

(19)



(10) **LT 5706 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **5706** (51) Int. Cl. (2006): **C07H 21/00**
C12Q 1/48
C12Q 1/68
- (21) Paraiškos numeris: **2009 032**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2009 05 08**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2010 11 25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2011 01 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:
Saulius KLIMAŠAUSKAS, LT
Zita LIUTKEVIČIŪTĖ, LT
Edita Kriukienė, LT
- (73) Patento savininkas:
BIOTECHNOLOGIJOS INSTITUTAS, V. Graičiūno g. 8, LT-02241 Vilnius, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Liudmila GERASIMOVIČ, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis”,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Alfa-hidroksialkilintų liekanų konversija biomolekulėse, naudojant metiltransferazes

- (57) Referatas:

Šis išradimas apima alfa-hidroksialkilintų liekanų biomolekulėje tikslią konversiją veikiant nukreipiančiajai metiltransferazei, būtent metiltransferazės taikiniuose esančių alfa-hidroksialkilo grupių pašalinimą, susidarant nemodifikuotoms liekanoms arba alfa-hidroksialkilintų grupių modifikuotose liekanose derivatizaciją, kovalentiškai prijungiant nekofaktorinius junginius, kurių formulė HQ-LX, kur X žymi funkcinę grupę arba reporterinę grupę, prijungtą per jungtuką L, ir QH yra parinktas iš HS-, HSe-, HO- H2N-, HN3 arba HCN ir veikiant nukreipiančiajai metiltransferazei. Tolimesnis modifikuotų liekanų konversijos vystymas apima biomolekulės tikslio žymėjimo būdą ir hidroksimetilintų liekanų biomolekulėje nustatymo (aptikimo) būdą pagal šį išradimą.

Išradimo sritis

5 Šis išradimas susijęs su metiltransferazių orientuojama sekai specifine kovalentine alfa-hidroksialkilintų liekanų modifikuotoje biomolekulėje konversija, būtent, išradimas apima i) metiltransferazės orientuojamą alfa-hidroksialkilintų grupių pašalinimą, susidarant nemodifikuotoms liekanoms ir ii) metiltransferazės orientuojamą alfa-hidroksialkilintų grupių derivatizaciją, prijungiant nekofaktorinius nukleofilinius junginius minėtoje
10 modifikuotoje biomolekulėje.

Tiksliau, šis išradimas apima alfa-hidroksialkilintų liekanų biomolekulėje tikslinės konversijos būdą, o taip pat alfa-hidroksialkilintų liekanų biomolekulėje tikslinio žymėjimo būdą; alfa-hidroksialkilintų taikinių biomolekulėje nustatymo (aptikimo) būdą ir
15 rinkinį, skirtą šiems būdams atlikti. Visus išradimo objektus jungia alfa-hidroksialkilintų liekanų konversijos idėja, panaudojant kofaktoriaus neturinčią metiltransferazę.

Šis išradimas yra paremtas pavyzdžiais, naudojant DNR metiltransferazes (MTazes). Tačiau jis gali būti naudojamas su RNR metiltransferazėmis, arba metiltransferazėmis,
20 kurių substratai yra kitos biomolekulės.

Šiame aprašyme terminas „metiltransferazė“ apibūdina fermentus, kurie paprastai perneša metilo grupę nuo S-adenozil-L-metionino (AdoMet) ant savo substratų. Metiltransferazė yra fermentas, kuris geba metilinti DNR, RNR ar (poli)peptidus.
25 Tiksliau, metiltransferazė yra DNR citozino-5 metiltransferazė, kuri, naudodama kovalentino aktyvavimo mechanizmą, perneša metilo grupę ant taikinio citozino C5 atomo. Dar tiksliau, metiltransferazė yra pasirinkta iš M.HhaI, M.SssI, M.HpaII, M.AluI arba jų darinių. Terminas „M.HhaI“ nurodo DNR metiltransferazę, patalpintą Swissprot duomenų bazėje ir turinčią deponavimo numerį P05102. Visos šiame išradime

panaudotos MTazės yra neturinčios kofaktoriaus, t.y. MTazių preparatai turi mažiau nei 2 mol.% surišto endogeninio kofaktoriaus AdoMet.

Terminas „biomolekulė“ reiškia DNR, RNR arba (poli)peptidą. Terminas „(poli)peptidas“ nurodo peptidą arba polipeptidą. Tiksliau, biomolekulė yra chromosominė arba genomine DNR. Biomolekulės gali būti visiškai natūralios (t. y. nemodifikuotos), sintetinės arba modifikuotos ir gali egzistuoti kaip kompleksai. Pavyzdžiui terminas „nukleorūgščių molekulė“ apima DNR ir RNR molekules arba RNR/DNR hibridus bei modifikuotas DNR ir RNR molekules. DNR gali būti cDNR ar genomine DNR. RNR gali būti, pavyzdžiui, mRNR, hnRNR, tRNR, rRNR ir t.t.

Terminas "modifikuota biomolekulė" reiškia biomolekulę, kuri turi modifikuotų liekanų. Modifikuotos liekanos yra tos, kurios turi papildomų modifikuojančių cheminių grupių (modifikuojančių šoninių grandinių), lyginant su įprastais biomolekulių pagrindiniais komponentais. DNR normaliai susideda iš keturių pagrindinių nemodifikuotų liekanų (C, T, A, G), nors tam tikra C ir A liekanų dalis yra randama modifikuota ir natūralioje DNR. Tokios modifikacijos dažniausiai atsiranda dėl viduląstelių fermentų veiklos (žiūrėti žemiau).

Terminas "modifikuotos liekanos konversija" reiškia arba modifikuojančios grupės pašalinimą, susidarant nemodifikuotai liekanai, arba tolimesnę šios modifikuojančios grupės derivatizaciją (cheminį prailginimą), susidarant derivatizuotai liekanai.

Terminas "pašalinimas" reiškia cheminį junginio skilimą, suardant stabilią kovalentinę jungtį (tokią kaip C-C arba N-C), susidarant nemodifikuotai liekanai ir mažai molekulei, dažniausiai aldehidui.

Terminas "derivatizacija" reiškia biomolekulės prailginimą, prijungiant cheminių junginių fragmentus, pavyzdžiui, anglies grandines, chemiškai aktyvias grupes arba reporterines

grupės, prie biomolekulės, pavyzdžiui DNR, kitais atžvilgiais nepakeičiant taikinio biomolekulės.

Terminas „prijungimas“ reiškia cheminį junginių prijungimą, susidarant stabiliam kovalentiniam ryšiui (pavyzdžiui C-C ryšys, C-O ryšys, C-S ryšys, C-Se ryšys arba C-N ryšys). Prijungimo reakcija gali būti viso egzogeninio junginio prijungimas prie taikinio biomolekulės arba jo kondensacija, kai biomolekulės taikinio hidroksilo grupė yra pakeičiama visa egzogeninio junginio molekule, atskylant vandens molekulei.

10 Išradimo technikos lygis

Daugumos gyvų organizmų DNR be tradicinių keturių nukleobazių (C, A, G ir T) dar randami nedideli kiekiai metilintų nukleobazių: 5-metilcitozino (5mC), N4-metilcitozino ir N6-metiladenino. Šie metilinti nukleozidai atsiranda dėka fermentų DNR metiltransferazių (MTazių), kurios katalizuoja aktyvuotos metilo grupės pernašą nuo kofaktoriaus S-adenozil-L-metionino (AdoMet) ant DNR atpažinimo sekose, susidarant prieš tai paminėtiems metilintiems nukleotidams (Cheng, (1995) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24, 293-318). Nustatyta, kad DNR metilinimas yra svarbus biologinis mechanizmas, reguliuojantis genų raišką stuburiniuose gyvūnuose, įskaitant žmogų (Bird, (2002) *Genes Dev.* 16, 6-21), Goll, M.G. & Bestor, T.H. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 481-514 (2005). Bakterijose DNR metilinimas yra specifinis rūšiai. Genominė DNR kartais turi 5-hidroksimetilintų pirimidino nukleobazių 5-hidroksimetilcitozino ir 5-hidroksimetiluracilo (hmC ir hmU) (Gommers-Ampt, J.H. & Borst, P. (1995) *FASEB J.* 9, 1034–1042).

25

Tam tikrų bakteriofagų ir Afrikinės tripanosomos 5-hidroksimetilo grupių glikozilinimas apsaugo šių parazitų genomą nuo šeimininko apsauginių sistemų. Anksčiau hmC buvo aptiktas ir gyvūnų smegenų DNR (Penn ir kt., (1972) *Biochem. J.* 126, 781-790). Paskutiniai žmogaus neuronų ir smegenų (Kriaucionis, S. & Heintz, N. *Science* publikuota Internetu, doi:10.1126/science.1169786) bei pelės embrioninių kamieninių

30

ląstelių (Tahiliani, M. ir kt. *Science* publikuota internete, doi:10.1126/science.1170116) DNR tyrimai parodė, kad hmC radikalas yra CG sekose, ir jie atsiranda greičiausiai dėl mC radikalo oksidacijos. DNR 5-hidroksimetilo grupės gali įtakoti ląstelės baltymų, kurie dalyvauja genų aktyvumo epigenetinėje kontrolėje, sąveiką su DNR (Valinluck, V. ir kt., 5 (2004) *Nucleic Acids Res.* 32, 4100–4108), o didesni hmU kiekiai DNR koreliuoja su padidėjusiu krūties vėžio dažniu (Djuric, Z. ir kt., (1996) *Cancer* 77, 691–696). Aukščiau paminėtų faktų visuma iškelia prielaidą, kad 5-hidroksimetilintos nukleobazės, o ypač hmC, gali dalyvauti svarbiuose biologiniuose procesuose, pavyzdžiui embrioniniame vystyme, smegenų funkcijos užtikrinime, vėžio genezėje. Tačiau nei hmC lokalizacija 10 chromosomose, nei pagrindiniai biologiniai mechanizmai šiuo metu nėra žinomi ir yra reikalingi tolimesni tyrimai, kad daugiau būtų sužinota apie šią fundamentinę problemą. Svarbiausia, kad šie tyrimai yra apriboti, nes trūksta adekvačių analitinių metodų, kurie leistų nesunkiai išanalizuoti hmC liekanas DNR.

15 Šiuo metu egzistuojantys analitiniai metodai, kuriais galima tirti citozino modifikacijas žinduolių DNR, yra paremti dviejų citozino padėčių buvimu CG sekose: nemodifikuoto citozino (C) ir 5-metilcitozino (5mC). Iki dabar buvo išvystyta nemažai 5mC identifikacijos ir lokalizacijos DNR metodų (Schumacher et al. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34, 528–542). Auksinis standartas, identifikuojant ir lokalizuojant individualias 5mC 20 padėtis genomine DNR, yra bisulfitinis sekos nustatymas (Frommer ir kt. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 1827–1831) bei daugybė jo atmainų. Šis metodas yra paremtas bisulfito ir C tarpinio produkto dezamininimu iki U; 5mC radikalas yra inertiškas šiai reakcijai ir todėl po bisulfitu veiktos DNR standartinio sekvenavimo matyti 5mC liekanos C-takelyje, o T ir C liekanos - T-takelyje. Veikiant bisulfitu, hmC virsta citozino 5- 25 metilsulfonatu, kuris dezamininasi dar lėčiau nei 5mC (Hayatsu, M. & Shiragami, M. (1979) *Biochemistry* 18, 632) ir todėl atsiranda C-takelyje. Taigi hmC liekana negali būti atskirta nuo mC liekanos, naudojant standartinį bisulfito sekos nustatymo protokolą. Panašiai, kitos aukšto našumo viso genomo analizavimo technologijos, pavyzdžiui mDiP (methylated DNA immunoprecipitation, metilintos DNR imunoprecipitacija) 30 (Weber ir kt. (2005) *Hum Mol Genet* 14, R11–R18), kurios yra paremtos m5C turinčios

DNR fragmentų specifiniu atpažinimu ir surišimu m5C specifiniais antikūnais arba metodai, paremti metilinimui jautrių restrikcijos endonukleazių naudojimu, taip pat nėra tinkami hmC padėtims aptikti. Apibendrinant, kadangi visos egzistuojančios technologijos buvo sukurtos atskirti dviem skirtingoms citozino padėtims (metilintas prieš nemetilintą) (Schumacher ir kt., (2006) *Nucleic Acids Res.* 34, 528–542), jos visiškai nenustato arba labai prastai nustato hmC liekanas genominėje DNR.

Neseniai buvo aprašytas DNR derivatizacijos būdas, naudojant nekofaktorinius junginius ir DNR metiltransferazes (patentinė paraiška LT2009023, paduota 02.04.2009). Ši technologija, veikiant metiltransferazėms, leidžia sekai specifiškai kovalentiškai prijungti formaldehidą (arba kitą alifatinį aldehidą) metiltransferazės taikinio citozino C5 padėtyje, susidarant 5-hidroksimetilcitozinui (arba 5-hidroksialkilintiems citozinams). Šioje paraiškoje taip pat yra aprašyti būdai, skirti tolimesnei hmC liekanų derivatizacijai įvairiose DNR molekulėse, kai, veikiant kreipiančiajai metiltransferazei, yra sekai specifiškai kovalentiškai prijungiami nukleofiliniai junginiai, tame tarpe ir tioliai. Ši reakcija iš principo įgalina hmC liekanų derivatizaciją DNR molekulėje, prijungiant įvairias funkcinės ir reporterinės grupes, numatant jų atsiradimą kreipiančiosios metiltransferazės taikiniuose. Kadangi stuburinių gyvūnų, tame tarpe ir žmonių, genominėje DNR hmC liekanos yra randamos CG sekoje, kai kurios derivatizacijos reakcijos gali būti naudingos, vystant taip reikalingas hmC analizės technologijas. Vis dėlto dar nebuvo įvertintas šių derivatizacijos reakcijų tinkamumas, chemiškai manipuluojant ir analizuojant hmC liekanas įvairiuose DNR tipuose, tame tarpe ir žinduolių genominėje DNR.

Aišku, jog yra labai reikalingi nauji, patikimi ir patvirtinti hmC liekanų genominėje DNR analizės metodai.

Išradimo esmė

Šių problemų sprendimas pasiekiamas, realizuojant siūlomo išradimo apibrėžties 1-14 punktus.

Pagrindinė šio išradimo idėja apima biomolekulėje esančių hidroksialkilintų liekanų tikslinę konversiją veikiant kreipiančiajai metiltransferazei. Šio išradimo autoriai parodė, kad tokios hidroksialkilintos liekanos biomolekulėje, kurios yra kreipiančiosios metiltransferazės taikiniai, yra selektyviai paverčiamos į nemodifikuotas liekanas arba į
 5 derivatizuotas liekanas, veikiant metiltransferazei. Substratą aktyvuojančių metiltransferazių pavyzdys yra pirimidinui-5 specifinės metiltransferazės, kurios natūraliai katalizuoja metilo grupės pernešimą į 5-tą citozino ar uracilo padėtį DNR, RNR arba laisvuose nukleotiduose, susidarant tarpiniam kovalentiniam ryšiui su 6-tąja pirimidino žiedo padėtimi.

10

Šis išradimas apima kofaktoriaus neturinčios metiltransferazės panaudojimą modifikuotos biomolekulės tikslinei konversijai, kai modifikuojanti grupė formulės – CH(OH)-R, kur R yra vandenilis arba C₁–C₁₂-alkilas, optimaliai vandenilis arba žemesnysis alkilas, yra paverčiama nemodifikuota biomolekule, pašalinant minėtą
 15 modifikuojančią grupę metiltransferazės taikinyje.

Šis išradimas taip pat apima modifikuotos biomolekulės tikslinės konversijos būdą, apimančią modifikuotos biomolekulės, turinčios modifikuojančią grupę formulės – CH(OH)-R, kur R yra vandenilis arba C₁–C₁₂-alkilas, optimaliai vandenilis arba žemesnysis alkilas, inkubaciją su kofaktoriaus neturinčia metiltransferaze sąlygomis,
 20 užtikrinančiomis metiltransferazės fermentinį aktyvumą. Minėta modifikuotos biomolekulės tikslinė konversija vyksta: i) kovalentiškai pašalinant minėtą modifikuojančią grupę liekanose, kurios yra metiltransferazės taikiniai; arba ii) vykdant minėtos modifikuojančios grupės derivatizaciją liekanose, kurios yra metiltransferazės taikiniai, kovalentiškai prijungiant nekofaktorinius nukleofilinius junginius bendros
 25 formulės HQ-LX, kur X žymi funkcinę grupę ar reporterinę grupę, prijungtą per jungtuką L, ir Q yra pasirinktas iš S, Se, O, N, C.

Optimaliame šio išradimo įgyvendinimo variante R yra vandenilis arba -CH₃ ir Q yra S arba Se. Biomolekulė yra nukleorūgšties molekulė, optimaliai DNR. Minėta

metiltransferazė yra DNR citozino-5 metiltransferazė, pasirinkta iš grupės, susidedančios iš M.HhaI, M.SssI ir HpaII arba jų darinių.

Šiame išradime naudojama modifikuota biomolekulė yra natūraliai ar dirbtinai modifikuota biomolekulė, kuri turi aukščiau minėtą modifikuojančią grupę taikinio vietoje.

- 5 Šio išradimo būdas taip pat taikytinas modifikuotos biomolekulės tiksliniam žymėjimui, apimant reporterinės grupės, kuri yra tinkama kaip žymė ir kuri leidžia identifikuoti pažymėtą biomolekulę tarp kitų nežymėtų molekulių, tiesioginį prijungimą arba prijungimą paeiliui
- 10 Šis išradimas taip pat apima hidroksimetilintų taikinių biomolekulėje nustatymo būdą, apimantį biomolekulės derivatizaciją arba žymėjimą, prijungiant nekofaktorinius nukleofilinius junginius, aprašytus šiame išradime, veikiant kofaktoriaus neturinčiai metiltransferazei ir nustatant ar minėtos metiltransferazės taikiniai buvo modifikuoti, kur metiltransferazės taikinių modifikavimas nurodo hidroksimetilinto taikinio buvimą.
- 15 Išradimo būdas apima atvejus, kur (modifikuojančio) junginio(-ių) prijungimas yra galimas prie 5-hidroksimetilcitozino liekanos DNR, bet jo prijungimas yra negalimas prie 5-metilcitozino arba citozino liekanų.

- Galiausiai, šio išradimo objektas yra rinkinys, skirtas atlikti bet kurį aukščiau paminėtą būdą, kuris apima kofaktoriaus neturinčią kreipiančiąją metiltransferazę arba kofaktoriaus neturinčią kreipiančiąją metiltransferazę ir nekofaktorinį nukleofilinį junginį(-ius), tinkamus buferio komponentus ir papildomai gali turėti aldehydą surišančius junginius.

25 Brėžinių aprašymas

Siekiant iliustruoti pagrindinius šio išradimo požymius šis aprašymas apima :

Fig. 1: Fermentiškai sufragmentuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido, gauto po inkubacijos su M.HhaI, atvirkščios fazės HPLC analizė. Dvigrandė DNR I:II (13 μM),

turinti hmC, buvo inkubuojama su M.HhaI (15 μ M) 2 val 37°C (takelis 2). Į kontrolinę reakciją (takelis 1) nebuvo pridėta M.HhaI. Stačiakampiu apibrėžtos smailės parodo dC ir hmdC.

5 **Fig. 2:** Fermentiškai sufragmentuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido, gauto po modifikacijos su M.HhaI, atvirkščios fazės HPLC analizė. hmC turinti dvigrandė DNR I:II (13 μ M) buvo inkubuojama su 1 mM L-selenocisteinu (takelis 3) esant 15 μ M M.HhaI 1 val kambario temperatūroje. Kontrolinė reakcija (takelis 1) buvo inkubuojama be egzogeninio junginio. Rodyklėmis nurodyti nauji modifikacijos produktai.

10

Fig. 3: TLC analizė fermentiškai sufragmentuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido 2'-deoksiribo-5'-mononukleotidų, žymėtų 33 -P ir inkubuotų su M.HhaI, M.HpaII ir M.SssI. 20 nM taikinyje turintis hmC dvigrandis oligodeoksiribonukleotidas buvo inkubuojamas su katalitiškai aktyviu arba neaktyviu C81S mutantiniu M.HhaI fermentu (takeliai 2, 3), su katalitiškai aktyviu arba karščiu inaktyvuotu M.HpaII fermentu (takeliai 5, 6) arba katalitiškai aktyviu (mutantinis fermento variantas Q142A/N370A) arba karščiu inaktyvuotu M.SssI fermentu (takeliai 8, 9) vieną valandą kambario temperatūroje.

15

Fig. 4: TLC analizė fermentiškai sufragmentuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido 2'-deoksiribo-5'-mononukleotidų, žymėtų 33 -P ir inkubuotų su cisteinu arba selenocisteinu esant M.HhaI. 20 nM dvigrandis oligodeoksiribonukleotidas, GCGC taikinio vietoje turintis C, 5mC arba hmC, o nespecifinėje sekoje CCGG turintis C arba hmC buvo inkubuojamas su M.HhaI (takeliai 1-6) ir 50 mM L-cisteino (takeliai 1-5) arba 1 mM L-selenocisteino (takelis 6) 1 val. kambario temperatūroje.

25

Fig. 5: 618 bp DNR fragmento, turinčio 5-hidroksialkicitoziną, restrikcinė analizė, po nuo metiltransferazės priklausomos modifikacijos. DNR fragmentas (100 nM), turintis hmC (kairė pusė) arba heC (dešinė pusė) taikinio GCGC sekoje, buvo inkubuojamas su M.HhaI (laukiniu tipu arba mutantiniu C81S baltymo variantu) 2 val. 37°C. Modifikuota

DNR buvo sufragmentuota su restrikcijos endonukleaze R.Hin6I ir analizuota agarozės gelyje.

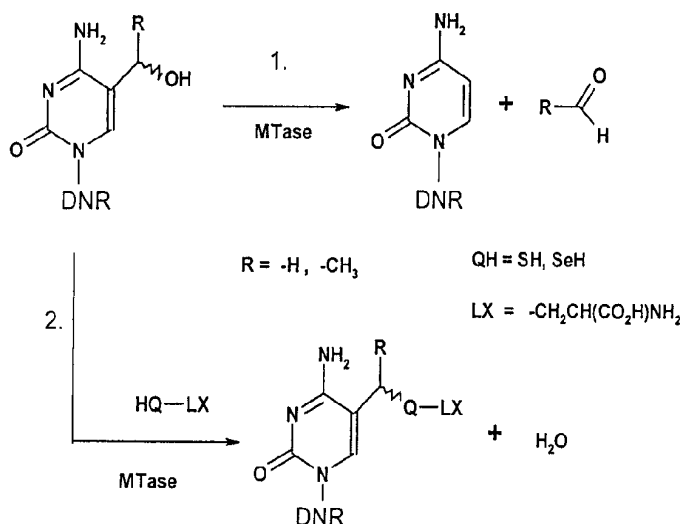
5 **Fig. 6:** 618 bp DNR fragmento, turinčio 5-hidroksialkilcitoziną, restrikcinė analizė, po nuo metiltransferazės priklausomos modifikacijos. DNR fragmentas (100 nM), turintis hmC CG taikinyje, buvo inkubuojamas su M.Sssl (Q142A/N370A mutantinis baltymas) (takeliai 1, 2) arba HpaII (takeliai 3, 4) 2 val 37°C. MTaze veikti mėginiai (takeliai 2 ir 4) arba neveiktos kontrolės (takeliai 1, 3) buvo sufragmentuotos su restrikcijos endonukleaze R.Hin6I (takeliai 1, 2) arba R.HpaII (takeliai 3, 4) ir analizuotos agarozės
10 gelyje.

Fig. 7: TLC analizė fermentiškai sufragmentuotų genomines DNR 2'-deoksiribo-5'-mononukleotidų, žymėtų ^{33}P ir inkubuotų su M.Sssl. Žmogaus genomine DNR buvo inkubuojama su M.Sssl (mutantinis baltymo Q142A/N370A variantas) 2 val 37°C, po to
15 sufragmentuota su restrikcijos endonukleazėmis R.HpaII arba R.MspI, 5' gale pažymėta ^{33}P , sufragmentuota iki 5'-mononukleotidų ir analizuota TLC (takelis 3). Kontroliniai mėginiai (takeliai 1 ir 2) nebuvo veikti M.Sssl.

Detalus išradimo aprašymas

- 20 Pagrindinis šio išradimo objektas yra metiltransferazių panaudojimas alfa-hidroksialkilintų liekanų modifikuotoje biomolekulėje tikslinei konversijai, kovalentiškai pašalinant arba prailginant alfa-hidroksialkilintas šonines grandines biomolekulės taikiniuose.
- 25 Pagrindinis šio išradimo alfa-hidroksialkilintų liekanų biomolekulėje tikslinės konversijos principas yra paaiškintas žemiau pateiktoje Schemoje 1, kuri parodo 5-alfa-hidroksialkilcitozino liekanų DNR konversijos galimybes, veikiant DNR citozino-5 metiltransferazėms (MTazėms).

Schema 1. Sekai specifinė alfa-hidroksialkilintų liekanų DNR konversija, veikiant DNR metiltransferazėms pagal šį išradimą. Reakcija 1: alfa-hidroksialkilo grupių tikslinis pašalinimas taikinio citozino liekanose DNR; Reakcija 2: taikinio citozino liekanų DNR alfa-hidroksialkilintų grupių tikslinė derivatizacija.



5

Pagrindžiant šio išradimo naujumą ir išradimo lygį pažymėtina, kad:

- 1) alfa-hidroksialkilo grupių pašalinimo nuo citozino liekanų reakcija pagal šį išradimą (Reakcija 1 Shemoje 1) yra nauja ir nėra akivaizdi šios srities specialistams. Ši reakcija yra nebūdinga MTazėms, kurios natūraliai katalizuoja nuo kofaktoriaus priklausomą taikinių transmetilinimą (nukleofilinis pakeitimas $\text{S}_{\text{N}}2$), įskaitant ir reakcijas su AdoMet analogais.
- 2) 5-alfa-hidroksialkilo grupių, tame tarpe ir 5-hidroksimetilo grupių, tikslinis pašalinimas nuo citozino liekanų DNR (Reakcija 1 Shemoje 1), negali būti pasiekimas jokiais kitomis žinomomis priemonėmis.
- 3) citozino 5-alfa-hidroksialkilo (įskaitant hmC) derivatizacija DNR, tikslingai prijungiant nukleofilinius junginius (Reakcija 2 Shemoje 1) buvo aprašyta anksčiau kaip dviejų stadijų procedūros, skirtos nmodifikuotos DNR sekai specifinei derivatizacijai, antra

20

stadija (LT2009023). Šiame išradime yra parodyta, kad natūraliai esančios DNR hmC liekanos taip pat gali būti derivatizuotos ir po to pažymėtos panašiu būdu.

Šio išradimo optimaliame įgyvendinimo variante R apima H ir -CH₃, o -QH apima -SH ir
 5 SeH. Tačiau šios srities specialistams yra aišku, kad R gali būti lengvai praplėstas iki C₁-C₁₂ alkilo, alkeno, alkino, o -QH - apimtų mažiausiai -OH, -NH₂, -NHNH₂ arba -ONH₂, N₃H, NCH (arba atitinkamas druskas, kuriose vandenilio atomas yra pakeistas jonu, pavyzdžiui metalo ar amonio jonų), o taip pat ir kitus tinkamus nukleofilus, kurie yra pakankamai aktyvūs vandeniniuose buferiniuose tirpaluose pH intervale 4-10. Šio
 10 išradimo optimaliame įgyvendinimo variante, L yra -CH₂CH(CO₂H)-, bet kvalifikuotiems srities specialistams suprantama, kad L taip pat apima kitas tinkamas grupes, pradedant nuo vien kovalentinių jungčių ir baigiant linijinių, ciklinių ir/arba aromatinių radikalų kombinacijomis, nebūtinai sujungtais su -NHCO-, -O-, -S- jungtukais, (poli)etilenglikolio grandinėmis -(CH₂CH₂O)_n- n = 1-100, ir t.t.

15

5-hidroksialkilcitozino turinčios DNR reakcija su egzogeniniu nukleofiliniu junginiu HQ-LX (kur LX yra chemiškai aktyvi arba reporterinė grupė X, prijungta per jungtuką L) veikiant kreipiančiajai DNR citozino-5 metiltransferazei leidžia sekai specifiskai prijungti
 20 minėtą junginį, įterpiant LX grupę prie taikinio citozino liekanų per tiometilo inkarą (kai QH = -SH). Chemiškai aktyvi grupė X po to gali būti naudojama kovalentiniam prijungimui tinkamų junginių, turinčių reporterinę grupę (žiūrėti žemiau).

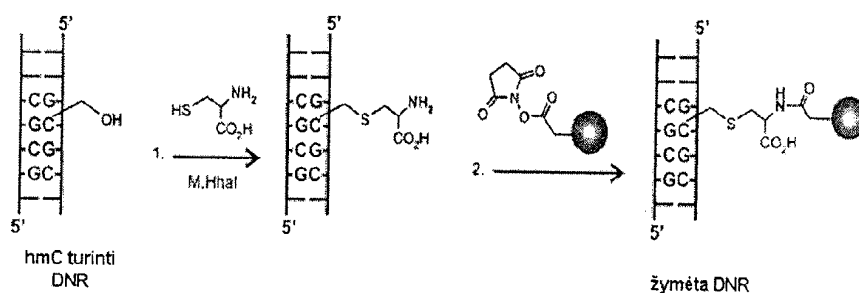
Kai QH = SeH, analogiškai pasiekamas LX grupės įterpimas DNR taikiniuose per selenometilo inkarą, kaip pademonstruota pavyzdžiuose 2 ir 5. Chemiškai aktyvi grupė X gali būti po to naudojama tinkamo junginio, turinčio reporterinę grupę kovalentiniam
 25 prijungimui. Selenidai, kurie yra selenometilo inkaro dalis, gali būti lengvai oksiduojami H₂O₂ arba NaIO₄ iki selenoksidų. Kadangi su selenoksidais gali būti atliekama eliminacijos reakcija, skylant Se-C jungčiai (Wirth, T. (2000) *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 3740-3749; Gieselman ir kt. (2002) *ChemBioChem* 3, 709-716), selenometilo inkaras gali būti naudojamas kaip chemiškai nukerpamas kovalentinis jungtukas žymėtų
 30 biomolekulių giminingumo grynimui. Iš kitos pusės, dėl žymaus rentgeno spindulių

anomalaus išbarstymo Se atomo buvimas prijungtoje grupėje gali būti naudingas, pavyzdžiui, biomolekulių struktūrų kristalografiniuose tyrimuose, taikant daugybinio bangos ilgio anomalaus išsklaidymo (MAD) metodą. ⁷⁷Se branduolio buvimas (natūralus paplitimas 8%), kurio magnetinis sukinyvis yra S=1/2, taip pat gali būti pritaikomas BMR ir EPR spektroskopijoje (Zelakiewicz ir kt. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 8112–8113).

Tolimesnis hmC liekanų DNR siūlomo tikslinės konversijos būdo vystymas yra biomolekulės tikslinio žymėjimo būdas, apimantis biomolekulės derivatizaciją (modifikavimą) pagal LT2009023 aprašymą ir toliau vykdant tinkamos žymėjimui ir leidžiančios identifikuoti žymėtas biomolekules tarp kitų nežymėtų molekulių grupės prijungimą.

Šio išradimo optimaliame įgyvendinimo variante sekai specifinis DNR žymėjimas buvo pasiektas dėka DNR metiltransferazės orientuojamo L-cisteino (tiolio) prijungimo, po kurio seka chemoselektyvus prijungimas, pavyzdžiui giminingumo žymių, tokių kaip su aminais reaguojančio biotino.

Schema 2. Selektivus sekai specifinis kovalentinis hmC liekanų DNR žymėjimas, naudojant DNR metiltransferazės pagal siūlomą išradimą. Prijungta reporterinė grupė parodyta rutuliuku.



Schema 2 aukščiau viršuje parodo pagrindinį hmC turinčios genomines DNR sekai specifinio žymėjimo principą, kur žymėjimas yra pasiekiamas (1) apdorojant hmC

turinčią DNR su L-cisteinu esant HhaI metiltransferazei, po kurio seka (2) amino selektyvus reporterinės grupės prijungimas su N-hidroksisukcinimido esteriu.

Šio išradimo optimaliame įgyvendinimo variante (a) nekofaktorinis nukleofilinis junginys arba jo tolimesni dariniai turi fluorescuojančią žymę; ir (b) hidroksimetilinti taikiniai yra aptinkami dėka minėtos nukleorūgšties molekulės fluorescencijos.

Kitame šio išradimo optimaliame įgyvendinimo variante, minėta analizuojamo junginio žymė yra aptinkama (a) dėka antikūno specifinio jungimosi prie minėto analizuojamo junginio žymės arba (b) naudojant avidino arba streptavidino specifinį jungimąsi prie analizuojamo junginio žymės.

Kaip minėta, remiantis šiuo išradimu atsiveria daug būdų tikslinio biopolimerų žymėjimo arba derivatizacijos galimybių. Šiam tikslui pasiekti nekofaktorinis nukleofilinis junginys turi turėti cheminį fragmentą LX (R= LX or Z= LX, žiūrėti Schema 2 ir 3), kur X apima funkcinę grupę arba reporterinę grupę, kuri yra prijungta per jungtuko grupę L.

Yra žinoma daug chemoselektyvių grupių, kurios apibrėžia reaktyvią grupę X ir yra naudojamos žymės prijungimui prie modifikuotų biomolekulių vandeniniuose tirpaluose. Klasikinės priemonės (Garman, (1997) Non-radioactive labeling: A practical introduction, Academic Press) apima pirminių aminų grupes, kurios gali reaguoti su aminų reaktyviomis grupėmis, pavyzdžiui tokiomis kaip hidroksisukcinimido esteris, acilo azidas, acilo nitrilas, acilo chloridas, pentafluorfenilo esteris, tioesteris, sulfonilo chloridas, izotiocianatas, imidoesteris, aldehidas ar ketonas, kurie duoda stabilius amidus, sulfonamidus, tiokarbamidus, imino eterius ar iminus, kurie gali būti redukuojami iki stabilių antrinių aminų. Tioliai specifiskai reaguoja su halogenacetamidais, maleimidais, aziridiniais arba kitais tioliais, susidarant tioeteriams ar bisulfidų junginiams, o 1,2-tioliai gali būti modifikuojami su arilboroninėmis rūgštimis. Hidrazinai ar hidroksilaminai gali kondensuotis su aldehidais ar ketonais, susidarant hidrazonams ir oksimams. 1,2-aminotioliai selektyviai reaguoja su aldehidais ar tioesteriais, sudarydami tiazolidinus (pavyzdžiui polipeptidų N-galinės cisteino liekanos,

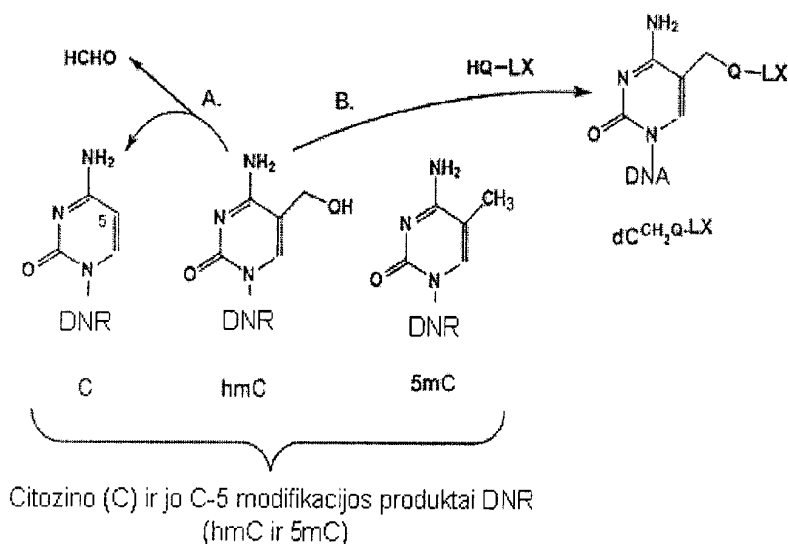
Liu ir Tam, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6584-6588) arba stabilias amino jungtis (pavyzdžiui polipeptidų N-galinės cisteino liekanos, gamtinis cheminis peptidų sujungimas, Dawson ir kt., (1994) *Science* 266, 776-779); azidai gali reaguoti su alkinais (Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition, Lewis ir kt. (2002), *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 1053-1057) arba su fosfinų esteriais (Staudinger ligation, Saxon ir Bertozzi, (2000) *Science* 287, 2007-2010), sudarydami 1,2,3-triazolus arba amidus; Diels-Alder ciklo prijungimas tarp aktyvuotų dienų ir dienofilų (pavyzdžiui furanų ir maleimidų, Graham ir kt., (2002) *Tet. Lett.* 4785-4788) yra įmanomas vandeniniuose tirpaluose. Kita moderni technika remiasi paladžio katalizuojama arilhalogenidų ir galinių alkinų kryžminio kopuliavimo reakcija (Sonogashira coupling, Casalnuova ir Calabrese, (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 4324-4330; Dibowski ir Schmidtchen, (1998) *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 476-478; Bong ir Ghaderi, (2001) *Org. Lett.* 3, 2509-2511), arba reakcija tarp arilhalogenidų ir arilboroninių rūgščių (Suzuki coupling, Casalnuova and Calabrese, (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 4324-4330; DeVasher at al., (2004) *J. Org. Chem.* 69, 7919-7927), susidarant arilalkinams ar biarilams. Be to, vario katalizuojamos alkinų prisijungimo reakcijos tarp galinių halogenalkinų, galinių alkinų arba galinių silicio alkinų, susidarant konjuguotiems dienams, gali vykti vandeniniuose tirpaluose. Galiausiai fluoro turintys derivatizavimo reagentai, pavyzdžiui 4-halogen-7-nitrobenzofurazanas, N-metilizotoinis anhidridas arba aktyvuoti bimanai, reaguoja su tioliais, aminais ir hidroksilo grupėmis ir gali būti naudojami tiesioginiam šių grupių žymėjimui. Nukleorūgštys paprastai neturi labai nukleofilinių ar elektrofilinių centrų, Taigi, šalia ciklo prijungimo reakcijų, paladžio katalizuojamų kryžminių kopuliavimo reakcijų ar vario katalizuojamų alkinų prijungimo reakcijų, daugybė kitų reakcijų tarp nukleofilų ir elektrofilų su pakeičiama reaktyvia grupe X gali būti naudojama nukleorūgštims sekai specifiškai pažymėti.

Kitame siūlomo išradimo įgyvendinimo variante, X apima bent vieną funkcinę grupę, pasirinktą iš pirminio amino grupės, tiolio grupės, 1,2-diolio grupės, haloacetamido grupės, maleimido grupės, aldehido grupės, ketono grupės, azido grupės, alkino grupės, 1,3-dieno funkcinės grupės, dienofilo funkcinės grupės, arilhalido grupės,

- galinės alkino grupės, arilboroninės rūgšties grupės, galinės haloalkino grupės ir galinio silicio alkino grupės bei apsaugotų amino, tiolio, 1,2-diolio, hidrazino, hidroksiamino, aldehido, ketono ir 1,2-aminotiolio grupių. Dėl tikslingo biopolimerų žymėjimo, X taip pat apima sunkiuosius atomus ar sunkiųjų atomų grupes, tinkamas X spindulių difrakcijos duomenų fazėms nustatyti; radioaktyvius ar stabilius retuosius izotopus; fluoroforų, fluorescencijos gesintojų, chromoforų, giminingumo žymenų, sukinių žymių (stabilios paramagnetinės grupės) radikalus; tarpgrandines sąsajas formuojančius agentus, grupes, karpančias nukleorūgštis, haptenus, nanodaleles ir rutuliukus.
- 5
- 10 Dvi pagrindinės strategijos gali būti naudojamos hmC liekanų identifikavimui genomineje DNR (Schema 3).

Schema 3. Sekos specifinė natūralios DNR konversija pagal šį išradimą analitiniams hmC liekanų nustatymui, veikiant DNR metiltransferazėms.

- 15 A. hmC liekanų konversija į nemodifikuotus citozinas;
 B. hmC liekanų derivatizacija arba žymėjimas.



A. Viena strategija yra paremta selektyvia hmC liekanų konversija į nemonifikuotas citozino liekanas. Šis būdas gali būti naudojamas kartu su egzistuojančiais analizės metodais, kurie normaliai gali parodyti 5mC ir nemonifikuoto C padėtis DNR, bet neatsikiria hmC nuo 5mC. Pavyzdžiui, bisulfitinis sekvenavimas parodytų 5mC + hmC liekanų padėtis C-takelyje ir nemonifikuotų citozinų padėtis T-takelyje. Selektivi MTazės nukreipiama hmC konversija į C ir tolesnis konvertuotos DNR bisulfitinis sekvenavimas tada parodytų 5mC liekanų padėtis C-takelyje ir hmC + C liekanų padėtis T-takelyje. Dviejų duomenų paketų palyginimas parodytų hmC liekanas kaip juosteles, migravusias iš C-takelio į T-takelį dėl fermentinės konversijos.

10

B. Kita strategija yra paremta tokia selektyvia hmC liekanų derivatizacija, kad jas galima būtų tiesiogiai atskirti nuo 5mC ir C liekanų. Pavyzdžiui, selektyviai prijungus tiolius arba selenolius veikiant nukreipiančiajai DNR MTazei, susidaro atitinkamai tiometilo ar selenometilo dariniai. Tokie dariniai gali būti naudojami reporterinės ar giminingumo grupės prijungimui (žiūrėti Schema 2).

15

Kitame šio išradimo optimaliame įgyvendinimo variante, (a) prijungta grupė trukdo nukleorūgščių padauginimui metiltransferazės atpažinimo taikiniuose; ir (b) hidroksimetilinti taikiniai yra aptinkami testuojant, ar nukleorūgščių molekulių padauginimas metiltransferazių atpažinimo taikiniuose yra uždelstas. Padauginimo uždelsimas galimas dėl pradmenų prisijungimo arba grandinės ilginimo trukdžių padauginimo reakcijos metu.

20

Taikant šio išradimo būdus gali būti atliekama nukleorūgščių sekoskaita. Gali būti naudojami visi žinomi sekoskaitos metodai.

25

Šio išradimo optimaliame įgyvendinimo variante, PGR yra tikro laiko PGR. Kitame šio išradimo įgyvendinimo variante nukleorūgščių padauginimui naudojamas tikro laiko PGR metodas.

Šio išradimo kitame optimaliame įgyvendinimo variante, (a) nukleorūgščių molekules, modifikuotos metiltransferazių atpažinimo sekose, yra gryninamos giminingumo gryninimo būdais; ir (b) šio išradimo junginiai, kurių formulės (I) arba jų dariniai, turi
5 giminingumo žymenį.

Optimaliame įgyvendinimo variante šio išradimo būdai po biomolekulių tikslinio modifikavimo stadijos turi papildomą DNR molekules sekos nustatymo stadiją. Gali būti naudojami visi žinomi sekos nustatymo metodai.

10

Šio išradimo pavyzdžiuose (Pavyzdys 4, Fig. 4) parodyta, kad egzogeninio nukleofilinio junginio arba jo darinio prijungimas yra galimas prie 5-hidroksimetilcitozino liekanų DNR, bet prijungimas negalimas prie 5-metilcitosino liekanos arba citozino liekanos.

15

Dar kitame šio išradimo optimaliame įgyvendinimo variante, DNR molekules identiškumas yra nustatomas DNR sekos nustatymo, hibridizacijos, MALDI-TOF metodais arba analizuojant nukleozidų sudėtį po fermentinės fragmentacijos ir chromatografijos.

20

Galiausiai, viename iš optimalių įgyvendinimo variantų rinkinys pagal siūlomą išradimą apima metiltransferazę arba metiltransferazę ir nekofaktorinį nukleofilinį junginį atskiruose konteneriuose ir gali turėti papildomai informacinį lapelį ar naudojimo instrukciją.

25

Tam tikri surišantys junginiai taip pat gali būti rinkinio dalimi, kurie galėtų chemiškai surišti reakcijoje išsilaisvinusius aldehidus, taip, kad neleistų jiems vėl dalyvauti grįžtamoje reakcijoje. Visos klasės vandenyje tirpių junginių, kurie reaguoja su aldehidais (tioliai, pirminiai aminai, hidroksilaminai, hidrazinai) gali būti naudojami. Šie junginiai taip pat gali būti pateikti chemiškai pakeista forma, pavyzdžiui modifikuoti

30

apsaugine grupe, turintys erdviškai dideles grupes (užkertant kelią aktyvių nukleofilų

reaktyvumui biomolekulės atžvilgiu), oligomerinėje arba polimerinėje formoje, išsilaisvinant junginį (-ius), patalpinus tinkamoje terpėje, pavyzdžiui metiltransferazės buferyje, arba imobilizuojant polimere arba rutuliukuose. Pavyzdžiui, tioliai egzistuoja oksiduotose formose kaip disulfidai arba polisulfidai ir t.t., kurie lengvai verčiami į tiolius

5 redukcinėmis sąlygomis. Pagalbinės biomolekulės, turinčios aukščiau minėtas funkcines grupes (pavyzdžiui tokie baltymai kaip jaučio serumo albuminas ir kt.) taip pat gali būti surišančiais agentais, jei jie neturi kreipiančiosios MTazės taikinių.

Kitas šio išradimo optimalus įgyvendinimo variantas taip pat apima rinkinį, turintį

10 metiltransferazę ir/arba diagnostinį preparatą(-us), paruoštą aukščiau aprašyto pagrindu. Diagnostinio preparato skysta kompozicija yra vienas iš šio išradimo optimalių įgyvendinimo variantų. Diagnostinės kompozicijos optimalus tirpiklis paprastai yra vandeninis. Be to, preparatas gali turėti kitų ingredientų ar nešiklių, kurie modifikuotų ar palaikytų pH, osmosinį slėgį, klampumą, skaidrumą, spalvą, sterilumą, stabilumą,

15 tirpumo greitį ar kvapą. Panašiai, preparatas gali turėti dar kitų farmakologiškai priimtinių ingredientų, kurie modifikuotų arba palaikytų diagnostinės kompozicijos stabilumą, tirpimo greitį, atpalaidavimą ar absorbciją. Kai diagnostinis preparatas yra paruoštas, jis gali būti laikomas steriliuose indeliuose tirpalo, suspensijos, gelio, emulsijos, kietu arba dehidratuotu ar liofolizuotu miltelių pavidalu. Šie preparatai gali būti laikomi iškart

20 naudojimui tinkamose formose arba rekonstruojami prieš pat naudojimą.

Praktikoje ruošiant nemodifikuotas biomolekulės pagal šį išradimą atlieka tokias stadijas,:

a) sumaišo (kartu sudeda) modifikuotą biomolekulę ir kofaktoriaus neturinčią MTazę,

25 tinkamame vandeniniame buferyje, kuriame metiltransferazė yra fermentiškai aktyvi (pavyzdžiui: 50 mM MOPS, 50 mM MES pH 7.5, 1 mM Na₂EDTA, 15 mM NaCl, 0.2 mg/ml jaučio serumo albumino, 5% glicerolio; arba 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.5 mM Na₂EDTA 0.2 mg/ml jaučio serumo albumino, 5% glicerolio; arba kitas panašus buferis, rekomenduojamas MTazių gamintojų);

- b) 5-120 min inkubuoja reakcijos mišinį temperatūroje, kuri yra tinkama metiltransferazių fermentiniam aktyvumui (pagal MTazės gamintojo rekomedaciją);
- c) sustabdo reakciją (pridedant slopinančio junginio, skiedžiant reakciją tinkamu tirpikliu, staigiai atšaldant iki - 20°C arba žemesnės temperatūros ar inaktyvuojant metiltransferazę, pašildžius 40°C aukštesnėje nei optimali reakcijos temperatūra 5-20 min);
- d) išskiria nemodifikuotą biomolekulę, jei reikia.

Derivatizuotos biomolekulės paruošimui pagal šį išradimą atlieka tokias stadijas,:

- a) sumaišo (kartu sudeda) biomolekulę, neturinčią kofaktoriaus MTazę ir nekofaktorinį nukleofilinį junginį tinkamame vandeniame buferyje (žiūrėti aukščiau);
- b) 5-120 min inkubuoja reakcijos mišinį temperatūroje, kuri yra tinkama metiltransferazių fermentiniam aktyvumui;
- c) sustabdo reakciją (žiūrėti aukščiau);
- d) išskiria nemodifikuotą biomolekulę, jei reikia.

Paprastai kreipiančiosios MTazės yra pridedami ekvimoliariniai kiekiai, lyginant su biomolekulės taikinių kiekiu. Nekofaktorinio nukleofilinio junginio koncentracijos paprastai yra milimoliarinės.

Išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai

Toliau pateikiami išradimo įgyvendinimo konkretūs pavyzdžiai. Išradimo apimtis neapribojama, bet tik iliustruojama šiais pavyzdžiais.

- Pavyzdys 1-2.** Sekai specifinė dvigrandžių oligodeoksiribonucleotidų, turinčių hmC, modifikacija veikiant DNR citozino-C5 metiltransferaze HhaI
- Modifikacija pirmiausiai buvo atliekama, naudojant DNR citozino-C5 metiltransferazę HhaI (M.HhaI) ir trumpus dvigrandžius oligodeoksiribonukleotidus. M.HhaI atpažįsta DNR seką 5'-GCGC-3' ir natūraliai perneša metilo grupę nuo S-adenozil-L-metionino (SAM arba AdoMet) ant vidinio citozino liekanos (pabrauktas) C5 atomo. Po

fermentinės modifikacijos reakcijos, dvigrandis oligodeoksiribonukleotidas buvo fermentiškai sufragmentuotas iki 2'-deoksiribonukleozidų ir analizuotas atvirkščios fazės HPLC aparatu, sujungta su ESI-MS.

Dvigrandis oligodeoksinukleotidas I:II buvo paruoštas, vandenyje sumaišant komplementarius viengrandžius oligonukleotidus I (SEQ ID NO:1) (5'-TAATAATGCGCTAATAATAATAAT) ir II (SEQ ID NO:2) (3'-TTATTACGCGATTATTATTATTA) kaip aprašyta LT2009023. hmC modifikacijos įvestos fermentiniu būdu kaip aprašyta LT 2009023. Modifikacijos pašalintos inkubuojant hmC-modifikuotą dvigrandį oligonukleotidą I:II (13 µM) su M.Hal (15 µM) 2 val 37°C temperatūroje. Derivatizacijos reakcijos vykdytos, inkubuojant modifikuotą dvigrandį oligonukleotidą I:II (13 µM) su 1 mM L-selenocisteino esant M.Hal (15 µM) 1 val 20°C temperatūroje. Nukleozidų sudėties nustatymui DNR buvo išskirta kaip aprašyta LT2009023 ir veikiama nukleaze P1 (2 vnt, Sigma, Vokietija) 2 val 60°C temperatūroje ir veršiuko žarnyno šarmine fosfataze (30 u, Fermentas Life Sciences, Lietuva) per naktį 37°C. Gauti nukleozidai buvo analizuojami atvirkščių fazių HPLC (Discovery C18 75 x 2.1 mm, 3 µm kolonėlė sujungta su Supelguard Discovery C18 20 x 2.1 mm, 5 µm prieškoloniu, Supelco, Vokietija) sujungtu su masių spektrometriniu detektoriumi (HP 1100 series ESI-MS sujungtas su vienu gvadrupoliu). Junginiai buvo eliuojami linijiniu A ir B tirpalų gradientu (A: 20 mM amonio formiatas pH 3.5 arba 20 mM amonio acetatas pH 5.5; B: 80% metanolio vandeninis tirpalas), eliuojant 0.3 ml/min greičiu esant 30°C temperatūrai; 0–20 min, 0–20% B; 20–22 min, 20–100% B; 22–27 min, 100% B. Iš kolonėles išplunami junginiai detekuojami UV absorbciniu diodinės matricos detektoriumi. UV absorbcijos spektrai buvo užrašyti (190-400 nm bangos ilgių intervale) smailių viršūnėse, o tirpiklio indėlis eliminuotas atėmus fono spektrus prieš ir po smailių. Iš kolonos ištekančias srautas buvo nukreipiamas į masių spektrometrą. 2'-deoksicitidinių ir jo darinių jonizacijos padidimui buvo naudojamas tirpalas C (96 %, metanolio, 4 % skruzdžių rūgšties ir 1 mM natrio formiato; tekėjimo greitis 0,3 ml/min). Masių spektrometre analizuojami susidarę teigiamai įkrauti jonai, esant kapiliaro įtampai – 5000 V, fragmentacijos įtampai 100-120 V, džiovinančių dujų tekėjimo greičiui 10-12 l/min ir temperatūrai 300-350°C. Masių spektrai matuojami

intervale 50-600 m/z, 0.05 tikslumu. Didelės skiriamosios gebos masių spektrai gauti atitinkamas HPLC frakcijas išanalizavus LTQ Orbitrap masių spektrometru (Thermo Electron), kuris sujungtas su nanoelektrošpurškimo įtaisu (Proxeon NanoSpray ESI).

5 **Pavyzdys 1:** hmC turinčio dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido nukleozidų sudėties analizė po inkubavimo su M.HhaI

Modifikuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido (I:II) nukleozidų sudėties HPLC analizė parodė, kad šalia dG, dT ir dA nukleozidų randami taip pat dC ir dC^{CH₂OH} (hmC 2'-deoksinukleosidas), kurių išėjimo laikai yra atitinkamai 3.7 ir 4.2 min. (žiūrėti Fig. 1).
 10 Šie junginiai buvo išanalizuoti ESI-MS (m/z: 250 [M + Na]⁺, 134 [citosinas + Na]⁺ ir m/z: 280 [M + Na]⁺, 164 [5-hidroksimetilcitozinas + Na]⁺). Nustatytos masės leidžia teigti, kad atitinkamai susidaro 2'-deoksicitidinas dC ir 5-hidroksimetil-2'-deoksicitidinas dC^{CH₂OH}. Pastarasis junginys buvo beveik visiškai konvertuotas į nemodifikuotą dC, inkubuojant su M.HhaI (Fig. 1, lyginti santykinis C ir hmC smailių didžius takeliuose 1 ir 2). Taigi,
 15 hidroksimeto grupė yra pašalinama nuo 5-hidroksimetilcitozino liekanų DNR, veikiant M.HhaI .

Pavyzdys 2. HmC turinčio dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido nukleozidų sudėties analizė po inkubacijos su L-selenocisteinu ir M.HhaI

20 HmC turinčio dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido (I:II) nukleozidų sudėties HPLC analizė parodė, kad šalia dC, dG, dT ir dA nukleozidų randamas dar vienas pikas, kurio išėjimo laikas yra 4.2 min, atitinkantis hmC (žiūrėti Fig. 2, takelis 1). Po inkubacijos su M.HhaI ir L-selenocisteinu, šis naujas produktas buvo iš dalies konvertuotas į naują junginį xC, kurio išėjimo laikas yra 3.1 min. Šis naujas produktas buvo išanalizuotas
 25 HR-MS (rasta m/z: 409.0621, suskaičiuota [M + H]⁺, C₁₃H₂₁N₄O₆Se: 409.0621). Nustatyta masė leidžia teigti, kad susidaręs naujas junginys yra 5-(Se-selenocisteinil)metil-2'-deoksicitidinas dC^{CH₂SeCH₂CH(CO₂H)NH₂}. Taigi L-selenocisteinas yra prijungiamas prie 5-hidroksimetilcitozino liekanų DNR, veikiant M.HhaI.

Pavyzdžiai 3–7. Sekai specifinė viduje žymėto ir hmC turinčio dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido modifikacija buvo tirta veikiant DNR citozino-5 MTazėms M.Hhal, M.SssI arba HpaII. M.Hhal atpažįsta dvigrandę DNR seką 5'-GCGC-3' ir natūraliai perneša metilo grupę nuo S-adenozil-L-metionino (SAM arba AdoMet) ant vidinio citozino (pabraukta). Atitinkamai, kitos DNR metiltransferazės atlieka panašią reakciją, bet atpažįsta skirtingus DNR taikinius: M.SssI (atpažinimo taikiny CG) arba M.HpaII (atpažinimo taikiny CCG). Taikinio citozinių modifikacijos analizė, esant DNR citozino-C5 metiltransferazėms, buvo atlikta, naudojant viduje pažymėtą dvigrandį oligodeoksiribonukleotidą. Viduje pažymėtas dvigrandis oligodeoksiribonukleotidas turi DNR metiltransferazių atpažinimo sekas, kuriose taikinio citozinas buvo pažymėtas ³³P (M.Hhal atveju buvo pažymėti abu taikinio citozinai). hmC modifikacija buvo atlikta fermentiškai, inkubuojant dvigrandį oligodeoksiribonukleotidą su formaldehidu (13 mM) ir atitinkama MTaze.

Siekiant išanalizuotį sudėtį, dvigrandis oligodeoksiribonukleotidas buvo fermentiškai sufragmentuojams iki 2'-deoksiribonukleozid-5'-monofosfatų, kurie analizuoti TLC ir autoradiografija, kas leidžia atrankiai stebėti tik taikinio nukleotido modifikacijas.

Dvigrandžiai oligodeoksiribonukleotidai III:IV (nemetilintas M.Hhal DNR substratas), V:VI (hemimetilintas M.Hhal DNR substratas), VII:VIII (DNR substratai M.HpaII ir M.SssI) ir IX:X (DNR substratas M.AluI) buvo paruošti sumaišius lygius molinius kiekius (150 μM) atitinkamų komplementarių viengrandžių oligodeoksiribonukleotidų: III (SEQ ID NO:3) (5'-TCGGATGTTGTGGGTCA) ir IV (SEQ ID NO:4) (3'-GCCTACAACACCCAGTCGCGTACTATCACAT); V (5'-TCGGATGTTGTGGGTCAG) (SEQ ID NO:5) ir VI (SEQ ID NO:6) (3'-GCCTACAACACCCAGTCGMGTACTATCACAT); VII (SEQ ID NO:7) (5'-TGACCCACGCTCGCC) ir VIII (SEQ ID NO:8) (3'-ACTGGGTGCGAGCGGGCCTCTATTTAATACA); IX (SEQ ID NO:9) (5'-CGCGCCATTCCTGCGA) ir X (SEQ ID NO:10) (3'-GCGCGGTAAGGACGCTCGAAATCCTAT) vandenyje, pašildžius 95°C temperatūroje 5 min ir lėtai atvėsinus iki kambario temperatūros. Žymėti DNR substratai buvo paruošti sumaišant dvigrandžius DNR substratus (400 nM), dATP, dGTP ir dTTP (kiekvieno 33

5 μM , [α - ^{33}P]CTP (1.5 μM , Hartmann Analytic, Vokietija) ir Klenow Fragmentą (0.16 $\text{u}/\mu\text{L}$,
 Fermentas Life Sciences) ir inkubuojant 37°C temperatūroje 30 min Klenow reakcijos
 buferyje; po to sekė polimerazės inaktyvacija 75°C temperatūroje 15 min. 20 - 100
 dvigrandžio DNR substrato buvo inkubuojama su 125 nM M.HhaI, 1000 nM M.HpaII
 arba 120 nM M.SssI (variantas Q142A/N370A) buferiniame tirpale (5 -20 μL , 50 mM
 MOPS, 50 mM MES pH 7.0 (M.HhaI) ir pH 7.5 (kitos metiltransferazės), 1 mM
 Na_2EDTA , 15 mM NaCl, 0.2 mg/ml jaučio serumo albumino, 5% glicerolio) su 13 mM
 10 formaldehido 1 val kambario temperatūroje. Modifikacijos nuėmimo reakcijos buvo
 atliktos inkubuojant 20 nM dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido su atitinkama DNR
 metiltransferaze (2 μM M.HhaI, 2 μM M.HpaII arba 1.2 μM M.SssI) 2-5 val 37°C
 buferiniame tirpale (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.5 mM Na_2EDTA 0.2 mg/ml
 jaučio serumo albumino, 5% glicerolio). Po reakcijos DNR buvo išsodinta 3 tūriais
 15 etanolio, ištirpinta nukleazės BAL31 buferyje (5 μL) su nukleaze BAL31 (0.4
 u)(Fermentas Life Sciences), inkubuota 1 val 30°C temperatūroje, o po to 0.5–3 μL
 tirpalo buvo užnešta ant TLC plokštelės (PEI CelluloseF, 20 x 20 cm, Merck). Naudotas
 TLC kilimo tirpalas: izosviesto rūgštis/ vanduo/ konc. amoniakas (66:17:4, vol/vol/vol).
 Plokštelės buvo džiovinamos per naktį, radioaktyvios dėmės eksponuotos su fotoekranu
 (Fujifilm, Japan), kuris nuskanuotas skaitytuvu FLA-5100. Radioaktyvumo kiekis
 20 dėmelėse kiekybiškai įvertintas, naudojant MultiGauge programa (Fujifilm). Modifikuoti
 2'-deoksiribocitidino-5'-monofosfatai (dXMP) buvo detektuojami atsiradus naujoms
 radioaktyvumo dėmėms šalia pagrindinės 2'-deoksiribocitozino-5'-monofosfato (dCMP)
 dėmės. Modifikuoto nukleotido (dMXP) padėtis buvo nustatoma išmatavus jo nueitą
 kelią TLC plokštelėje ir palyginus jį su citozino (dCMP) nueitu keliu ($R_f(\text{X}) =$
 $R_f(\text{dXMP})/R_f(\text{dCMP})$).

25

Pavyzdys 3. HmC turinčio dvigrandžio oligodeoksiribonucleotido nukleotidų analizė po inkubavimo su DNR citozino-5 metiltransferaze (M.HhaI)

30 Modifikacijos produktų, gautų po hmC turinčios DNR inkubavimo su M.HhaI, TLC
 analizė parodė, kad hmC ir C nukleotidų santykis mažėja (R_c vertė 0.85 ir 1.0,
 atitinkamai) (žiūrėti Fig. 3, takeliai 1 ir 2). Kontrolinė reakcija (takelis 3) buvo

inkubuojama su katalitiškai neaktyviu M.HhaI mutantiniu baltymu (C81S). Taigi, 5-hidroksimetilo grupė yra pašalinama nuo taikinio hmC liekanos, susidarant nemodifikuotam citozinui, veikiant katalitiškai aktyviai M.HhaI.

- 5 **Pavyzdys 4.** Dvigrandžio oligodeoksiribonucleotido taikinio nukleotido analizė, taikinyje turinčio hmC, C arba 5mC, po inkubacijos su L-cysteinu ir DNR citozino-5 metiltransferaze (M.HhaI)
- 20 nM dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido V:VI (specifinis-C), V:VI-metilintas (specifinis-5mC), V:VI-hidroksimetilintas (specifinis-hmC), VII:VIII (nespecifinis-C) arba
- 10 VII:VIII-hidroksimetilintas (nespecifinis-hmC) (Fig. 4, takeliai 1-5, atitinkamai) buvo inkubuojama su 50 mM L-cisteino ir M.HhaI (120 nM) 1 val kambario temperatūroje. Dar viena radioaktyvi dėmė ($R_c=0.55$), atitinkantį prijungtą produktą Cys-hmC, buvo
- matoma (takelis 3) tik, kai substratu buvo naudota specifinė hidroksimetilinta DNR. Taigi M.HhaI prijungia egzogeninį nukleofilą sekai specifiškai prie hmC, bet ne prie C, arba
- 15 5mC.

Pavyzdys 5. HmC turinčio dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido taikinio nukleotidų analizė po inkubavimo su su L-selenocisteinu ir DNR citozino-5 metiltransferaze (M.HhaI)

- 20 Modifikuotų produktų, gautų po hmC turinčio specifinio dvigrandžio DNR substrato inkubavimo su L-selenocisteinu ir M.HhaI, TLC analizė parodė, kad atsiranda naujas modifikuotas nukleotidas SeCys-hmC (R_c reikšmė 0.6; Fig. 4, lyginti takelius 6 ir 7). Taigi L-selenocisteinas yra prijungiamas prie taikinio 5-hidroksimetilcitozino liekanų DNR, veikiant M.HhaI.

25

Pavyzdys 6: HmC turinčio dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido taikinio nukleotidų analizė po inkubacijos su DNR citozino-5 metiltransferaze (M.SssI)

- Modifikacijos produktų, gautų po hmC turinčios DNR inkubavimo su M.SssI (variantas Q142A/N370A), TLC analizė parodė, kad hmC ir C nukleotidų santykis mažėja (žiūrėti
- 30 Fig. 3, palyginti takelius 7-8). Kontrolinė reakcija (takelis 9) buvo inkubuojama su

terminškai inaktyvuotu M.Sssl. Taigi, 5-hidroksimetilo grupė yra pašalinama nuo taikinio hmC liekanos, susidarant nemodifikuotam citozinui, veikiant katalitiškai aktyviai M.Sssl.

Pavyzdys 7: HMC turinčio dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido taikinio nukleotidų analizė po inkubacijos su DNR citozino-5 metiltransferaze (M.Hpall)

5 Modifikacijos produktų, gautų po hmC turinčios DNR inkubavimo su M.Hpall, TLC analizė parodė, kad hmC ir C nukleotidų santykis mažėja (Fig. 3, palyginti takelius 4-5). Kontrolinė reakcija (takelis 6) buvo inkubuojama su terminškai inaktyvuotu M.Hpall. Taigi, 5-hidroksimetilo grupė yra pašalinama nuo taikinio hmC liekanos, susidarant
10 nemodifikuotam citozinui, veikiant katalitiškai aktyviai M.Hpall.

Pavyzdys 8-11. Didelių DNR molekulių, turinčių 5-hidroksialkilintą taikinio citoziną, sekai specifinė modifikacija veikiant DNR citozino-C5 metiltransferazėmis

Sekai specifinė modifikacija veikiant DNR citozino C5 metiltransferazėmis Hhal, Sssl ir
15 Hpall buvo tirta, naudojant DNR apsaugojimo metodą. Šis metodas paremtas tuo, kad DNR metiltransferazių katalizuojama nukleobazių modifikacija tam tikrame taikinyje, kuris yra atpažįstamas restrikcijos endonukleazių, apsaugo DNR nuo šių fermentų hidrolizės. Nemodifikuoti taikiniai DNR yra greitai fragmentuojami restrikcijos endonukleazių, tuo tarpu kovalentinė taikinių modifikacija blokuoja DNR skėlimą. Po
20 fragmentacijos pobūdis yra analizuojamas agaroziniame gelyje.

DNR substratui buvo naudotas 618 bp plazmidės pUC19 (pUC-618) fragmentas su vienu M.Hhal taikiniu, 2 M.Hpall taikiniais ir 32 M.Sssl taikiniais. pUC-618 buvo paruoštas PGR padauginimo metodu naudojant pUC19 plazmidę (Fermentas Life Sciences), du pradmenis Dir (5'-AACGTTGTTGCCATTGCTAC) (SEQ ID No:11) ir Rev
25 (5'-GCTCATGAGACAATAACCCTGA) (SEQ ID No:12) ir Taq DNR polimerazę (Fermentas Life Sciences). PGR fragmentas buvo išgrynintas sefakrilu S-400 (GE Healthcare) ir išsodintas etanoliu.

HmC modifikacijos GCGC atpažinimo sekose buvo įvestos inkubuojant 100 nM pUC-618 ir 50 nM M.Hhal buferiniame tirpale (50 mM MOPS, 50 mM MES pH 7.0, 1 mM
30 Na₂EDTA, 15 mM NaCl, 0.2 mg/ml jaučio serumo albumino, 5% glicerolio) su 13 mM

formaldehido 1 val kambario temperatūroje. 5-hidroksietilcitozino (hmC) modifikacijos GCGC atpažinimo sekose buvo įvestos inkubuojant 100 nM pUC-618 su 50 nM M.HhaI su 800 mM acetaldehido 1 val kambario temperatūroje kaip aprašyta aukščiau. hmC modifikacijos CG atpažinimo sekose buvo įvestos inkubuojant 200 nM pUC-618 su 5 1200 nM M.SssI (Q142A/N370A) ir 13 mM formaldehido 1 val kambario temperatūroje kaip aprašyta aukščiau. hmC modifikacijos CCGG taikinyje buvo įvestos inkubuojant 200 nM pUC-618 su 2000 nM M.HpaII ir 13 mM formaldehido 1 val kambario temperatūroje kaip aprašyta aukščiau. Reakcijos buvo sustabdytos, pašildant 75°C temperatūroje 20 min. DNR po to buvo išsodinta 3 tūriais etanolio ir vieną kartą 10 perplauta 75% etanoliumi. Modifikacijos nuėmimo reakcijos buvo atliktos inkubuojant pUC-618 su atitinkama DNR metiltransferaze 2 – 5 val 37°C buferyje (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.5 mM Na₂EDTA 0.2 mg/ml jaučio serumo albumino, 5% glicerolio).

DNR karpymas restrikcijos endonukleazėmis buvo atliktas pagal gamintojo 15 rekomendacijas (Fermentas Life Sciences). Mėginiai buvo praskiesti 1/6 tūrio 6x užnešimo dažų (Loading Dye Solution, Fermentas Life Sciences) ir analizuoti 2% agarozės gelyje.

Pavyzdys 8. 618 bp DNR fragmento, turinčio hmC, sekai specifinė modifikacija, esant 20 M.HhaI

Fig. 5 (takeliai 1-4) rodo, kad dėl hmC modifikacijos pUC-618 fragmentas yra nekarpomamas R.Hin6I (takeliai 1 ir 2). Inkubuojant šį fragmentą su laukinio tipo M.HhaI, GCGC taikiniai yra karpomi R.Hin6I (takelis 3), tačiau inkubuojant su katalitiškai neaktyviu M.HhaI mutantu C81S, DNR ir toliau yra nekarpomama (takelis 4). Taigi, 5- 25 hidroksimetilo grupės yra efektyviai pašalinamos nuo GCGC taikinių DNR fragmente, veikiant katalitiškai aktyviai M.HhaI.

Pavyzdys 9. 618 bp DNR fragmento, turinčio 5-hidroksietilcitoziną, sekai specifinė modifikacija, esant M.HhaI

Fig. 5 (takeliai 5-8) rodo, kad dėl heC modifikacijos pUC-618 fragmentas yra nekarpomamas R.Hin6I (palyginti takelius 5 ir 6). Inkubuojant šį fragmentą su laukinio tipo M.HhaI, GCGC taikiniai yra karpomi R.Hin6I (takelis 7), tačiau inkubuojant su katalitiškai neaktyviu M.HhaI mutantu C81S, DNR ir toliau yra nekarpomama (takelis 8).

- 5 Taigi, 5-hidroksietilo grupės yra efektyviai pašalinamos nuo GCGC taikinių DNR fragmente, veikiant katalitiškai aktyviai M.HhaI.

Pavyzdys 10. 618 bp DNR fragmento, turinčio hmC, sekai specifinė modifikacija, esant M.SssI

- 10 Fig. 6 rodo, kad dėl hmC modifikacijos pUC-618 fragmentas yra iš dalies nekarpomamas R.Hin6I (takelis 1). Inkubuojant šį fragmentą M.SssI (variantas Q142A/N370A), GCGC taikiniai yra daugiau karpomi R.Hin6I (padaugėja karpymo produktų takelyje 2). Taigi, 5-hidroksimetilo grupės yra pašalinamos nuo GCGC taikinių DNR fragmente, veikiant M.SssI.

15

Pavyzdys 11. 618 bp DNR fragmento, turinčio hmC, sekai specifinė modifikacija, esant M.HpaII

- Fig. 6 rodo, kad dėl hmC modifikacijos pUC-618 fragmentas yra iš dalies nekarpomamas R.HpaII (takelis 3). Inkubuojant šį fragmentą su M.HpaII, CCGG taikiniai yra daugiau karpomi R.Hin6I (padaugėja karpymo produktų takelyje 4). Taigi, 5-hidroksimetilo grupės yra pašalinamos nuo CCGG taikinių DNR fragmente, veikiant M.HpaII.
- 20

Pavyzdys 12. Sekai specifinė hmC konversiją į citozinas žmogaus genomine DNR, naudojant DNR citozino-5 metiltransferazę M.SssI

- 25 90 ng žmogaus genomines DNR (gDNA) (izolijuotos iš mirusių žmonių smegenų) buvo inkubuota 25 µl buferiniame tirpale (50 mM MOPS, 50 mM MES pH 7.5, 1 mM Na₂EDTA, 15 mM NaCl, 0.2 mg/ml jaučio serumo albumino, 5% glicerolio) su 1200 nM M.SssI (variantas Q142A/N370A) per naktį 37°C. DNR buvo išgryninta naudojant rinkinį (Qiagen Nucleotide Removal Kit) ir fragmentuota su R.MspI arba R.HpaII (20 u)
- 30 (Fermentas Life Science) 3 val 37°C. Tada buvo pridėta RnazėsA (5 µg) ir FastAP (0.5

u) ir inkubacija pratęsiama dar vieną valandą. DNR vėl buvo išvalyta per rinkinį (Qiagen Nucleotide Removal Kit) ir pažymėta, naudojant T4 polinukleotidkinazę (Fermentas Life Science) ir [γ - 33]ATP (Hartmann Analytic). Po to DNR buvo išsodinta 3 tūriais etanolio ir degraduota su Lambda egzonukleaze (5 u) 1 val 37°C. 0.5–3 μ l mėginio buvo užnešta
5 ant TLC lėkštelių (PEI CelluloseF, 20 x 20 cm, Merck), naudotas TLC kilimo tirpalas izosviesto rūgštis/ vanduo/ konc. amoniakas (66:17:4, vol/vol/vol). Plokštelės buvo džiovinamos per naktį, o radioaktyvios dėmelės autografuotos, naudojant fotoekranus (Fujifilm, Japan), kurie nuskanuoti su FLA-5100 fotoskaitytuvu. Vaizdai apdoroti Multigauge programa (Fujifilm). Fig. 7 rodo, kad genominėje žmogaus smegenų DNR
10 yra hmC ir 5mC antrame citozine CCGG taikinyje (pabrauktas), nes hmC ir 5mC turintys taikiniai yra perkerpami R.MspI ir pažymimi ties antru nukleotidu (žiūrėti takelį 2 ir atitinkamai juodą radioaktyvumo profilį dešinėje), tuo tarpu R.HpaII nekerpa tokių taikinių, todėl jie nepasižymi (Kriaucionis, S. & Heintz, N. *Science* published online, doi:10.1126/science.1169786). Genominę DNR inkubuojant su M.SssI, detektuojamas
15 hmC kiekis CCGG sekose sumažėja (takelis 3 ir atitinkamai pilkas radioaktyvumo profilis dešinėje). Taigi 5-hidroksimetilo grupė yra pašalinama nuo taikinio citozino CCGG sekose žmogaus genominėje DNR, veikiant M.SssI.

20

25

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS:

1. Kofaktoriaus neturinčios metiltransferazės panaudojimas modifikuotos biomolekulės, turinčios modifikuojančią grupę formulės $-CH(OH)-R$, kur R yra vandenilis arba C_1-C_{12} -alkilas, optimaliai vandenilis arba žemesnysis alkilas, geriausiai vandenilis arba $-CH_3$, tikslinei konversijai į nmodifikuotą biomolekulę, pašalinant minėtą modifikuojančią grupę metiltransferazės atpažinimo taikiniuose.
2. Modifikuotos biomolekulės tikslinės konversijos būdas, apimantis modifikuotos biomolekulės, turinčios modifikuojančią grupę formulės $-CH(OH)-R$, kur R yra vandenilis arba C_1-C_{12} -alkilas, optimaliai vandenilis arba žemesnysis alkilas, geriausiai vandenilis arba $-CH_3$, inkubaciją su kofaktoriaus neturinčia kreipiančiąja metiltrasferaze sąlygomis, užtikrinančiomis metiltransferazės fermentinį aktyvumą, kur minėta tikslinė konversija vyksta:
 - i) kovalentiškai pašalinant minėtą modifikuojančią grupę liekanose, kurios yra metiltransferazės taikiniai; arba
 - ii) vykdant minėtos modifikuojančios grupės derivatizaciją liekanose, kurios yra metiltransferazės taikiniai, kovalentiškai prijungiant nekofaktorinius nukleofilinius junginius bendros formulės

$$HQ-LX,$$
 kur X žymi funkcinę grupę ar reporterinę grupę, prijungtą per jungtuką L, ir Q yra pasirinktas iš S, Se, O, N, C.
3. Būdas pagal 2 punktą arba panaudojimas pagal 1 punktą, kur minėta biomolekulė yra nukleorūgšties molekulė, optimaliai DNR, ir minėta metiltransferazė yra DNR citozino-5 metiltransferazė, pasirinkta iš grupės susidedančios iš M.HhaI, M.SssI ir M.HpaII arba jų darinių.

4. Būdas pagal 2 arba 3 punktą, kur modifikuota biomolekulė yra natūraliai ar dirbtinai modifikuota biomolekulė, turinti modifikuojančią grupę, apibrėžtą 2 punkte, kur R yra vandenilis arba $-CH_3$; ir Q yra S arba Se.
5. Modifikuotos biomolekulės tikslinio žymėjimo būdas, apimantis reporterinės grupės, kuri yra tinkama kaip žymė ir kuri leidžia identifikuoti pažymėtą biomolekulę tarp kitų nežymėtų molekulių, tiesioginį prijungimą arba prijungimą paeiliui.
6. Būdas pagal 5 punktą, kuriame žymė yra pasirinkta iš fluoroforų, fluorescencijos gesintojų, chromoforų, giminingumo žymenų, stabilių paramagnetinių grupių, radioaktyvius arba retus stabilus izotopus turinčių grupių, grupių, turinčių sunkiuosius atomus, tinkamus kristalografinių difrakcijos duomenų fazėms gauti, tarpgrandininius ryšius formuojančių agentų, nukleorūgštis karpančių grupių, haptenuų, nano-dalelių ir rutuliukų.
- 15 7. Hidroksimetilintų taikinių biomolekulėje nustatymo būdas, apimantis biomolekulės derivatizaciją arba žymėjimą, prijungiant nekofaktorinį junginį, apibrėžtą 2 punkte, esant kofaktoriaus neturinčiai metiltransferazei ir nustatant, ar minėtos metiltransferazės taikiniai buvo modifikuoti, kur minėtos metiltransferazės taikinių modifikavimas nurodo hidroksimetilinto taikinio buvimą.
- 20 8. Būdas pagal 7 punktą, kuriame prijungiamas junginys trukdo nukleorūščių padauginimui metiltransferazės atpažinimo sekose; ir hidroksimetilinti taikiniai yra nustatomi testuojant, ar būtų nukleorūščių molekulės padauginimo uždelsimo metiltransferazės atpažinimo sekose.
- 25 9. Būdas pagal 7 ar 8 punktus, kuriame prijungiamas junginys turi fluorescencinę žymę, ir hidroksimetilinti taikiniai yra nustatomi, matuojant fluorescencijos buvimą arba kiekį minėtoje nukleorūgšties molekulėje.

10. Būdas pagal bet kurį iš 7-9 punktų, kur junginio prijungimas yra galimas prie 5-hidroksimetilcitozino liekanos DNR, bet jo prijungimas yra negalimas prie 5-metilcitosino ar citozino liekanų.
- 5 11. Būdas pagal bet kurį iš 5-6 arba 7-10 punktų, kur prijungiamas junginys ar žymė derivatizuotojoje biomolekulėje, optimaliai DNR molekulėje, yra identifikuojamas DNR sekoskaita, hibridizacija, masių spektrometrija arba nukleozidų sudėties analize po fermentinės fragmentacijos ir chromatografijos.
- 10 12. Rinkinys, skirtas atlikti būdą pagal bet kurį iš punktų 2-4, 5-6 arba 7-11, apimantis kofaktoriaus neturinčią kreipiančiąją metiltransferazę arba kofaktoriaus neturinčią kreipiančiąją metiltransferazę ir nekofaktorinį (-ius) junginį (-ius) atskiruose konteineriuose.
13. Rinkinys pagal 12 punktą, papildomai turintis pašalintą grupę surišantį junginį(-ius) atskiruose konteineriuose ir, nebūtinai, naudojimo instrukciją.
- 15 14. 2'-deoksicitidino darinys susidaręs DNR, kuris yra 5-(Se-selenocisteinil)metil-2'-deoksicitidinas.

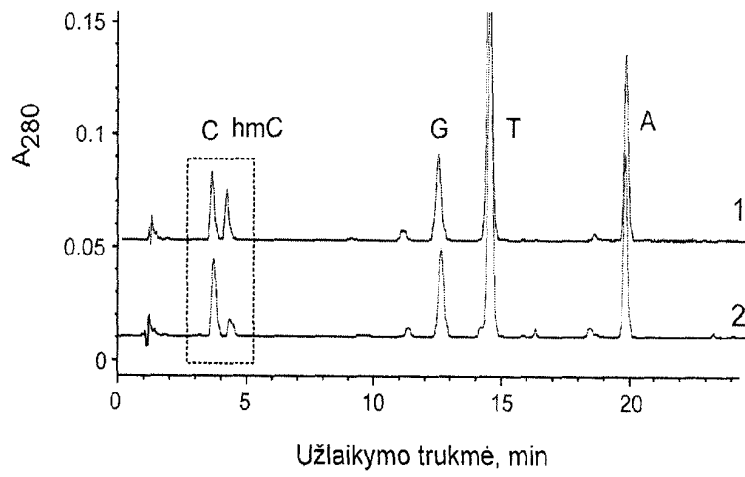


Fig. 1

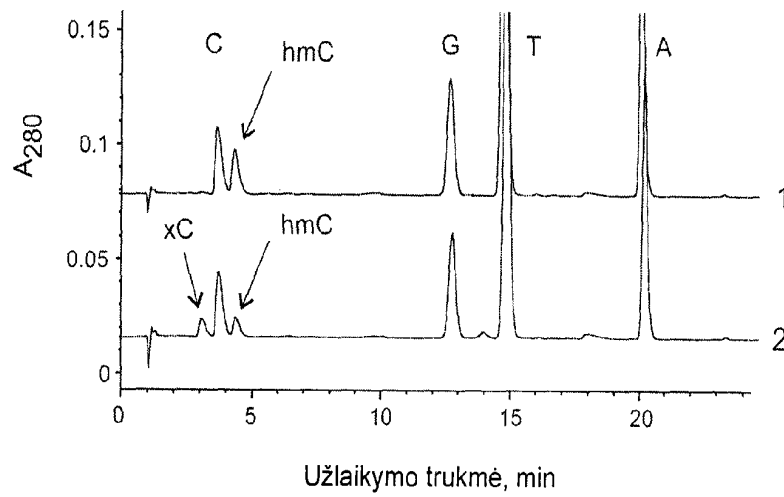


Fig. 2

2/4

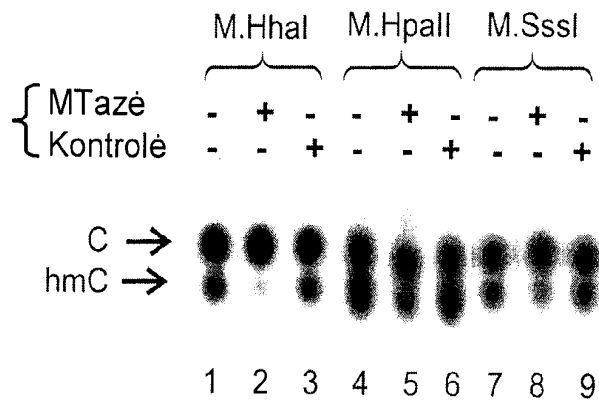


Fig. 3

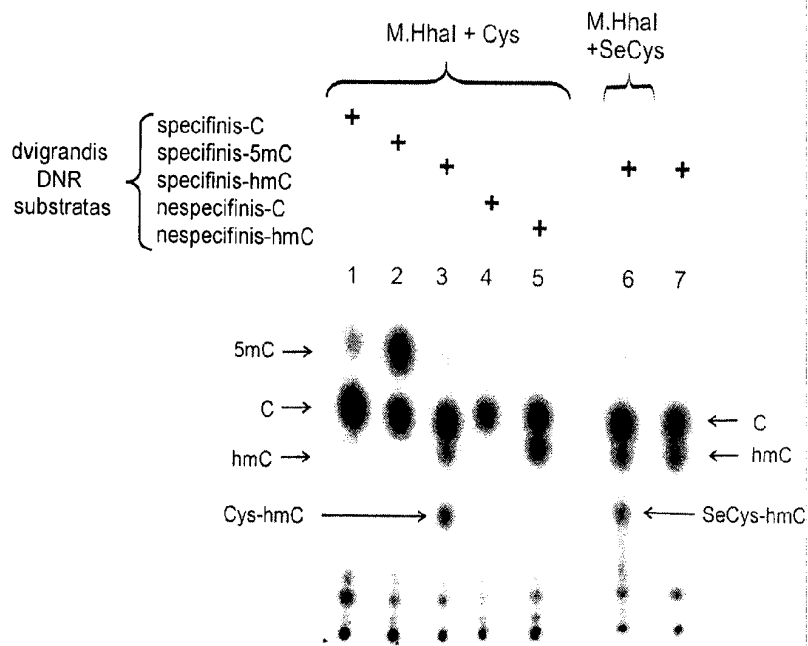


Fig. 4

3/4

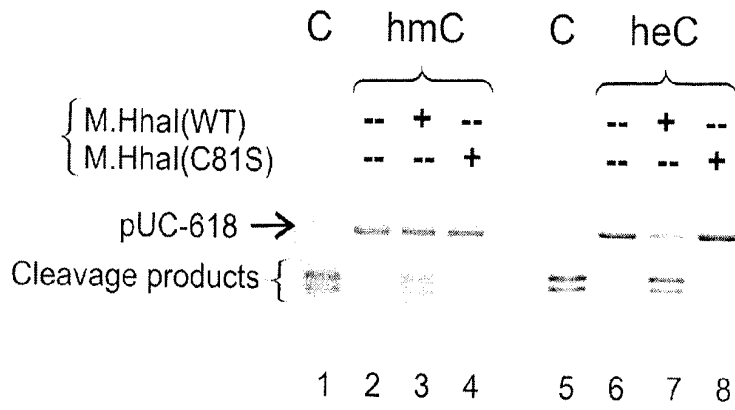


Fig. 5

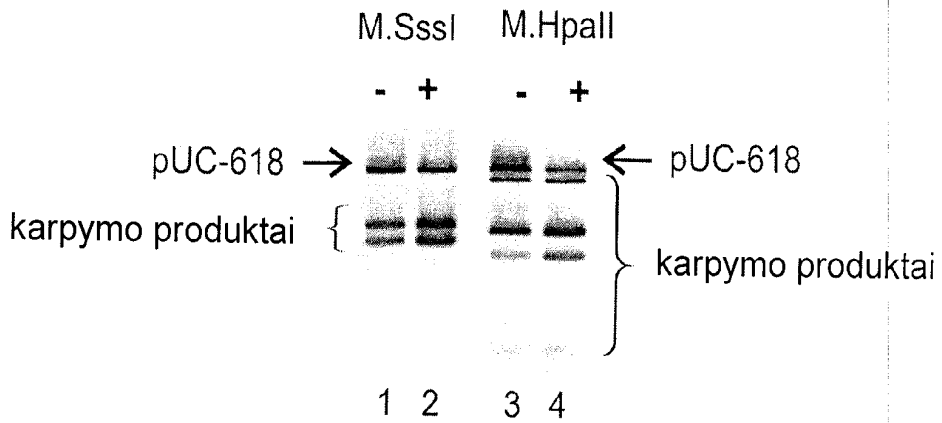


Fig. 6

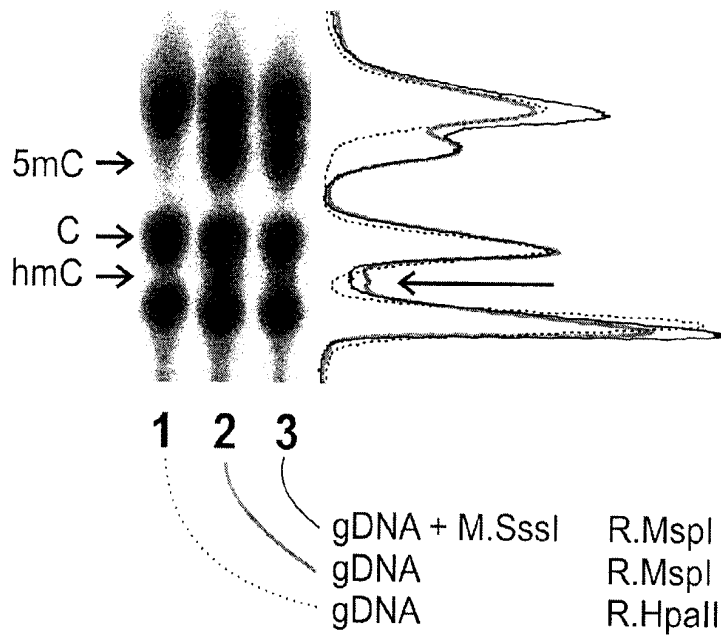


Fig. 7