti naudojamas nesuporuotų citozinių identifikavimui DNR citozino-5 metiltransferazių ir restrikcijos endonukleazių kompleksuose su DNR, reakcijos metu susidarant atitinkamai N⁴,5- arba N³,N⁴-etenocitozino dariniams.

2. DNR citozino-5 metiltransferazės katalizuoja trumpų alifatinių aldehydų įjungimą į modifikuojamo citozino-5 padėtį ir 5-(1-hidroksialkil)citozinių vertimą į nmodifikuotus citozinius *in vitro*.

3. DNR citozino-5 metiltransferazės katalizuoja alkiltolių ir alkilselenolių kondensaciją su 5-hidroksimetilcitozino liekanomis DNR *in vitro*. Reakcija vyksta protonizacijos-dehidratacijos būdu, susidarant tarpinei citozino-5-egzometileno (arba biciklinio citozino-5,6-tietano) dalelei, kuri prijungia nukleofilą, susiformuojant atitinkamiems 5-chalkogenometilcitozinams. Aktyvios tarpinės dalelės susidarymas yra nuo pH priklausanti ir bendrą reakcijos greitį ribojanti stadija, o nukleofilo stiprumas lemia prijungimo reakcijos selektyvumą.

4. Parodyta, kad citozino-5 metiltransferazių katalizuojama 5-hidroksimetilcitozino modifikacija alkiltoliais ir alkilselenoliais gali būti naudojama selektyviam funkciinių ir reporterinių grupių įjungimui į DNR.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiuose moksliniuose straipsniuose:

1. **Liutkevičiūtė, Z.**, Kriukienė, E., Grigaitytė, I., Masevičius, V. and Klimašauskas, S. (2011). Methyltransferase-directed derivatization of 5-hydroxymethylcytosine in DNA. *Angew Chem Int Ed Engl.* 50(9):2090-2093; *Angew Chem* 123: 2138-2141.
2. **Liutkevičiūtė, Z.**, Lukinavičius, G., Masevičius, V., Daujotytė, D. and Klimašauskas, S. (2009). Cytosine-5 methyltransferases add aldehydes to DNA. *Nature Chem. Biol.*, 5(6): 400-402.
3. Daujotytė, 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.

Patentinėse paraiškose:

4. Klimašauskas, S., **Liutkevičiūtė, Z.** and Kriukienė, E. Derivatization of biomolecules by covalent coupling of non-cofactor compounds using methyltransferases. Tarptautinė patentinė paraiška PCT/EP2010/054436, paduota 2010.04.01.
5. Klimašauskas, S., **Liutkevičiūtė, Z.** and Kriukienė, E. Conversion of alpha-hydroxyalkylated residues in biomolecules using methyltransferases. Tarptautinė patentinė paraiška PCT/EP2010/054437, paduota 2010.04. 01.

Knygų skyriuose:

6. Klimašauskas, S. and **Liutkevičiūtė, Z.** (2009). Experimental approaches to study DNA base flipping. „DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution“. ed. H. Grosjean, Landes Bioscience: 19-32.
7. Klimašauskas, S., **Liutkevičiūtė, Z.** and Daujotytė, D. (2009). Biophysical approaches to study DNA base flipping. „Biophysics and

the challenges of emerging threats“. ed. J. D. Puglisi, Springer Netherlands: 51-64.

Disertacijoje pateikta medžiaga buvo pristatyta šiose konferencijose:

1. **Liutkevičiūtė, Z.**, Kriukienė, E., Grigaitytė, I., Vainorius, G., Masevičius, V. and Klimašauskas, S. Atypical reactions of DNA cytosine-5 methyltransferase. COST action TD09/05 meeting „Epigenetics – Bench to Bedside“, Croatia, Split, 2011.04.28-05.30. Žodinis pranešimas.
2. **Liutkevičiūtė, Z.**, Kriukienė, E., Masevičius, V., Urbanavičiūtė, G. and Klimašauskas, S. Methyltransferase-directed sequence-specific coupling of exogenous electrophiles to DNA. 6th New England Biolabs Meeting on Restriction/Modification, Jacobs University, Bremen, Germany, 2010.09.01-06. Stendinis pranešimas.
3. **Liutkevičiūtė, Z.**, Lukinavičius, G., Masevičius, V., Daujotytė, D. and Klimašauskas S. Methyltransferase-directed site-specific coupling of exogenous electrophiles to DNA. XI international meeting of Lithuania biochemical society "LBS 50", Molėtai, Lietuva, 2010.06.15-17. Stendinis pranešimas.
4. **Liutkevičiūtė, Z.**, Daujotytė, D., Tamulaitis, G., Klimašauskas, S. Cheminis išsuktų (ekstraspiralinių) citozinų identifikavimas baltymo-DNR kompleksuose. Lietuvos Biochemikų draugijos X-asis suvažiavimas-konferencija “Biochemija ir sistemų biologija”, Molėtai, Lietuva, 2008.06.20-22. Žodinis pranešimas.

FINANSINĖ PARAMA

Disertacijoje aprašyti darbai buvo iš dalies finansuoti Nacionalinio Sveikatos Instituto (JAV), Lietuvos Mokslo Tarybos ir Fp7-RegPot-2009 programos (Mobili projekto) lėšomis.

CURRICULUM VITAE

Vardas, Pavardė	Zita Liutkevičiūtė
Gimimo data	1982 04 03
Darbo adresas	DNR modifikacijos tyrimų skyrius Vilniaus universitetas Biotechnologijos institutas V. A. Graičiūno 8 Vilnius LT-02241
Telefonai	+370 5 2602118 (darbo) +370 650 49419 (asmeninis)
Faksas	+370 5 2602116 (darbo)
E-pašto adresai	zita@ibt.lt (darbo) zitulis@gmail.com (asmeninis)
Išsilavinimas	
2000-2004	Biologijos bakalauras Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)
2004-2006	Biochemijos magistras Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)
2007-2011	Biochemijos doktorantūros studijos Vilniaus universitetas, Biotechnologijos institutas (Vilnius, Lietuva)
Darbo patirtis	Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto DNR modifikacijos tyrimų skyrius:
2003-2006	Laborantė
2006-2007	Jaunesnioji mokslo darbuotoja
2007-2011	Bioinžinierė
2011-dabar	Jaunesnioji mokslo darbuotoja

PADĖKA

Dėkoju darbo vadovui Sauliui Klimašauskui už neišmatuojamą indėlį į šį darbą. Ačiū už pagalbą planuojant eksperimentus, interpretuojant duomenis ir rašant disertaciją; už kantrybę aiškinant MTazių reakcijų mechanizmus ir už tai, kad prieš penkis metus paskatino pasilikti moksle.

Dėkoju visiems Biotechnologijos instituto kolegoms už patarimus, diskusijas ir draugišką darbo atmosferą. Labai ačiū Viktorui Masevičiui už nepailstamą organinių reakcijų mechanizmų aiškinimą, standartų sintezę ir organinių junginių nomenklatūros konsultacijas; Editai Kriukienei už atliktą DNR žymėjimo biotinu ir praturtinimo eksperimentą; Gražvydui Lukinavičiui už HPLC-MS pradžiamosklį; Rūtai Gerasimaitei už pagalbą, atliekant pirmus TLC eksperimentus; Giedrei Urbanavičiūtei už nesuskaičiuojamą galybę anksti ryte išimtų TLC plokštelių ir DNR žymėjimo konsultacijas; Gintautui Tamulaičiui už pagalbą, dirbant su restrikcijos endonukleazėmis ir jų preparatus; Giedriui Vilkaičiui, Eglei Merkienei, Miglei Tomkuvienei, Linai Leinartaitei ir Zdislav Staševskij už mutantinių baltymų preparatus; savo pirmajai mokslinio darbo vadovei Daliai Daujotytei už tai, kad išmokė savarankiškai dirbti, kritiškai žiūrėti į gautus rezultatus bei niekada neprarasti vilties; savo studentams Indrei Grigaitytei ir Gintautui Vainoriui už produktyvų darbą ir gerą nuotaiką; Ervinui Gaidamauskui ir Romanui Chaleckui už visus atsiųstus man neprieinamus straipsnius.

Dėkoju savo pirmajai biologijos mokytojai Birutei Diliautienei, kuri sudomino gyvybės mokslais, ir chemijos mokytojai Liudai Pivoriūnienei, kuri, negailėdama laiko ir jėgų, per kelis mėnesius paruošė mane chemijos egzaminui.

Dėkoju savo kalnų, kelionių ir mokslo draugams už smagų laisvalaikį, domėjimąsi disertacijos darbais, mokslines ir nemokslines diskusijas.

Dėkoju savo tėvams už tai, kad augau beveik miške ir nuo mažų dienų tyrinėjau mus supantį gyvąjį pasaulį, už didelę ir gražią šeimą ir visus kitus žodžiais sunkiai nusakomus dalykus. Dėkoju savo sesėms ir broliui bei jų šeimoms, kad buvo šalia, domėjosi ir visuomet palaikė. Savo sesei dvynei Editai dėkoju už kantrybę, skaitant ir ieškant klaidų disertacijoje.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Alegria, A. H. (1967). "Hydroxymethylation of pyrimidine mononucleotides with formaldehyde." *Biochim. Biophys. Acta* **149**: 317-324.
2. Antequera, F. and A. Birds (1993). "Number of CpG islands and genes in human and mouse." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**: 11995-11999.
3. Bair, C. L. and L. W. Black (2007). "A type IV modification dependent restriction nuclease that targets glucosylated hydroxymethyl cytosine modified DNAs." *J Mol Biol* **366**(3): 768-78.
4. Barrett, J. E. and Maltby (1998). "Trapping of C5 methylene intermediate in thymidylate synthase." *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 449-450.
5. Beland, F. A., N. F. Fullerton and R. H. Heflich (1984). "Rapid isolation, hydrolysis and chromatography of formaldehyde-modified DNA." *J Chromatogr* **308**: 121-31.
6. Bestor, T. H. (2000). "The DNA methyltransferases of mammals." *Humans Molecular Genetics* **9**(16): 2395-2402.
7. Bhattacharya, S. K., S. Ramchandani, N. Cervoni and M. Szyf (1999). "A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA." *Nature* **397**(6720): 579-83.
8. Bhutani, N., D. M. Burns and H. M. Blau (2011). "DNA Demethylation Dynamics." *Cell* **146**(6): 866-872.
9. Biernat, J., J. Ciesiolka, P. Gornicki, R. W. Adamiak, W. J. Krzyzosiak and M. Wiewiorowski (1978). "New observations concerning the chloroacetaldehyde reaction with some tRNA constituents. Stable intermediates, kinetics and selectivity of the reaction." *Nucleic Acids Res.* **5**(3): 789-804.
10. Bochtler, M., R. H. Szczepanowski, G. Tamulaitis, S. Gražulis, H. Czapinska, E. Manakova and V. Šikšnys (2006). "Nukleotide flips determine the specificity of the Ecl18kl restriction endonuclease." *EMBO J.* **25**(10): 2219-2229.
11. Bogdanovic, O. and G. J. Veenstra (2009). "DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function." *Chromosoma* **118**(5): 549-65.
12. Boorstein, R. J., L. N. Chiu and G. W. Teebor (1989). "Phylogenetic evidence of a role for 5-hydroxymethyluracil-DNA glycosylase in the maintenance of 5-methylcytosine in DNA." *Nucleic Acids Res* **17**(19): 7653-61.
13. Cannon, S. V., A. Cummings and G. W. Teebor (1988). "5-Hydroxymethylcytosine DNA glycosylase activity in mammalian tissue." *Biochem Biophys Res Commun* **151**(3): 1173-9.
14. Cannon-Carlson, S. V., H. Gokhale and G. W. Teebor (1989). "Purification and characterization of 5-hydroxymethyluracil-DNA glycosylase from calf thymus. Its possible role in the maintenance of methylated cytosine residues." *J Biol Chem* **264**(22): 13306-12.
15. Cao, C., J. S. Jiang, J. T. Stivers and F. Song (2004). "Dynamic opening of DNA during the enzymatic search for a damaged base." *Nat. Struct. Biol.* **11**: 1230-1236.
16. Cheng, X. and R. M. Blumenthal (1996). "Finding a basis for flipping bases." *Structure* **4**: 639-645.
17. Cheng, X. and R. J. Roberts (2001). "AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping." *Nucleic Acids Res.* **29**(18): 3784-3795.
18. Cline, R. E., R. M. Fink and K. Fink (1959). "Synthesis of 5-substituted pyrimidines via formaldehyde addition." *J. Am. Chem. Soc.* **81**: 2521-2527.
19. Cortellino, S., J. F. Xu, M. Sannai, R. Moore, E. Caretti, A. Cigliano, M. Le Coz, K. Devarajan, A. Wessels, D. Soprano, L. K. Abramowitz, M. S. Bartolomei, F. Rambow, M. R. Bassi, T. Bruno, M. Fanciulli, C. Renner, A. J. Klein-Szanto, Y. Matsumoto, D. Kobi, I. Davidson, C. Alberti, L. Larue and A. Bellacosa (2011). "Thymine DNA Glycosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair." *Cell* **146**(1): 67-79.
20. Dalhoff, C., G. Lukinavičius, S. Klimašauskas and E. Weinhold (2006). "Direct transfer of extended groups from synthetic cofactors by DNA methyltransferases." *Nat Chem Biol* **2**(1): 31-2.
21. Daujotytė, D., Z. Liutkevičiūtė, G. Tamulaitis and S. Klimašauskas (2008). "Chemical mapping of cytosines enzymatically flipped out of the DNA helix." *Nucleic Acids Res.* **36**(10): e57.

22. Daujotyte, D., S. Serva, G. Vilkaitis, E. Merkienė, C. Venclovas and S. Klimašauskas (2004). "HhaI DNA methyltransferase uses the protruding Gln237 for active flipping of its target cytosine." *Structure* **12**: 1047-1055.
23. Davis, T. and R. Vaisvila (2011). "High sensitivity 5-hydroxymethylcytosine detection in Balb/C brain tissue." *J Vis Exp* (48).
24. Dawlaty, M. M., K. Ganz, B. E. Powell, Y. C. Hu, S. Markoulaki, A. W. Cheng, Q. Gao, J. Kim, S. W. Choi, D. C. Page and R. Jaenisch (2011). "Tet1 Is Dispensable for Maintaining Pluripotency and Its Loss Is Compatible with Embryonic and Postnatal Development." *Cell Stem Cell* **9**(2): 166-175.
25. Dornberger, U., M. Leijon and H. Fritzsche (1999). "High Base Pair Opening Rates in Tracts of GC Base Pairs." *J Biol Chem* **274**: 6957-6962.
26. Dryden, D. T. F. (1999). Bacterial DNA Methyltransferases. S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferases: Structures and Functions. X. Cheng, Blumenthal, R. M. Singapore, World Scientific: 283-340.
27. Fauman, E. B., R. M. Blumenthal and X. Cheng (1999). Structure and evolution of AdoMet-dependent methyltransferases. S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferases: Structures and Functions. X. Cheng, Blumenthal, R. M. Singapore, World Scientific: 1-38.
28. Feng, S., S. J. Cokus, X. Zhang, P. Y. Chen, M. Bostick, M. G. Goll, J. Hetzel, J. Jain, S. H. Strauss, M. E. Halpern, C. Ukumadu, K. C. Sadler, S. Pradhan, M. Pellegrini and S. E. Jacobsen (2010). "Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(19): 8689-94.
29. Ficiz, G., M. R. Branco, S. Seisenberger, F. Santos, F. Krueger, T. A. Hore, C. J. Marques, S. Andrews and W. Reik (2011). "Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation." *Nature* **473**(7347): 398-402.
30. Flusberg, B. A., D. R. Webster, J. H. Lee, K. J. Travers, E. C. Olivares, T. A. Clark, J. Korch and S. W. Turner (2010). "Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing." *Nat Methods* **7**(6): 461-5.
31. Gerasimaitė, R., E. Merkienė and S. Klimašauskas (2011). "Direct observation of cytosine flipping and covalent catalysis in a DNA methyltransferase." *Nucleic Acids Res* **39**(9): 3771-80.
32. Ghosh, I., C. I. Stains, A. T. Ooi and D. J. Segal (2006). "Direct detection of double-stranded DNA: Molecular methods and applications for DNA diagnostics." *Mol Biosyst* **2**(11): 551-60.
33. Gider, B. and E. Weinhold (2009). Expanding the Chemical Repertoire of DNA Methyltransferases by Cofactor Engineering. DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution. H. Grosjean, Landes Bioscience: 118-127.
34. Globisch, D., M. Munzel, M. Muller, S. Michalakis, M. Wagner, S. Koch, T. Bruckl, M. Biel and T. Carell (2010). "Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates." *PLoS One* **5**(12): e15367.
35. Goll, M. G. and T. H. Bestor (2005). "Eukaryotic cytosine methyltransferases." *Annu. Rev. Biochem.* **74**: 481-514.
36. Goll, M. G., F. Kirpekar, K. A. Maggert, J. A. Yoder, C. L. Hsieh, X. Zhang, K. G. Golic, S. E. Jacobsen and T. H. Bestor (2006). "Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2." *Science* **311**: 395-8.
37. Goodman, M. F. and R. L. Ratliff (1983). "Evidence of 2-aminopurine-cytosine base mispairs involving two hydrogen bonds." *J Biol Chem* **258**(21): 12842-6.
38. Gottfried, A. and E. Weinhold (2011). "Sequence-specific covalent labelling of DNA." *Biochem Soc Trans.* **39**(2): 623-8.
39. Graves, K. L., M. M. Butler and L. W. Hardy (1992). "Roles of Cys148 and Asp179 in catalysis by deoxycytidylate hydroxymethylase from bacteriophage T4 examined by site-directed mutagenesis." *Biochemistry* **31**(42): 10315-21.
40. Guo, J. U., Y. J. Su, C. Zhong, G. L. Ming and H. J. Song (2011). "Emerging roles of TET proteins and 5-Hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond." *Cell Cycle* **10**(16): 2662-2668.
41. Guo, J. U., Y. J. Su, C. Zhong, G. L. Ming and H. J. Song (2011). "Hydroxylation of 5-Methylcytosine by TET1 Promotes Active DNA Demethylation in the Adult Brain." *Cell* **145**(3): 423-434.
42. Hamm, S., G. Just, N. Lacoste, N. Moitessier, M. Szyf and O. Mamer (2008). "On the mechanism of demethylation of 5-methylcytosine in DNA." *Bioorg Med Chem Lett* **18**(3): 1046-9.

43. He, Y. F., B. Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Y. Tang, J. P. Ding, Y. Y. Jia, Z. C. Chen, L. Li, Y. Sun, X. X. Li, Q. Dai, C. X. Song, K. L. Zhang, C. He and G. L. Xu (2011). "Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA." *Science* **333**(6047): 1303-1307.
44. Heck, H. and M. Casanova (2004). "The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: a critical review of the biological evidence on distant-site toxicity." *Regul Toxicol Pharmacol* **40**(2): 92-106.
45. Henderson, I. R., A. Deleris, W. Wong, X. Zhong, H. G. Chin, G. A. Horwitz, K. A. Kelly, S. Pradhan and S. E. Jacobsen (2010). "The de novo cytosine methyltransferase DRM2 requires intact UBA domains and a catalytically mutated paralog DRM3 during RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*." *PLoS Genet* **6**(10): e1001182.
46. Hermann, A., S. Schmitt and A. Jeltsch (2003). "The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity." *J. of Biol. Chem.* **278**(34): 31717-31721.
47. Holz, B., S. Klimašauskas, S. Serva and E. Weinhold (1998). "2-Amino purine as a fluorescence probe for DNA base flipping by methyltransferases." *Nucleic Acids Res.* **26**(4): 1076-1083.
48. Hotchkiss, R. (1948). "The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography." *J Biol Chem* **175**(1): 315-32.
49. Huang, Y., W. A. Pastor, Y. Shen, M. Tahiliani, D. R. Liu and A. Rao (2010). "The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing." *PLoS One* **5**(1): e8888.
50. Huang, N., N. K. Banavali and A. D. MacKerell, Jr. (2003). "Protein-facilitated base flipping in DNA by cytosine-5-methyltransferase." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100**(1): 68-73.
51. Iyer, L. M., S. Abhiman and L. Aravind (2011). Natural History of Eukaryotic DNA Methylation Systems. Modifications of Nuclear DNA and its Regulatory Proteins. X. Cheng and R. M. Blumenthal, Academic Pr. **101**: 25-104.
52. Iyer, L. M., M. Tahiliani, A. Rao and L. Aravind (2009). "Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids." *Cell Cycle* **8**(11): 1698-710.
53. Iqbal, K., S. G. Jin, G. P. Pfeifer and P. E. Szabo (2011). "Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
54. Ito, S., A. C. D'Alessio, O. V. Taranova, K. Hong, L. C. Sowers and Y. Zhang (2010). "Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification." *Nature* **466**(7310): 1129-33.
55. Ito, S., L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He and Y. Zhang (2011). "Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine." *Science* **333**(6047): 1300-1303.
56. Jeltsch, A. (2010). "Molecular biology. Phylogeny of methylomes." *Science* **328**(5980): 837-8.
57. Jin, S. G., Y. Jiang, R. Qiu, T. A. Rauch, Y. Wang, G. Schackert, D. Krex, Q. Lu and G. P. Pfeifer (2011). "5-hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations." *Cancer Res.*
58. Jin, S. G., S. Kadam and G. P. Pfeifer (2010). "Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine." *Nucleic Acids Res* **38**(11): e125.
59. Jin, S. G., X. Wu, A. X. Li and G. P. Pfeifer (2011). "Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain." *Nucleic Acids Res.*
60. Jurkowska, R. Z., T. P. Jurkowski and A. Jeltsch (2010). "Structure and function of mammalian DNA methyltransferases." *Chembiochem* **12**(2): 206-22.
61. Juskowiak, B. (2010). "Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential." *Anal Bioanal Chem.* **399**(9):3157-76.
62. Klimašauskas, S., S. Kumar, R. J. Roberts and X. Cheng (1994). "HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix." *Cell* **76**: 357-369.
63. Klimašauskas, S. and Z. Liutkevičiūtė (2009). Experimental approaches to study DNA base flipping. DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution. H. Grosjean, Landes Bioscience: 19-32.
64. Klimašauskas, S. and R. J. Roberts (1995). "M.HhaI binds tightly to substrates containing mismatches at the target base." *Nucleic Acids Res.* **23**: 1388-1395.

65. Klimašauskas, S., T. Szyperski, S. Serva and K. Wuethrich (1998). "Dynamic modes of the flipped-out cytosine during *HhaI* methyltransferase-DNA interactions in solution." *EMBO J.* **17**(1): 317-324.
66. Ko, M., H. S. Bandukwala, J. An, E. D. Lamperti, E. C. Thompson, R. Hastie, A. Tsangaratou, K. Rajewsky, S. B. Koralov and A. Rao (2011). "Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(35): 14566-14571.
67. Ko, M., Y. Huang, A. M. Jankowska, U. J. Pape, M. Tahiliani, H. S. Bandukwala, J. An, E. D. Lamperti, K. P. Koh, R. Ganetzky, X. S. Liu, L. Aravind, S. Agarwal, J. P. Maciejewski and A. Rao (2010). "Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2." *Nature* **468**(7325): 839-43.
68. Kobayashi, I. (2001). "Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution." *Nucleic Acids Res* **29**(18): 3742-56.
69. Koh, K. P., A. Yabuuchi, S. Rao, Y. Huang, K. Cunniff, J. Nardone, A. Laiho, M. Tahiliani, C. A. Sommer, G. Mostoslavsky, R. Lahesmaa, S. H. Orkin, S. J. Rodig, G. Q. Daley and A. Rao (2011). "Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells." *Cell Stem Cell* **8**(2): 200-13.
70. Kohwi-Shigematsu, K. and Y. Kohwi (1992). Detection of non-B-DNA structures at specific sites in supercoiled plasmid DNA and chromatin with haloacetaldehyde and diethyl pyrocarbonate. *Methods Enzymology*. D. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg. San Diego, Academic Press, INC. **212**: 155-180.
71. Kriaucionis, S. and N. Heintz (2009). "The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain." *Science* **324**(5929): 929-30.
72. Krosky, D. J., F. Song and J. T. Stivers (2005). "The origins of high-affinity enzyme binding to an extrahelical DNA base." *Biochemistry* **44**(16): 5949-59.
73. Krzyzosiak, W. J., J. Biernat, J. Ciesiolka, K. Gulewicz and M. Wiewiorowski (1981). "The reactions of adenine and cytosine residues in tRNA with chloroacetaldehyde." *Nucleic Acids Res.* **9**(12): 2841-2851.
74. Kuchino Y., N., Hanyu and S. Nishimura (1987). "Analysis of modified nucleosides and nucleotide sequence of tRNA." *Methods Enzymol.* 1987;155:379-96.
75. Kumar, S., X. Cheng, S. Klimašauskas, S. Mi, J. Posfai, R. J. Roberts and G. G. Wilson (1994). "The DNA (cytosine-5) methyltransferases." *Nucleic Acids Res.* **22**: 1-10.
76. Kusmierek, J. T. and B. Singer (1982). "Chloroacetaldehyde-treated ribo- and deoxyribopolynucleotides. 1. Reaction products." *Biochemistry* **21**(22): 5717-5722.
77. LaFrancois, C. J., J. Fujimoto and L. C. Sowers (1998). "Synthesis and characterization of isotopically enriched pyrimidine deoxynucleoside oxidation damage products." *Chem Res Toxicol* **11**(1): 75-83.
78. Lau, E. Y. and T. C. Bruice (1999). "Active site dynamics of the *HhaI* methyltransferase: insights from computer simulation." *J. Mol. Biol.* **293**: 9-18.
79. Law, J. A. and S. E. Jacobsen (2010). "Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals." *Nat Rev Genet* **11**(3): 204-220.
80. Law, S. M., R. Eritja, M. F. Goodman and K. J. Breslauer (1996). "Spectroscopic and calorimetric characterizations of DNA duplexes containing 2-aminopurine." *Biochemistry* **35**: 12329-12337.
81. Lehman, I. R. and E. A. Pratt (1960). "On the structure of the glucosylated hydroxymethylcytosine nucleotides of coliphages T2, T4, and T6." *J Biol Chem* **235**: 3254-9.
82. Li, W. and M. Liu (2011). "Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues." *J Nucleic Acids* **2011**: 1-5.
83. Liutkevičiūtė, Z., E. Kriukiene, I. Grigaityte, V. Masevicius and S. Klimašauskas (2011). "Methyltransferase-Directed Derivatization of 5-Hydroxymethylcytosine in DNA." *Angewandte Chemie-International Edition* **50**(9): 2090-2093.
84. Liutkevičiūtė, Z., G. Lukinavičius, V. Masevicius, D. Daujotyte and S. Klimašauskas (2009). "Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA." *Nat Chem Biol* **5**(6): 400-2.
85. Lukinavičius, G., V. Lapiene, Z. Stasevskij, C. Dalhoff, E. Weinhold and S. Klimašauskas (2007). "Targeted labeling of DNA by methyltransferase-directed transfer of activated groups (mTAG)." *J Am Chem Soc* **129**(10): 2758-9.
86. Lunt, M. R. and E. A. Newton (1965). "Glucosylated Nucleotide Sequences from T-Even Bacteriophage Deoxyribonucleic Acids." *Biochem J* **95**: 717-23.

87. Maiti, A. and A. Drohat (2011). "Thymine DNA Glycosylase Can Rapidly Excise 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR ACTIVE DEMETHYLATION OF CpG SITES." *J. Biol. Chem.* **286**(41): 35334-8.
88. Marinus, M. G. and J. Casades (2009). "Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more." *FEMS Microbiol Rev* **33**(3): 488-503.
89. McLean, M. J., J. E. Larson, F. Wohlrab and R. D. Wells (1987). "Reaction conditions affect the specificity of bromoacetaldehyde as a probe for DNA cruciforms and B-Z junctions." *Nucleic Acids Res.* **15**(17): 6917-6935.
90. Mees, A., T. P. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. Eker, T. Carell and L. O. Essen (2004). "Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair." *Science*; **306**(5702):1789-1793.
91. Meyer, P. (2011). "DNA methylation systems and targets in plants." *FEBS Lett* **585**(13): 2008-15.
92. Merkienė, E. and S. Klimašauskas (2005). "Probing a rate-limiting step by mutational perturbation of AdoMet binding in the HhaI methyltransferase." *Nucleic Acids Res.* **33**: 307-315.
93. Mernagh, D. R. and G. G. Kneale (1996). "High resolution footprinting of a type I methyltransferase reveals a large structural distortion within the DNA recognition site." *Nucleic Acids Res* **24**(24): 4853-8.
94. Metivier, R., R. Gallais, C. Tiffocche, C. Le Peron, R. Z. Jurkowska, R. P. Carmouche, D. Ibberson, P. Barath, F. Demay, G. Reid, V. Benes, A. Jeltsch, F. Gannon and G. Salbert (2008). "Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter." *Nature* **452**(7183): 45-U2.
95. Mi, S. and R. J. Roberts (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.
96. Mohr, F., K. Dohner, C. Buske and V. P. Rawat (2011). "TET Genes: new players in DNA demethylation and important determinants for stemness." *Exp Hematol* **39**(3): 272-81.
97. Munzel, M., D. Globisch, T. Bruckl, M. Wagner, V. Welzmler, S. Michalakis, M. Muller, M. Biel and T. Carell (2010). "Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain." *Angew Chem Int Ed Engl* **49**(31): 5375-7.
98. Munzel, M., D. Globisch and T. Carell (2011). "5-Hydroxymethylcytosine, the Sixth Base of the Genome." *Angewandte Chemie-International Edition* **50**(29): 6460-6468.
99. Munzel, M., D. Globisch, C. Trindler and T. Carell (2010). "Efficient Synthesis of 5-Hydroxymethylcytosine Containing DNA." *Organic Letters* **12**(24): 5671-5673.
100. Nabel, C., S. Manning and R. Kohli (2011). "The Curious Chemical Biology of Cytosine: Deamination, Methylation and Oxidation as Modulators of Genomic Potential." *ACS Chem. Biol.*
101. Neely, R., P. Dedecker, J. Hotta, G. Urbanavičiūtė, S. Klimašauskas and J. Hofkens (2010). "DNA fluorocode: A single molecule, optical map of DNA with nanometre resolution." *Chem. Sci.* **1**: 453-460.
102. Neely, R. K., D. Daujotytė, S. Gražulis, S. W. Magennis, D. T. Dryden, S. Klimašauskas and A. C. Jones (2005). "Time-resolved fluorescence of 2-aminopurine as a probe of base flipping in M.HhaI-DNA complexes." *Nucleic Acids Res.* **33**(22): 6953-60.
103. Neely, R. K., J. Deen and J. Hofkens (2011). "Optical mapping of DNA: Single-molecule-based methods for mapping genomes." *Biopolymers.*
104. Nestor, C., A. Ruzov, R. Meehan and D. Dunican (2010). "Enzymatic approaches and bisulfite sequencing cannot distinguish between 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in DNA." *Biotechniques* **48**(4): 317-9.
105. O'Gara, M., S. Klimašauskas, R. J. Roberts and X. Cheng (1996). "Enzymatic C5-cytosine methylation of DNA: Mechanistic implications of new crystal structures for HhaI methyltransferase-DNA-AdoHcy complexes." *J. Mol. Biol.* **261**: 634-645.
106. Okamoto, A., K. Sugizaki, A. Nakamura, H. Yanagisawa and S. Ikeda (2011). "5-Hydroxymethylcytosine-selective oxidation with peroxotungstate." *Chem. Commun. (Camb)*. **47**(40): 11231-3.
107. Pastor, W. A., U. J. Pape, Y. Huang, H. R. Henderson, R. Lister, M. Ko, E. M. McLoughlin, Y. Brudno, S. Mahapatra, P. Kapranov, M. Tahiliani, G. Q. Daley, X. S. Liu, J. R. Ecker, P. M. Milos, S. Agarwal and A. Rao (2011). "Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells." *Nature* **473**(7347): 394-7.

108. Penn, N. W. (1976). "Modification of brain deoxyribonucleic acid base content with maturation in normal and malnourished rats." *Biochem J* **155**(3): 709-12.
109. Penn, N. W., R. Suwalski, C. O'Riley, K. Bojanowski and R. Yura (1972). "The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid." *Biochem J* **126**(4): 781-90.
110. 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. Am. Chem. Soc.* **120**: 12895-12902.
111. Pfaffeneder, T., B. Hackner, M. Truss, M. Munzel, M. Muller, C. A. Deiml, C. Hagemeyer and T. Carell (2011). "The Discovery of 5-Formylcytosine in Embryonic Stem Cell DNA." *Angewandte Chemie-International Edition* **50**(31): 7008-7012.
112. Pieper, U., D. H. Groll, S. Wunsch, F. U. Gast, C. Speck, N. Mucke and A. Pingoud (2002). "The GTP-dependent restriction enzyme McrBC from *Escherichia coli* forms high-molecular mass complexes with DNA and produces a cleavage pattern with a characteristic 10-base pair repeat." *Biochemistry* **41**(16): 5245-54.
113. Pignot, M., G. Pljevaljcic and E. Weinhold (2000). "Efficient synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine natural product analogues and their use to elucidate the structural determinant for cofactor binding of the DNA methyltransferase M.HhaI." *Eur. J. Org. Chem.* 549-555.
114. Pingoud V., C. Conzelmann, S. Kinzebach, A. Sudina, V. Metelev, E. Kubareva, J. M. Bujnicki, R. Lurz, G. Luder, S. Y. Xu and A. Pingoud. (2003). "PspGI, a type II restriction endonuclease from the extreme thermophile *Pyrococcus* sp.: structural and functional studies to investigate an evolutionary relationship with several mesophilic restriction enzymes." *J. Mol. Biol.* **329**:913-29.
115. Pljevaljcic, G., F. Schmidt, A. Peschlow and E. Weinhold (2004). "Sequence-specific DNA labeling using methyltransferases." *Methods Mol Biol* **283**: 145-61.
116. Priyakumar, U. D. and A. D. J. MacKerell (2006). "Computational approaches for investigating base flipping in oligonucleotides." *Chem. Rev.* **106**: 489-505.
117. Privat, E. and L. C. Sowers (1996). "Photochemical Deamination and Demethylation of 5-Methylcytosine." *Chem. Res. Toxicol.* **9**(4): 745-750.
118. Proffitt, J. H., J. R. Davie, D. Swington and S. Hattman (1984). "5-methylcytosine is not detectable in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol. Cell. Biol.* **4**: 985-988.
119. Ramchandani, S., S. K. Bhattacharya, N. Cervoni and M. Szyf (1999). "DNA methylation is a reversible biological signal." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(11): 6107-12.
120. Razin, A. and A. Riggs (1980). "DNA Methylation and Gene Function." *Science* **210**(4470): 604-10.
121. Robertson, A. B., J. A. Dahl, C. B. Vagbo, P. Tripathi, H. E. Krokan and A. Klungland (2011). "A novel method for the efficient and selective identification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA." *Nucleic Acids Res.*
122. Robertson, K. D. (2005). "DNA methylation and human disease." *Nature Genet.* **6**: 597-610.
123. Robertson, K. D. and A. P. Wolffe (2000). "DNA methylation in health and disease." *Nature Genetics* **1**: 11-19.
124. Rottach, A., H. Leonhardt and F. Spada (2009). "DNA methylation-mediated epigenetic control." *J Cell Biochem* **108**(1): 43-51.
125. Sabatini, R., L. Cliffe, S. Vainio and P. Borst (2009). Enzymatic formation of the hypermodified DNA base J (beta-D-glucopyranosylloxymethyluracil). *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution*. H. Grosjean. Austin, Texas, Landes Bioscience: 144-153.
126. Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
127. Sankpal, U. T. and D. N. Rao (2002). "Structure, function, and mechanism of HhaI DNA methyltransferases." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**(3): 167-97.
128. Schaefer, M. and F. Lyko (2010). "Solving the Dnmt2 enigma." *Chromosoma* **119**(1): 35-40.
129. Schulz, W. A. and O. Y. Dokun (2009). DNA Methylation and Human Diseases: An Overview. *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution*. H. Grosjean. Austin, Texas, Landes Bioscience: 103-112.
130. Sedgwick, B., P. A. Bates, J. Paik, S. C. Jacobs and T. Lindahl (2007). "Repair of alkylated DNA: recent advances." *DNA Repair (Amst)* **6**(4): 429-42.
131. Serva, S., E. Weinhold, R. J. Roberts and S. Klimašauskas (1998). "Chemical display of thymine residues flipped out by DNA methyltransferases." *Nucleic Acids Res.* **26**(15): 3473-3479.

132. Shiau, G. T., R. F. Schinazi, M. S. Chen and W. H. Prusoff (1980). "Synthesis and biological activities of 5-(hydroxymethyl, azidomethyl, or aminomethyl)-2'-deoxyuridine and related 5'-substituted analogues." *J Med Chem* **23**(2): 127-33.
133. Shieh, F. K., B. Youngblood and N. O. Reich (2006). "The role of Arg165 towards base flipping, base stabilization and catalysis in M.HhaI." *J Mol Biol* **362**(3): 516-27.
134. Shieh, F. K. and N. O. Reich (2007). "AdoMet-dependent methyl-transfer: Glu119 is essential for DNA C5-cytosine methyltransferase M.HhaI." *J Mol Biol* **373**(5): 1157-68.
135. Shock, L. S., P. V. Thakkar, E. J. Peterson, R. G. Moran and S. M. Taylor (2011). "DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
136. Sokolowska, M., M. Kaus-Drobek, H. Czapinska, G. Tamulaitis, R. H. Szczepanowski, C. Urbanke, V. Šikšnys and M. Bochtler (2007). "Monomeric restriction endonuclease BcnI in the apo form and in an asymmetric complex with target DNA." *J. Mol Biol.* **369**(3): 722-34.
137. Solomon, M. J. and A. Varshavsky (1985). "Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(19): 6470-4.
- 138.a) Song, C. X., T. A. Clark, X. Y. Lu, A. Kislyuk, Q. Dai, S. W. Turner, C. He and J. Korlach (2011). "Sensitive and specific single-molecule sequencing of 5-hydroxymethylcytosine." *Nat Methods*.
- 138.b) Song, C. X., Y. Sun, Q. Dai, X. Y. Lu, M. Yu, C. G. Yang and C. He (2011). "Detection of 5-Hydroxymethylcytosine in DNA by Transferring a Keto-Glucose by Using T4 Phage beta-Glucosyltransferase." *Chembiochem* **12**(11): 1682-1685.
140. Song, C. X. and C. He (2011). "Bioorthogonal Labeling of 5-Hydroxymethylcytosine in Genomic DNA and Diazirine-Based DNA Photo-Cross-Linking Probes." *Acc Chem Res* **44**(9): 709-17.
- 141.a) Song, C. X., K. E. Szulwach, Y. Fu, Q. Dai, C. Yi, X. Li, Y. Li, C. H. Chen, W. Zhang, X. Jian, J. Wang, L. Zhang, T. J. Looney, B. Zhang, L. A. Godley, L. M. Hicks, B. T. Lahn, P. Jin and C. He (2010). "Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine." *Nat Biotechnol* **29**(1): 68-72.
- 142.b) Song, J., O. Rechko, T. H. Bestor and D. J. Patel (2010). "Structure of DNMT1-DNA Complex Reveals a Role for Autoinhibition in Maintenance DNA Methylation." *Science* **331**(6020):1036-40.
143. Song, H. K., S. H. Sohn and S. W. Suh (1999). "Crystal structure of deoxycytidylate hydroxymethylase from bacteriophage T4, a component of the deoxyribonucleoside triphosphate-synthesizing complex." *Embo J* **18**(5): 1104-13
144. Stecher, H., M. Tengg, B. J. Ueberbacher, P. Remler, H. Schwab, H. Griengl and M. Gruber-Khadjawi (2009). "Biocatalytic Friedel-Crafts Alkylation Using Non-natural Cofactors." *Angewandte Chemie-International Edition* **48**(50): 9546-9548.
145. Szczepanowski R. H., M. A. Carpenter, H. Czapinska, M. Zaremba, G. Tamulaitis, V. Šikšnys, A. S. Bhagwat and M. Bochtler (2008). "Central base pair flipping and discrimination by PspGI". *Nucleic Acids Res.* **36**:6109-17
146. Szulwach, K. E., X. Li, Y. Li, C. X. Song, H. Wu, Q. Dai, H. Irier, A. K. Upadhyay, M. Gearing, A. I. Levey, A. Vasanthakumar, L. A. Godley, Q. Chang, X. Cheng, C. He and P. Jin (2011). "5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging." *Nature Neuroscience*.
147. Szwagierczak, A., A. Brachmann, C. S. Schmidt, S. Bultmann, H. Leonhardt and F. Spada (2011). "Characterization of PvuRts1I endonuclease as a tool to investigate genomic 5-hydroxymethylcytosine." *Nucleic Acids Res.*
148. Szwagierczak, A., S. Bultmann, C. S. Schmidt, F. Spada and H. Leonhardt (2010). "Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA." *Nucleic Acids Res* **38**(19): e181.
149. Tahiliani, M., K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind and A. Rao (2009). "Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1." *Science* **324**(5929): 930-5.
150. Tamulaitis G., A. S. Solonin and V. Šikšnys (2002). "Alternative arrangements of catalytic residues at the active sites of restriction enzymes". *FEBS Lett.* **518**: 17-22.
151. Tamulaitis, G., M. Zaremba, R. H. Szczepanowski, M. Bochtler and V. Šikšnys (2008). "How PspGI, catalytic domain of EcoRII and Ecl18kI acquire specificities for different DNA targets." *Nucleic Acids Res.* **36**:6101-8

152. Tamulaitis, G., M. Zaremba, R. H. Szczepanowski, M. Bochtler and V. Šikšnys (2007). "Nucleotide flipping by restriction enzymes analyzed by 2-aminopurine steady-state fluorescence." *Nucleic Acids Res.* **35**(14): 4792-9.
153. Tardy-Planechaud, S., J. Fujimoto, S. S. Lin and L. C. Sowers (1997). "Solid phase synthesis and restriction endonuclease cleavage of oligodeoxynucleotides containing 5-(hydroxymethyl)-cytosine." *Nucleic Acids Res* **25**(3): 553-9.
154. Timinskas, A., V. Butkus and A. Janulaitis (1995). "Sequence motifs characteristic for DNA [cytosine-N4] and DNA [adenine-N6] methyltransferases. Classification of all DNA methyltransferases." *Gene* **157**(1-2): 3-11.
155. Torizawa, T., T. Ueda, S. Kuramitsu, K. Hitomi, T. Todo, S. Iwai, K. Morikawa and I. Shimada (2004). "Investigation of the cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase DNA recognition mechanism by NMR analyses." *J Biol Chem* **279**(31): 32950-6.
156. Trautner, T. A., B. Pawlek, B. Behrens and J. Willert (1996). "Exact size and organization of DNA target-recognizing domain of multispecific DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases." *EMBO J.* **15**: 1434-1442.
157. Valinluck, V. and L. C. Sowers (2007). "Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1." *Cancer Res* **67**(3): 946-50.
158. Valinluck, V., H. H. Tsai, D. K. Rogstad, A. Burdzy, A. Bird and L. C. Sowers (2004). "Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2)." *Nucleic Acids Res* **32**(14): 4100-8.
159. Vilkaitis, G., A. Dong, E. Weinhold, X. Cheng and S. Klimašauskas (2000). "Functional roles of the conserved threonine 250 in the target recognition domain of HhaI DNA methyltransferase." *J. Biol. Chem.* **275**(49): 38722-38730.
160. Vilkaitis, G., E. Merkienė, S. Serva, E. Weinhold and S. Klimašauskas (2001). "The mechanism of DNA cytosine-5 methylation." *J. Biol. Chem.* **276**(24): 20924-20934.
161. Vilkaitis, G., I. Suetake, S. Klimašauskas and S. Tajima (2005). "Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase." *J. Biol. Chem.* **280**: 64-72.
162. Wallace, E. V., D. Stoddart, A. J. Heron, E. Mikhailova, G. Maglia, T. J. Donohoe and H. Bayley (2010). "Identification of epigenetic DNA modifications with a protein nanopore." *Chem Commun (Camb)* **46**(43): 8195-7.
163. Wang, H., S. Guan, A. Quimby, D. Cohen-Karni, S. Pradhan, G. Wilson, R. Roberts, Z. Zhu and Y. Zheng (2011). "Comparative characterization of the PvuRtsII family of restriction enzymes and their application in mapping genomic 5-hydroxymethylcytosine." *Nucl. Acids Res.*: 1-12.
164. Wang, M., G. Cheng, P. W. Villalta and S. S. Hecht (2007). "Development of liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry methods for analysis of DNA adducts of formaldehyde and their application to rats treated with N-nitrosodimethylamine or 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone." *Chem Res Toxicol* **20**(8): 1141-8.
165. Wanunu, M., D. Cohen-Karni, R. R. Johnson, L. Fields, J. Benner, N. Peterman, Y. Zheng, M. L. Klein and M. Drndic (2010). "Discrimination of Methylcytosine from Hydroxymethylcytosine in DNA Molecules." *J Am Chem Soc.*
166. Warren, R. A. (1980). "Modified bases in bacteriophage DNAs." *Annu Rev Microbiol* **34**: 137-58.
167. Watson, J. and F. Crick (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid." *Nature* **171**(4356): 737-8.
168. Wessjohann, L. A., A. Schneider, M. Abbas and W. Brandt (2007). "Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur." *Biol Chem* **388**(10): 997-1006.
169. Wion, D. and J. Casades (2006). "N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions." *Nat Rev Microbiol* **4**(3): 183-92.
170. Wyatt, G. R. and S. S. Cohen (1953). "The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine." *Biochem J* **55**(5): 774-82.
171. Woo, J., R. B. Meyer, Jr. and H. B. Gamper (1996). "G/C-modified oligodeoxynucleotides with selective complementarity: synthesis and hybridization properties." *Nucleic Acids Res* **24**(13): 2470-5.

172. Wossidlo, M., T. Nakamura, K. Lepikhov, C. J. Marques, V. Zakhartchenko, M. Boiani, J. Arand, T. Nakano, W. Reik and J. Walter (2011). "5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming." *Nat Commun* **2**: 241.
173. Wu, H. and Y. Zhang (2011). "Tet1 and 5-hydroxymethylation: A genome-wide view in mouse embryonic stem cells." *Cell Cycle* **10**(15): 2428-2436.
174. Wu, J. C. and D. V. Santi (1987). "Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase." *J. Biol. Chem.* **262**(10): 4778-4786.
175. Wu, S. C. and Y. Zhang (2010). "Active DNA demethylation: many roads lead to Rome." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 607-20.
176. Zangi, R., A. Arrieta and F. P. Cossio (2010). "Mechanism of DNA methylation: the double role of DNA as a substrate and as a cofactor." *J. Mol. Biol.* **400**: 632-644.
177. Zemach, A., I. E. McDaniel, P. Silva and D. Zilberman (2010). "Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation." *Science* **328**(5980): 916-9.
178. Zhang, C., R. L. Weller, J. S. Thorson and S. R. Rajsiki (2006). "Natural product diversification using a non-natural cofactor analogue of S-adenosyl-L-methionine." *J Am Chem Soc* **128**(9): 2760-1.
179. Zhang, M., J. N. Kimatu, K. Xu and B. Liu (2010). "DNA cytosine methylation in plant development." *J Genet Genomics* **37**(1): 1-12.
180. Zheng, Y., D. Cohen-Karni, D. Xu, H. G. Chin, G. Wilson, S. Pradhan and R. J. Roberts (2010). "A unique family of Mrr-like modification-dependent restriction endonucleases." *Nucleic Acids Res* **38**(16): 5527-34.
181. Zohar, H. and S. J. Muller (2011). "Labeling DNA for single-molecule experiments: methods of labeling internal specific sequences on double-stranded DNA." *Nanoscale* **3**(8): 3027-3039.