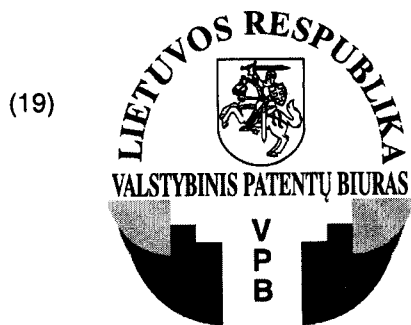




(10) **LT 5708 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patent numeris: **5708** (51) Int. Cl. (2006): **C07H 19/00**
C07H 21/00
A61K 31/435
C12Q 1/68
- (21) Paraiškos numeris: **2009 023**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2009 04 02**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2010 10 25**
- (45) Patent 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
- (73) Patent savininkas:
BIOTECHNOLOGIJOS INSTITUTAS, V. Graičiūno g. 8, LT-02241 Vilnius, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Liudmila GERASIMOVICH, IĮ „Liudmila Gerasimovič, Patentinis patikėtinis”,
Vingrių g. 13-42, LT-01141 Vilnius, LT

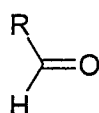
- (54) Pavadinimas:
Biomolekulių derivatizacija nekofaktoriniais junginiais esant metiltransferazėms

- (57) Referatas:

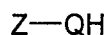
Šis išradimas susijęs su nekofaktorinių junginių, kurių formulės (I) ar (II), kur R ir Z yra nepriklausomai pasirinkti iš H, D, C₁-C₁₂-alkilo, optimaliai C₁-C₄-alkilo, alkeno, alkino, fenilo arba -LX, kur X žymi funkcinę grupę ar reporterinę grupę, prijungtą per jungtuką L, ir QH yra pasirinktas iš -SH, -SeH, -NHNH₂ ar -ONH₂, panaudojimu tiksliniam biomolekulės modifikavimui arba derivatizacijai, kovalentiškai prijungiant juos prie biomolekulės, esant metiltransferazei. Tolimesnis tikslinio modifikavimo ir derivatizacijos būdų vystymas yra biomolekulių tikslinio žymėjimo būdas ir nemetilintų taikinių biomolekulėje nustatymo būdas pagal šį išradimą.

5 Išradimo sritis

Išradimas susijęs su metiltransferazės orientuojamu anglies elektrofilų, pavydžiui aldehydų, kovalentiniu prisijungimu prie biomolekulės bei po to sekančio nuo metiltransferazės priklausomo nukleofilų, pavyzdžiui tiolių, prijungimo prie biomolekulės, būtent apibūdina metiltransferazės orientuojamą prisijungimą prie biomolekulės bet kurio junginio, atitinkančio formules (I) arba (II),



(I)



(II)

kur R ir Z yra nepriklausomai pasirinkti iš H, D, C₁-C₁₂-alkilo, alkeno, alkino, fenilo arba -LX, kur X žymi funkcinę grupę arba reporterinę grupę, prijungtą per jungtuką L, ir QH yra pasirinktas iš -SH, -SeH, -NHNH₂, arba -ONH₂. Šis išradimas taip pat apima biomolekulės tikslinio modifikavimo, derivatizacijos ir žymėjimo būdus, taip pat nemetilintų atpažįstamų sekų biomolekulėje nustatymo būdą ir rinkinį, skirtą šiems būdams atlikti. Visus minėtus išradimo objektus jungia egzogeninių nekofaktorinių junginių, atitinkančių (I) ir (II) formules, kovalentinio prijungimo prie biomolekulės, esant metiltransferazėms, idėja.

Siūlomas išradimas yra paaiškintas pavydžiais naudojant DNR metiltransferazes (MTazes).

Tačiau, jis gali būti naudojamas su RNR ir baltymų metiltransferazėmis, taip pat su metiltransferazėmis, 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. 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.

Terminas „prijungimas“ reiškia cheminį junginių prijungimą susidarant stabiliam kovalentiniam ryšiui (tokiam kaip C-C ryšys, C-S ryšys, C-Se ryšys arba C-N ryšys). Prijungimo reakcija gali būti viso elektrofilo junginio (I) prijungimas taikinio biomolekulėje arba po to sekanti nukleofilo junginio (II) kondensacija, kai modifikuoto taikinio biomolekulėje hidroksilo grupė yra pakeičiama visa junginio (II) molekule.

Terminas „biomolekulė“ reiškia DNR, RNR arba (poli)peptidą. Terminas „(poli)peptidas“ nurodo peptidą arba polipeptidą. Tiksliau, biomolekulė yra chromosominė arba genominė 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, pavyzdžiui, cDNR arba genominė DNR. RNR gali būti, pavyzdžiui, mRNR, hnRNR, tRNR ir t.t.

Terminas „derivatizacija“ reiškia biomolekulės modifikavimą, kovalentiškai prijungiant cheminių junginių fragmentus, pavyzdžiui anglies grandines, chemiškai aktyvias arba reporterines grupes, prie biomolekulių, pavyzdžiui DNR, kitais atžvilgiais nepakeičiant taikinio biomolekulės.

20 Išradimo technikos lygis

Daugumos gyvų organizmų DNR be pagrindinių keturių nukleozidų 2'-deoksicitidino (dC), 2'-deoksiadenozino (dA), 2'-deoksitimidino (dT) ir 2'-deoksiguanosino (dG) dar randami nedideli kiekiai metilintų nukleozidų: 5-metil-2'-deoksicitidino (dC^{metil}), N4-metil-2'-deoksicitidino ir N6-metil-2'-deoksiadenozino. 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 minėtiems nukleotidams (Cheng, (1995) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24, 293-318). 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.

AdoMet kofaktorius yra universalus daugumai gyvuose organizmuose vykstančių metilinimo reakcijų. Šis biologiškai ir chemiškai aktyvus junginys yra sudarytas iš teigiamai įkrauto sulfonio centro, kuris jungia tris į periferiją išeinančias dalis: metilo grupę (kuri yra pernešama),

adenozilo ir homocisteino fragmentus. Adenozilo ir homocisteino fragmentai tarnauja kaip inkaras, kurio dėka kofaktorius yra surišamas konkrečioje metiltransferazės vietoje su teisingai orientuota metilo grupe. Sulfonio centras, kaip manoma, aktyvuoja metilo grupės pernešimą ant nukleofilinių taikinių. Kai kurios metiltransferazės geba aktyvuoti taikinio molekulės įvairiais mechanizmais (Klimasauskas and Lukinavicius (2008) *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. DOI: 10.1002/9780470048672.webc335).

Metiltransferazių gebėjimas vykdyti sekai specifinį biopolimerų kovalentinį modifikavimą gali būti naudojamas biotechnologijoje. Neseniai buvo pranešta apie skirtingas žymėjimo strategijas naudojant DNR metiltransferazes ir trijų tipų sintetinius kofaktorius (Klimasauskas and Weinhold, (2007) *Trends Biotechnol.* 25, 99-104). Viena iš šių strategijų paremta natūralaus kofaktoriaus S-adenozil-L-metionino (AdoMet) metilo ir homocisteino grupių pakeitimu aziridino grupe. Vykstant nuo metilazės priklausomam nukleofiliniam aziridino žiedo atidarymui visa šių AdoMet analogų molekulė yra prijungiama prie taikinio adenino ar citozino bazių DNR. Kai kurių fluoruotųjų prijungimas per lanksčią jungtį tam tikrose adenozilo fragmento padėtyse gali netrukdyti metiltransferazei surišti kofaktorių. Tokie kofaktoriai kaip 8-amino[1''-(N''-dansil)-4''-aminobutil]-5'-(1-aziridin)-5'-deoksiadenozinas (Pljevaljcic ir kt., (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3486-3492) arba 8-amino[1''-(N''-biotinil)-4''-aminobutil]-5'-(1-aziridin)-5'-deoksiadenozinas (Pljevaljcic ir kt., (2004) *Methods Mol. Biol.* 283, 145-161) gali būti naudojami biomolekulių žymėjimui sekai specifiškai (Pljevaljcic et al., (2004) *ChemBioChem* 5, 265-269). Taip pat yra pasklebti aziridino dariniai (WO0003587, publ. 2000), kurie gali būti naudojami kaip kofaktoriai S-adenozil-L-metionino metiltransferazėms. Žymėjimas yra vykdomas naudojant nuo AdoMet priklausomas metiltransferazes, o adenozino fragmentas tarnauja molekuliniu inkaru kofaktoriaus surišime.

Antra klasė yra AdoMet N-haloetilo analogai, pavyzdžiui 5'-(diaminobutirio rūgšties)-N-jodoetil-5'-deoksi-8-azido-adenozinas arba 5'-[(N-jodoetil)propargilamino]-5'-deoksi-adenozinas (Zvag ir kt., (2006) *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2760-2761). Šie junginiai tiek struktūriniu, tiek mechanistiniu požiūriu yra panašūs į aziridino analogus. Metiltransferazės perkelia visą kofaktoriaus molekulę ir prijungia ją per jodoetilo grupę prie taikinio citozino arba adenino DNR (manoma, kad prijungimas vyksta per tarpinę stadiją, atsidarant aziridino žiedui). Šie analogai turi inkarinį adenozino fragmentą ir gali turėti šoninę homocisteino grandinę. Remiantis šiais analogais buvo pasiūlyta keletas dviejų stadijų žymėjimo/konjugacijos metodų. Pavyzdžiui,

US7465544, publ. 2007, atskleidžia reaktyvias grupes, kurios gali būti prijungtos prie kofaktoriaus analogų ir taip pat gali būti panaudotos kaip detektuojamos žymės.

5 Trečia AdoMet analogų grupė prie sulfonio aktyvaus centro vietoje metilo grupės turi ilgesnes alilo ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) ar propargilo ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) grupes. Šie kofaktoriai yra vadinami dvigubai
10 aktivuoti AdoMet analogai, nes jie turi aktyvuojantį dvigubą arba trigubą ryšį nutolusi nuo perkeliama anglies atomo per beta-poziciją (Dalhoff ir kt., (2006) *Nat. Chem. Biol.* 2, 31-32). Adenozino ir homocisteino fragmentai yra kofaktoriaus surišimo molekuliniai inkarai, ir tik kofaktoriaus analogo molekulės dalis (prie sulfonio centro prijungta aktyvuota šoninė grandinė)
15 yra perkeliama ant taikinio molekulės. Šie kofaktoriai gali būti naudojami nuo metiltransferazių priklausomam dviejų stadijų plazmidinės DNR žymėjimui (Lukinavicius ir kt., (2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2758-2759). Tokie analogai yra aprašyti WO 2006/108678, publ. 2006, ir suteikia galimybę, panaudojant metiltransferazes, perkelti trumpesnes linijines grupes (molekulės dalis) ant taikinių biomolekulių, įgalinant pažymėti DNR.

15 Tačiau žymėjimo strategijos panaudojant aprašytus kofaktorių analogus (tame tarpe ir dvigubai aktyvuotus kofaktorius) turi trūkumų:

1) Žymėjimo reakcijų chemija riboja grupių pasirinkimą, ypač mažų, kurios bus prijungtos prie taikinio biomolekulių. Minimalus pernešamas vienetas yra visas kofaktorius naudojant N-
20 adenozilaziridino arba N-haloetilo analogus. Dvigubai aktyvuotiems kofaktoriams minimalus pernešamas fragmentas yra 3 anglies atomų linijinė grandinė (alilo arba propargilo) plius funkcinė grupė; tačiau dažniausiai naudojami didesni perkeliama fragmentai (Klimasauskas ir Weinhold, (2007) *Trends Biotechnol.* 25, 99-104). Tai riboja žymėjimo reakcijų galimybes tais atvejais, kai reikalingi tik minimalūs originalių biomolekulių pokyčiai. Dar daugiau, nei dydžio
25 apribojimas, žymint biomolekules yra svarbūs tam tikri perkeliama grupės struktūros reikalavimai. Iki šiol nebuvo žinoma metodų, kurie leistų sekai specifiskai ant citozinų DNR perkelti, pavyzdžiui, hidroksimetilo, 1-hidroksietilo, 2-chlor-1-hidroksietilo, 2-hidroksietiltiometilo grupes. Taigi, žymėjimo būdai, kurie leistų prijungti dar trumpesnius fragmentus arba būdai, kurie išplečia egzistuojančių linkerių/funkcinių grupių pasirinkimą, yra labai reikalingi.

30 2) Visų AdoMet analogų tipai yra chemiškai sudėtingos struktūros, o jų sintezė yra brangi (daugiapakopės sintezės procedūros, įskaitant daug gryninimo stadijų (Pljevaljic ir kt., (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3486-3492; Pljevaljic ir kt., (2004) *Methods Mol. Biol.* 283, 145-161; Lukinavicius ir kt., (2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2758-2759). Taigi, žymėjimo reagentų sukūrimas gali būti ribotas dėl didelės jų kainos.

3) N-adenozilaziridino ir dvigubai aktyvuoti AdoMet analogai chemiškai yra gana nestabilūs ir fiziologinėmis sąlygomis pasižymi trumpais gyvavimo laikais (C. Dalhoff, (2005) *Dokt. Diss, Aachener Beiträge zur Chemie*, Bd. 63; ISBN 3-86130-767-7). Tai gali riboti žymėjimo reakcijų produktyvų inkubacijos laiką iki 1-2 val. AdoMet kofaktorių analogai turi būti laikomi specialiuose buferiuose žemose temperatūrose (nuo -20°C iki -70°C). Šie apribojimai gali būti lemiami, kai žymėjimo reagentus reikia laikyti tam tikrą laiką aplinkos temperatūroje arba neužšaldytus (šaldytuve).

4) Visos anksčiau žinomos žymėjimo reakcijos remiasi stipriu kofaktoriaus analogų susirišimu su metiltransferazėmis. Taigi žymėjimo reakcijos metu susidaro šalutiniai produktai, kurie slopina reakciją arba dėl stipraus metiltransferazių rišimosi su substrato-kofaktoriaus konjugatais (N-aziridino ir N-haloetilo analogai), arba dėl natūralaus reakcijos produkto S-adenozil-L-homocisteino (dvigubai aktyvuoti kofaktoriai) susidarimo. Metiltransferazės šiuos šalutinius produktus riša neproduktyviai, o tai gali riboti fermento žymėjimo reakcijos apskaitą iki vienos ar kelių atitinkamai (Klimasauskas ir Weinhold, (2007) *Trends Biotechnol.* 25, 99-104). Tai savo ruožtu sumažina žymėjimo reakcijos efektyvumą ir reikalauja didelių žymėjimo reagentų kiekių (tiek kofaktoriaus analogų, tiek metiltransferazių) bei prailgina inkubacijos laikus.

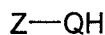
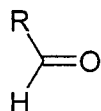
5) Dvigubai aktyvuotų kofaktorių su ilgomis pernešamomis šalutinėmis grandinėmis naudojimas dažnai nėra efektyvus su laukinio tipo metiltransferazėmis dėl pernešamos šalutinės grandinės padidintų erdvinių trukdžių. Vienas iš problemos sprendimo būdų gali būti kryptinga metiltransferazių kofaktoriaus surišimo kišenės mutagenezė (Lukinavicius ir kt., (2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2758-2759). Vis dėlto nėra aišku ar šis metodas bus sėkmingas su kitais fermentais, nes jis kol kas yra sėkmingai išbandytas tik su vienos klasės metiltransferazėmis. Tai gali riboti šio metodo taikymą, ypač jo išplėtimą kitoms nuo AdoMet priklausančių metiltransferazių klasėms.

Taigi, yra pageidaujama sukurti metodus, kurie (i) leistų prie biomolekulių sekai specifiskai kovalentiškai prijungti trumpas funkcines grupes (C₁–C₄ grandines) ir (ii) naudotų chemiškai paprastus ir nebrangius junginius.

Išradimo esmė

Šių problemų sprendimas pasiekiamas, realizuojant siūlomo išradimo apibrėžties 1-19 punktus.

Pagrindinė išradimo idėja yra panaudoti nekofaktorinius junginius, kurių formulės (I) arba (II),



(I)

(II)

kur R ir Z yra nepriklausomai pasirinkti iš H, D, C₁–C₁₂-alkilo, optimaliai C₁–C₄-alkilo, alkeno, alkino, fenilo arba -LX, kur X žymi funkcinę arba reporterinę grupę, prijungtą per jungtuką L, bei QH yra pasirinktas iš -SH, -SeH, -NHNH₂, arba -ONH₂, biomolekulės tiksliniam modifikavimui arba derivatizacijai, kovalentiškai prijungiant prie biomolekulės, esant nukreipinačiajai metiltransferazei.

Optimaliai R yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš -H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂Cl, -CH₂N⁺(CH₃)₃Cl, -CH₂OCH₂C₆H₅; QH optimaliai yra -SH, ir Z yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš -CH₂CH₂OH, -CH₂CH(CO₂H)NH₂ ir -5'-adenozilo.

Buvo atrasta, jog šie junginiai, esant metiltransferazei, yra selektyviai prijungiami specifiniuose biomolekulių lokusuose, kurie yra natūralūs šias reakcijas atliekančių metiltransferazių taikiniai. Vienas iš substratų aktyvuojančios metiltransferazės pavyzdžių yra pirimidino-5 specifinės metiltransferazės, kurios katalizuoja metilo grupės pernešimą į 5-tą citozino ar uridino liekanos padėtį DNR, RNR arba laisvose nukleotiduose, susidarant laikinam kovalentiniam ryšiui tarp baltymo ir 6-to C atomo pirimidino žiede.

Siūlomo išradimo objektas yra biomolekulės tikslinio modifikavimo būdas, apimantis biomolekulės inkubavimą su junginiu (I) arba paeiliui su junginiais (I) ir (II), esant metiltransferazei ir sąlygomis, kuriomis vyksta šio junginio/junginių prisijungimas prie taikinio molekulės.

Šis išradimas taip pat apima tikslinio biomolekulės žymėjimo ir tikslinės modifikacijos būdus, kuriuose naudojama šiame išradime aprašyta biomolekulės tikslinio modifikavimo stadija.

Siūlomas išradimas taip pat susijęs su nemetilitų taikinių biomolekulėje nustatymo būdu, apimančiu biomolekulės tikslinio modifikavimo stadiją, kovalentiškai prijungiant nekofaktorinį

junginį (I) arba paeiliui junginius (I) ir (II) prie minėtos biomolekulės, esant nukreipiančiai metiltransferazei.

Galiausiai, šio išradimo objektu yra rinkinys, apimantis metiltransferazę ir nekofaktorinį junginį (I) arba junginį (I) ir junginį (II), skirtas atlikti bet kurį anksčiau paminėtų būdų.

5

Brėžinių aprašymas

Siekiant iliustruoti pagrindinius šio išradimo požymius šis aprašymas apima:

Fig. 1: Fermentiška sufragmentuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido atvirkščių fazių HPLC analizė po inkubacijos su M.HhaI ir junginiu (I). 13 μ M I:II dvigrandės DNR ir 15 μ M M.HhaI buvo inkubuota su 13 mM R1-CHO (takelis 4), 800 mM R2-CHO (takelis 3), 200 mM R3-CHO (takelis 6), 200 mM R4-CHO (takelis 2) or 200 μ M AdoMet (takelis 1) 1 valandą kambario temperatūroje. Kontrolinės reakcijos (takeliai 5 ir 7) buvo inkubuojamos be reagento ir M.HhaI. dA takelyje 2 ženklinama N6-eteno-2'-deoksiadenoziną. HPLC elucijos tirpalas A buvo 20 mM amonio formiatas, pH 3.5. Smailes nurodančios rodyklės pažymi naujus modifikacijos produktus. Cheminė grupė -CH(R)OH yra prijungta prie citozino C5 atomo, kur R1 = -H, R2 = -CH₃, R3 = -CH₂CH₃, R4 = -CH₂Cl.

Fig. 2: Fermentiška sufragmentuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido atvirkščių fazių HPLC analizė po inkubacijos su M.HhaI ir junginiais (I) ir (II). 13 μ M I:II dvigrandės DNR ir 15 μ M M.HhaI buvo inkubuota su 13 mM R1-CHO 40 min (takelis 2) ir po to pridėta junginio (II) iki galutinės koncentracijos 300 mM Z1-SH (takelis 3), 50 mM Z2-SH (takelis 4) arba 400 μ M Z3-SH (takelis 5) ir inkubuota 1 val kambario temperatūroje. Kontrolinė reakcija (takelis 1) buvo inkubuota be M.HhaI. HPLC elucijos tirpalas A buvo 20 mM amonio acetatas, pH 5.5. Smailes nurodančios rodyklės pažymi naujus modifikacijos produktus. Cheminės grupės -CH(R)OH ir -CH(R)SZ yra prijungtos prie citozino C5 atomo, kur R1 = -H, Z1 = -CH₂CH₂OH, Z2 = -CH₂CH(CO₂H)NH₂, Z3 = -5'-adenozilas.

Fig. 3: Fermentiška sufragmentuotų specifinio, metilinto ir nespecifinio dvigrandžių oligonukleotidų 2'-deoksicitidin-5'-monofosfatų žymėtų ³³P TLC analizė po inkubacijos su M.HhaI. 20 nM dvigrandės DNR III:IV su pažymėtu ³³P taikinio citozinu (specifinė, takeliai 1, 4, 7), M.HhaI užmetilintos III:IV (metilinta, takeliai 2, 5, 8) arba nespecifinės dvigrandės DNR VII:VIII (nespecifinė, takeliai 3, 6, 9) buvo inkubuojama su 125 nM M.HhaI (takeliai 1-9) ir 13 mM R1-CHO (takeliai 4-6) arba 800 mM R2-CHO (takeliai 7-9) 1 val kambario temperatūroje.

Pilkos rodyklės nurodo taikinio nukleotido naujus modifikacijos produktus. Cheminė grupė – CH(R)OH yra prijungta prie dCMP C5 atomo, kur R1 = -H, R2 = -CH₃.

5 **Fig. 4:** Fermentiškai sufragmentuoto dvigrandžio oligonukleotido taikinio 2'-deoksicitidin-5'-monofosfatų žymėtu ³³P TLC analizė po inkubacijos su M.HhaI. 20 nM dvigrandės DNR III:IV ir 125 nM M.HhaI buvo inkubuota su 200 μM AdoMet (takelis 3), 13 mM R1-CHO (takelis 4), 800 mM R2-CHO (takelis 5), 200 mM R3-CHO (takelis 6), 100 mM R5-CHO (takelis 8) arba 100 mM R6-CHO (takelis 7) 1 valandą kambario temperatūroje. Kontroliniuose takeliuose nebuvo pridėta M.HhaI (takelis 1) arba reagento (takelis 2). Rodyklės nurodo naujus modifikacijos
10 produktus. Cheminė grupė yra prijungta prie dCMP C5 atomo, kur R1 = -H, R2 = -CH₃, R3 = -CH₂CH₃, R4 = -CH₂Cl, R5 = -CH₂N⁺(CH₃)₃, R6 = -CH₂OCH₂C₆H₅.

Fig. 5: Fermentiškai sufragmentuoto dvigrandžio oligonukleotido taikinio 2'-deoksicitidin-5'-monofosfatų žymėtu ³³P TLC analizė po inkubacijos su M.HhaI ir junginiais (I) ir (II). 40 nM
15 dvigrandės DNR III:IV ir 250 nM M.HhaI buvo inkubuota su 13 mM R1-CHO 1 valandą kambario temperatūroje (pirmas žingsnis). R1-CHO modifikuota DNR buvo inkubuojama su 750 nM M.HhaI 2 val be (takeliai 3 ir 4) arba su reagentais: 300 mM Z1-SH (takelis 4), 50 mM Z2-SH (takelis 5) arba 400 μM Z3-SH (takelis 6) (žingsnis 2). Kontrolinis takelis 1 buvo inkubuojamas be M.HhaI. Rodyklės nurodo naujus modifikacijos produktus. Cheminė grupės –
20 CH(R)OH arba -CH(R)SZ yra prijungiamos prie dCMP C5 atomo, kur R1=-H, Z1=-CH₂CH₂OH, Z2 = -CH₂CH(CO₂H)NH₂, Z3 = -5'-adenozilas.

Fig. 6: Fermentiškai sufragmentuoto dvigrandžio oligonukleotido taikinio 2'-deoksicitidin-5'-monofosfatų žymėtu ³³P TLC analizė po inkubacijos su M.SssI, M.HpaII ar M.AluI ir junginiu (I).
25 20 nM (a), 40 nM (b) arba 105 nM (c) dvigrandės DNR VII:VIII (a, b) arba IX:X (c) ir 0.8 u/μl M.SssI (a), 600 nM M.HpaII (b) arba 10 u/μl M.AluI (c) buvo inkubuojama su 200 μM AdoMet (a, takelis 3), 13 mM R1-CHO (a, takelis 4; b, takelis 2), 800 mM R2-CHO (a, takelis 5; b, takelis 3; takelis 2), 200 mM R3-CHO (a, takelis 6) arba 100 mM R6-CHO (a, takelis 7) vieną valandą kambario temperatūroje. Kontroliniuose takeliuose nebuvo pridėta MTazės (a-c, takelis
30 1) arba reagento (a, takelis 2). Rodyklėmis parodyti nauji modifikacijos produktai. Cheminė grupė -CH(R)OH yra prijungta prie dCMP C5 atomo, kur R1 = -H, R2 = -CH₃, R3 = -CH₂CH₃, R4 = -CH₂Cl and R6 = -CH₂OCH₂C₆H₅.

Fig. 7: 618 bp PGR fragmento, inkubuoto su metiltransferazės ir junginių (I), restriktinė
35 analizė. 100 nM 618 bp PGR fragmento (1 M.HhaI atpažinimo taikiny, 32 M.SssI atpažinimo

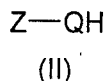
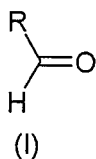
taikiniai, 2 M.HpaII atpažinimo taikiniai) ir 50 nM M.HhaI (takeliai 2, 4), 500 nM M.SssI (takelis 5) arba 1000 M.HpaII (takelis 7) buvo inkubuota su 13 mM R1-CHO (takeliai 3-7) arba 800 mM R2-CHO (takeliai 1, 2) 1 valandą kambario temperatūroje. Po to modifikuota DNR buvo fragmentuota su restrikcijos endonukleaze R.Hin6I (takeliai 1-5) arba R.HpaII (takeliai 6, 7) ir
5 analizuota agaroziniame gelyje. Kontroliniai takeliai buvo inkubuojami be MTazių (takeliai 1, 3, 6) arba be MTazės ir reagento (takelis 8)

Fig. 8: Bakteriofago λ DNR restrikcinė analizė po metiltransferazės modifikacijos su reagentu (I). λ DNR (0.82 μ M M.HhaI taikinių), M.HhaI (4 μ M), kofaktorius ((200 μ M AdoMet, takelis 5) arba 13 mM R1-CHO (takeliai 6–9) buvo inkubuoti 1 valandą kambario temperatūroje. Po to, modifikuota DNR buvo hidrolizuota restrikcijos endonukleazėmis R.Hin6I (takeliai 1, 5, 6), R.AluI (takeliai 2, 7), R.MspI (takeliai 3, 8) arba R.BsuRI (takeliai 4, 9) ir analizuota agaroziniame gelyje. Takelis M, DNR ilgio žymuo (GeneRuler™ DNA Ladder, Fermentas Life Sciences); takelis C, bakteriofago λ DNR kontrolė. M.HhaI modifikuoja DNR reagentu HCHO
15 savo atpažinimo sekose, nes hidrolizė yra blokuojama GCGC taikiniuose (takelis 6), bet ne AGCT, CCGG ar GGCC sekose (takeliai 7–9).

Fig. 9: pUC19 plazmidinės DNR žymėjimas sekai specifiškai (pagrindinio principo įrodymas). pUC19 plazmidė buvo modifikuota su R1-CHO ir Z2-SH veikiant metiltransferazei ir po to inkubuota su fluoresceinu N-hidroksisukcinimodo esteriu (Fluoresceinas-NHS). Žymėta DNR buvo hidrolizuota R.FspBI endonukleaze bei 4 hidrolizės fragmentai F1-F4 analizuoti 2% agaroziniame gelyje. Gelis buvo nuskanuotas naudojant 473 nm lazerį (kairė pusė), taip vizualizuojant fluoresceiną, o po to DNR fragmentai buvo nudažyti etidžio bromidu (dešinė pusė). Takelis 1, kontrolė be M.HhaI. Takelis 2 kairėje pusėje rodo, jog fluorescencijos intensyvumas keturiuose fragmentuose pasiskirto pagal M.HhaI taikinių kiekį (7, 7, 1 ir 2 atitinkamai; taikiniai parodyti pilkais rutuliukais). Tai parodo sekai specifinį plazmidės pažymėjimą.

Detalus išradimo aprašymas

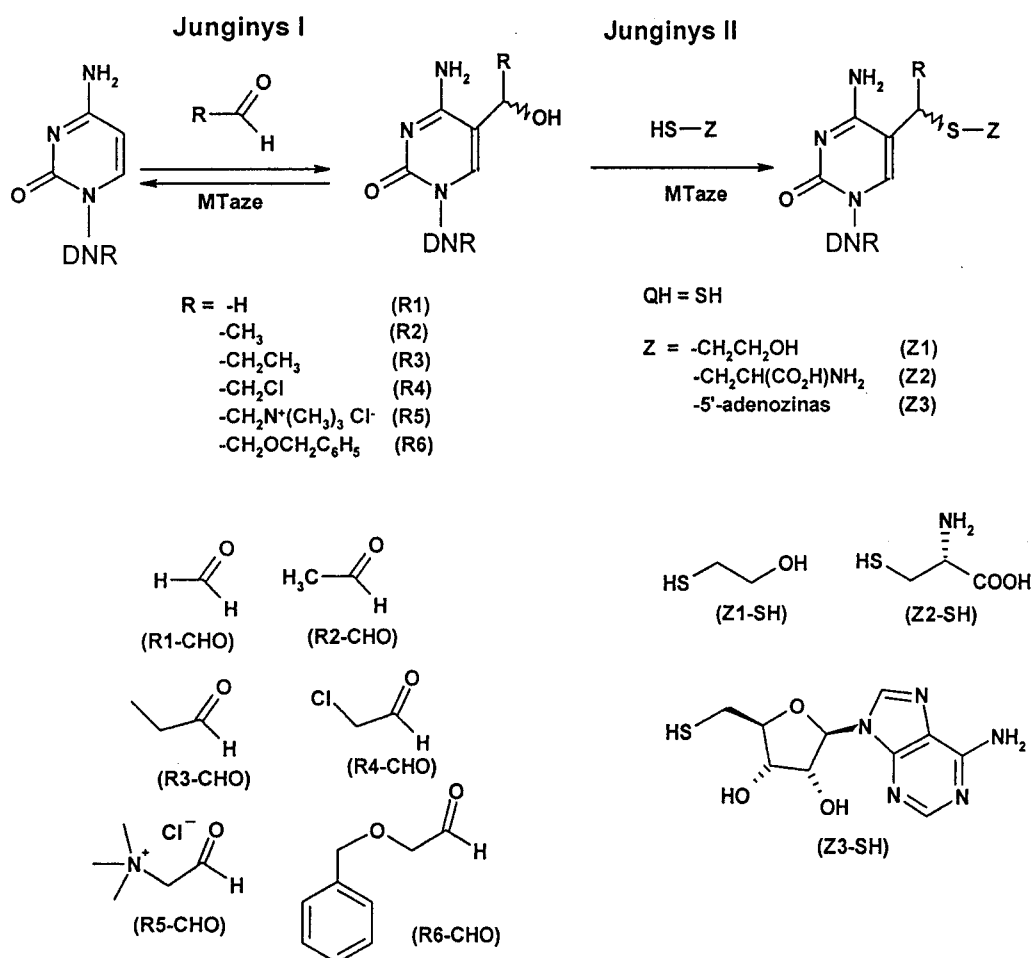
30 Pagrindinis šio išradimo objektas yra nekofaktorinių junginių, kurių formulės (I) ir (II),



kur R ir Z yra nepriklausomai pasirinkti iš H, D, C₁–C₁₂-alkilo, optimaliai C₁–C₄-alkilo arba -LX , kur X žymi funkcinę grupę arba reporterinę grupę, kuri prijungta per jungtuką L, ir QH yra pasirinktas iš -SH, -SeH, -NHNH₂ arba -ONH₂, panaudojimas biomolekulės tiksliniam modifikavimui arba derivatizacijai, kovalentiškai prijungiant juos prie biomolekulės, esant nukreipiančiajai metiltransferazei.

Šio išradimo taikinio molekulės sekai specifinio modifikavimo bendras principas yra aiškus iš Schemos 1 (žemiau), kuri parodo citozino liekanų DNR tikslinio modifikavimo galimybes, esant DNR citozino-5 metiltransferazėms (MTazėms).

Shema 1. Šiame išradime aprašytas sekai specifinis DNR modifikavimas nekofaktoriniu junginiu (I) arba paeiliui junginiais (I) ir (II).



Ši nauja sekai specifinė biomolekulių modifikacijos reakcija turi keletą privalumų, lyginant su anksčiau aprašytais būdais:

- šiame išradime aprašyti junginiai užtikrina naujas DNR modifikavimo galimybes, įterpiant įvairias funkcinės ir reporterinės grupes (ypač mažas grupes), kurių įterpimas neįmanomas, naudojant anksčiau aprašytus žinomus AdoMet analogus;
- šio išradimo junginiai chemiškai yra paprasti ir žymiai pigesni;
- šie junginiai yra žymiai stabilesni ir dėl savo mažos kainos ir prieinamumo, jei reikia, gali būti greitai pristatyti dideliais kiekiais;
- prijungimo reakcijos metu nesusidaro slopinantys šalutiniai reakcijos produktai, kurie galėtų sudaryti stabilius kompleksus su metiltransferazėmis ;
- šie junginiai yra paprasti bei nedideli ir reikalauja mažesnio arba iš viso nereikalauja nukreipiančiosios metilattransferazės modifikavimo.

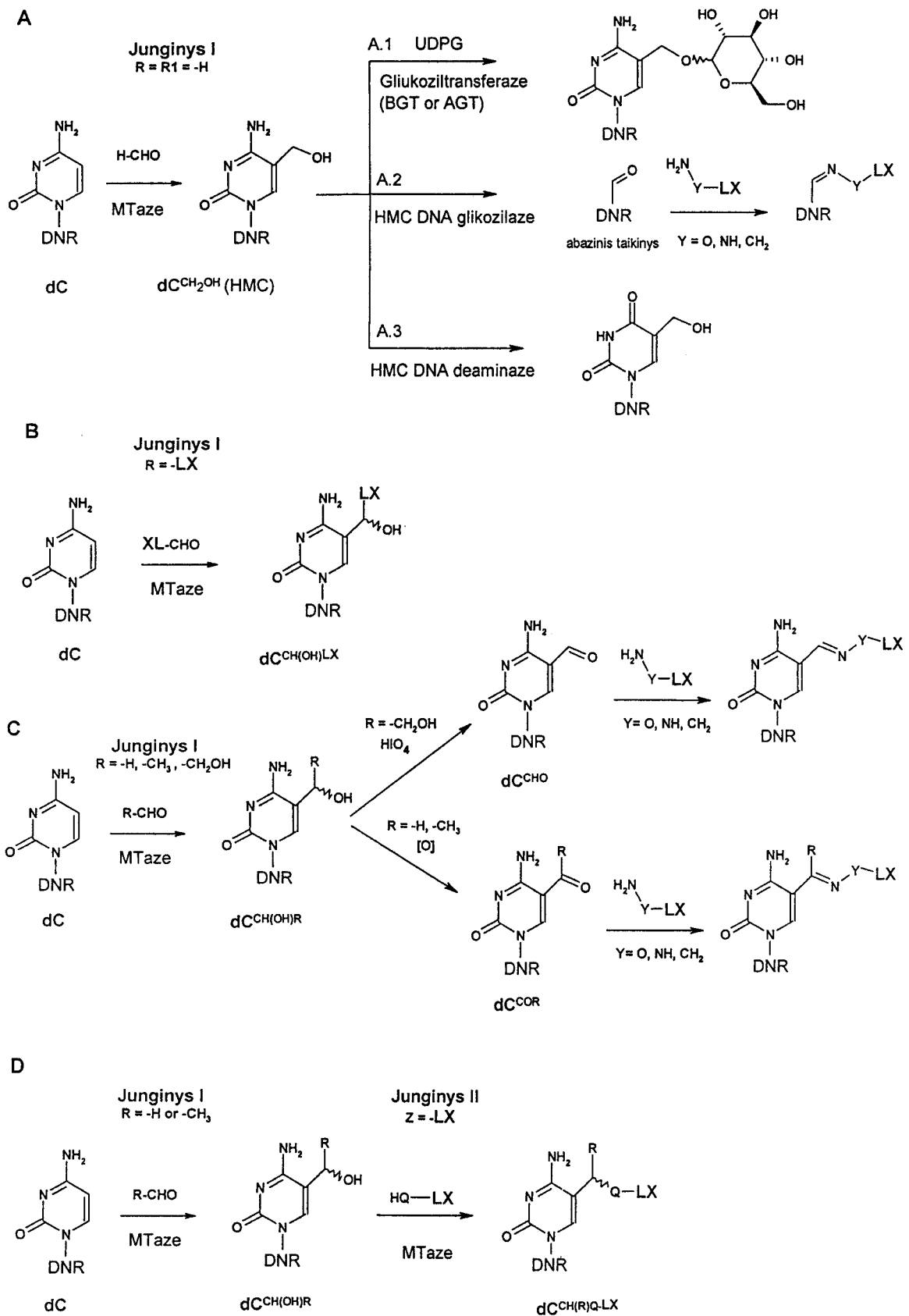
Pagrindžiant šio išradimo naujumą ir išradimo lygį, pažymėtina, kad:

- 1) Junginiai, kurių formulės (I) ir (II), nėra panašūs nė į vieną žinomą AdoMet analogų klasę ir nėra *bona fide* nuo AdoMet priklausomų metiltransferazių kofaktoriai; jie neturi inkarinių fragmentų, tokių kaip adenzinas ar homocisteinas, dėl kurių formuojasi diskretus specifinis kofaktoriaus ir metiltransferazės kompleksas (Pignot ir kt., (2000) *Eur. J. Org. Chem.* 549–555; Merkiene ir Klimasauskas (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, 307–315; Klimasauskas ir Weinhold, (2007) *Trends Biotechnol.* 25, 99–104). Junginių, kurių formulės (I) ir (II) (atitinkamai, aldehido ir tiolio), reaktyvi grupė skiriasi nuo visų anksčiau aprašytų AdoMet analogų klasių (aziridino, haloetilamino, alkilsulfonio).
- 2) Šiame išradime aprašyta pirminė reakcija yra nauja ir nėra akivaizdi šios srities specialistams, nes reakcijos tipas (nukleofilinis prijungimas) yra kitoks nei S_N2 reakcijos (nukleofilinis pakeitimas), kuris ir yra natūraliai naudojamas visų metiltransferazių, įskaitant visų žinomų AdoMet analogų reakcijas. Antrinė kondensacijos reakcija su nukleofilais, pavyzdžiui tioliais (QH = SH), yra visiškai nauja reakcija su DNR.
- 3) Reakcijos metu DNR molekulėje susidarančios funkcinės grupės (5-alfa-hidroksialkildicitozinas ir 5-alkildicitozinas) yra naujos ir negali būti įvestos sekai specifiskai jokiais kitais žinomais būdais. 5-hidroksimetildicitozinas (HMC) gali būti įterptas į DNR atsitiktinai, naudojant DNR polimerazę ir atinkamo nukleozido 5'-trifosfatą (Kutter ir Wiberg (1969) *J. Virol.* 4, 439–453), arba gali būti įterptas specialiose padėtyse trumpose DNR chemiškai sintetinant oligodeoksiribonukleotidus *de novo* (Tardy-Planechaud ir kt., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25,

553–558). HMC įterpimas specifinėse sekose ilgose gamtinėse DNR gali būti pasiektas tik naudojant šiame išradime aprašytą būdą.

- Šio išradimo optimaliame įgyvendinimo variante R apima vandenilį, D, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ir $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, ir Z apima $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})\text{NH}_2$ ir -5'-adenoziną. Tačiau šios srities specialistams yra aišku, kad R taip pat lengvai gali apimti C_1 – C_{12} alkilą, alkeną, alkiną, fenilą ar LX, o Q – mažiausiai $-\text{SeH}$, $-\text{NHNH}_2$ ir $-\text{ONH}_2$.
- Kitame šio išradimo įgyvendinimo variante L yra $-\text{CH}_2-$ arba $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ junginyje (I) bei L yra $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})-$ ar -5'-adenozinas junginyje (II). Tačiau šios srities specialistams turėtų būti aišku, kad L taip pat apima ir kitas tinkamas jungiančias grupes, tokias kaip linijinius, ciklinius ar aromatinius fragmentus ir kombinacijas, nebūtinai prijungtus per $-\text{NHCO}-$, $-\text{O}-$ ar $-\text{S}-$ jungtukus, (poli)etilenglikolines grandines $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$, $n = 1$ – 100 , ir t.t.
- Shemoje 2 žemiau yra išvardinti keturi bendri sekai specifinės DNR derivatizacijos ir žymėjimo principai (A-D).

Schema 2: Bendri sekai specifinio metilazės orientuoto DNR žymėjimo ir derivatizacijos principai (A-D), panaudojant junginius (I) ir (II), pagal siūlomą išradimą.



Metodas A: Veikiant DNR formaldehidu (junginys (I), $R=H$) ir esant nukreipiančiajai DNR citozino-5 metiltransferazei, DNR sekai specifiškai gaunamas 5-hidroksimetilcitozinas (hmC). Šis unikalus DNR modifikavimas gali būti daug kur naudingai pritaikomas. Pirmiausiai, šis modifikavimas gali būti naudingas, jei formaldehidas yra izotopiškai žymėtas, pavyzdžiui ^{14}C , ^{13}C , 3H (T), 2H (D) arba ^{18}O branduoliu. ^{14}C ir 3H branduoliai yra radioaktyvūs ir gali būti detektuojami beta emisijos skaičiuotuvais, autoradiografija ar fluorografija. ^{13}C ir/arba 2H branduolių įterpimas į DNR gali būti naudojamas DNR molekulių, turinčių gamtinį izotopų pasiskirstymą, BMR tyrimuose. 5-hidroksimetilo grupės gali būti redukuotos $NaBH_4$ ar $Na(CN)BH_3$ (arba jų izotopiškai modifikuotais dariniais) iki 5-metilo grupių. Tokiu būdu gaunamos įvairios izotopinės kombinacijos, tinkamos biomolekulių BMR analizei. Visi anksčiau minėti branduoliai gali būti naudojami izotopiniam biomolekulių žymėjimui masių spektrometrijos tyrimuose.

Be to, hmC radikalai DNR gali būti toliau modifikuojami, naudojant keletą fermentinių sistemų. Pavyzdžiui:

- 1) BGT ir AGT gliukoziltransferazės, išskirtos iš T4 bakteriofagų, ir kiti panašūs fermentai gali katalizuoti gliukozės liekanos pernešimą nuo kofaktoriaus uridino-difosfogliukozės (UDPG) (Lariviere ir Morera (2002) *J. Mol. Biol.* 324, 483-490; Lariviere ir kt., (2005) *J. Mol. Biol.* 352, 139-150). Tokie glikozilinti fragmentai gali būti detektuojami naudojant specifinius antikūnus (Ignashov, (1976) *Mol. Biol. (Mosk)*, 10, 682-685).
- 2) hmC specifinė glikozilazė, kuri rasta žinduolių ląstelėse, gali iškirpti hmC bazę, susidarant abaziniam DNR taikiniui. Veikiant piperidinu, ties tokiomis abazinėmis pažaidomis, DNR grandinėje yra įvedamas trūkis arba abaziniai taikiniai gali būti derivatizuoti aldehydams specifiniais junginiais (Cannon ir kt., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 1173-1179).
- 3) apie ląstelių fermentų, kurie katalizuoja hmC hidrolitinį deamininimą DNR iki 5-hidroksimetiluracilo, egzistavimą byloja keletas straipsnių (Rusmintrati and Sowers (2000) *PNAS* 26, 14183-14187). Apdorojimas tokiais fermentais ir po to einantis DNR sekos nustatymas duotų informacijos apie hmC liekanų padėtis DNR, lyginant T ir C nemodifikuotos ir modifikuotos DNR takelius (Schema 2A).

Metodas B. Galima paruošti junginį (I), kuris turėtų tinkamą funkcinę arba reporterinę grupę X, prijungtą per jungtuką L ($R= -LX$). Toks junginys (I) galėtų būti prijungtas prie taikinio molekulės esant nukreipiančiajai metiltransferazei (Schema 2B). Cheminė reaktyvi grupė X tuomet gali būti naudojama kovalentiniam tinkamų junginių, turinčių reporterinę grupę, prijungimui (dviejų

stadijų žymėjimas, žiūrėti žemiau) arba gali būti veikiami kitu reagentu, inicijuojant antrinį vidinį modifikavimą DNR molekulės taikinio vietoje arba greta modifikuotos bazės. Naudingas antrinis modifikavimas apima bazių poravimosi savybių pasikeitimą, bazės iškirpimą, grandinės perkirpimą arba grandinių skersinį susiuvimą.

5

Metodas C. Veikiant acetaldehidu arba formaldehidu (junginys (I), $R = CH_3$, arba H) ir esant DNR citozino-5 metiltransferazei, DNR vyksta sekai specifinis 5-(1-hidroksi)etilo arba 5-hidroksimetilo grupių susidarymas, atitinkamai taikinio citozinuose DNR. Modifikuotos DNR antrinis modifikavimas, veikiant švelniu oksidatoriumi, pavyzdžiui MnO_2 (LaFrancois ir kt. (1998) *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 75-83), konvertuotų į atitinkamai į 5-acetilo ir 5-formilo grupes. Antraip, veikiant glikolio aldehidu (junginys (I), $R = -CH_2OH$) ir esant nukreipiančiajai metiltransferazei, sekai specifiskai ant taikinio citozinų DNR susidaro 5-(1,2-dihidroksi)etilo grupės. Šios 1,2-diolinės funkcinės grupės gali būti naudojamos cheminio ligavimo reakcijose (žiūrėti toliau). Modifikuotos DNR antrinio modifikavimo perodato rūgštimi (HIO_4) arba švino tetraacetatu ($Pb(OAc)_4$) dėka vyksta oksidacinis diolio skaldymas (House H.O. *Modern synthetic reactions*, 2nd ed., W.A. Benjamin, NY, 1972), kurio metu susidaro 5-formilo grupės. Karbonilo grupės nėra sutinkamos gamtinėje DNR, dėl to 5-acetilo ir 5-formilo grupės gali būti naudojamos selektyviam chemoligavimui su junginiais, turinčiais pirminių aminių, hidrazino, hidroksilamino ar 1,2-aminothiolio grupes (Schema 2C).

20

Metodas D. DNR paeiliui veikiant formaldehidu ar acetaldehidu (junginys (I), $R = H$ ar CH_3), o po to tinkamu junginiu (II) ($Z = LX$, kur LX apima chemiškai aktyvią grupę arba reporterinę grupę X prijungtą per jungtuką L) ir esant nukreipiančiajai DNR citozino-5 metiltransferazei, sekai specifiskai prijungiami du junginiai, ko pasėkoje prie taikinio citozino liekanos per tiometilo inkarą (kai $QH = -SH$) yra įterpiama LX grupė (schema 2D). Po to chemiškai aktyvi grupė X gali būti panaudota, kovalentiškai prijungiant reikiamą junginį, turintį reporterinę grupę (dviejų stadijų žymėjimas, žiūrėti toliau). Sėkmingą šio metodo įgyvendinimą įrodo pavyzdys 18. Chemiškai aktyvi grupė LX gali būti veikiami kitu reagentu, inicijuojant taikinio DNR molekulės antrinį vidinį modifikavimą modifikuotos bazės vietoje arba greta jos. Naudingas antrinis modifikavimas apima bazių poravimosi pakeitimą, bazės iškirpimą, grandinės perkirpimą arba grandinių skersinį susiuvimą. Kai $QH = SeH$, veikiant analogiškai, LX grupė tikslingai įterpiama į biomolekulę per selenometilo inkarą. Po to chemiškai aktyvi grupė X gali būti naudojama reikiamam junginiui su reporterine grupe kovalentiškai prijungti. [Kadangi selenidai lengvai oksiduojasi nutrūkstam Se-C jungčiai, selenometilo inkaras gali būti

30

naudojamas kaip sąlyginai lengvai perkerpamas kovalentinis jungtukas žymėtų biomolekulių gryninimui, naudojant giminingumo gryninimo metodus.] Seleno buvimas inkarinėje grupėje, iš kitos pusės, taip pat gali būti naudojamas fazėms surasti iš rentgeno spinduliuotės difrakcijos duomenų, kai yra sprendžiamos biomolekulių struktūros.

5

Atitinkamai, siūlomas biomolekulių tikslinės derivatizacijos būdas apima biomolekulės pirminį modifikavimą esant metiltransferazei nekofactoriniu junginiu (I) arba paeiliui junginiu (I) ir junginiu (II) pagal išradimą, ir po to sekantį:

- a) kovalentinį ligavimą su junginiu, turinčiu cheminę reaktyvią grupę, prie kurios gali būti kovalentiškai prijungiama modifikuotos biomolekulės funkcinė grupė X; arba
- b) antrinį cheminį biomolekulės modifikavimą modifikuoto taikinio bazės vietoje, kur antrinis modifikavimas apima, be funkcinės grupės X, dar kitų prijungtų grupių reakcijas; arba
- c) antrinį vidinį biomolekulės modifikavimą, apimantį prijungtos funkcinės grupės X tolimesnę cheminę reakciją su taikinio baze arba greta esančiomis bazėmis; arba
- d) modifikuotos molekulės 5-hidroksimetilcitozino liekanos fermentinį antrinį modifikavimą;

kur, pirminis biomolekulės modifikavimas yra atliekamas pagal šiame išradime aprašytą būdą. Šiame tikslinės derivatizacijos būde minėto biomolekulės antrinio cheminio modifikavimo stadija b) modifikuotoje taikinio bazėje apima apdorojimą švelniu oksidatoriumi, pavyzdžiui MnO_2 arba perjodato rūgštimi, po kurio seka susidariusios karbonilo grupės tolesnis selektyvus cheminis prijungimas prie junginių, turinčių grupę, reaguojančią su karbonilo grupe, pasirinktą iš pirminių aminių, hidrazino, hidroksilamino arba 1,2-aminotolio.

Atitinkama minėto biomolekulės antrinio vidinio modifikavimo stadija c) apima prijungtos funkcinės grupės X tolimesnę cheminę reakciją su taikinio baze arba šalia esančiomis bazėmis, dėl ko galimi bazės poravimosi savybių pakitimai, taikinio bazės iškirpimas, grandinės perkirpimas arba grandinių skersinis susiuvimas (metodai, žinomi šios srities specialistams).

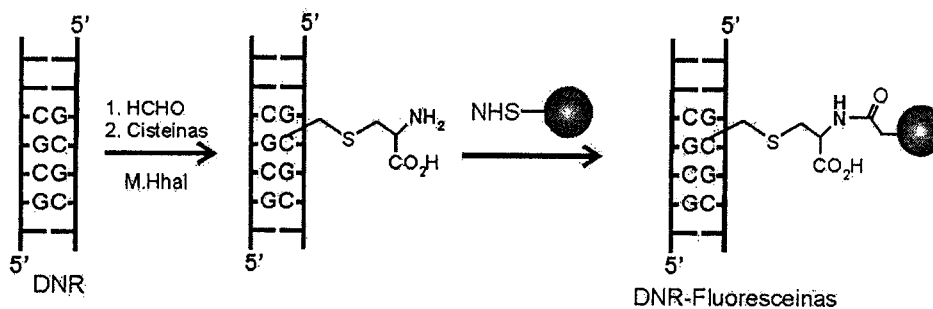
Šio išradimo modifikuotos biomolekulės 5-hidroksimetilcitozino liekanos fermentinio antrinio modifikavimo stadijos d) optimalūs įgyvendinimo variantai vykdomi bet kuriuo iš toliau nurodytų metodų:

- i) apdoroja su UDP-gliukose: DNR D-gliukoziltransferaze ir UDP-gliukoze arba jų dariniais, kurių poveikyje D-gliukozė arba jos darinys yra tikslingai įterpiamas į biomolekulės taikinį; arba
- ii) apdoroja su 5-hidroksimetilcitozino-DNR deaminaze, 5-hidroksimetilcitoziną paverčiant 5-hidroksimetiluridinu, o ši konversija yra nustatoma, nuskaitant DNR seką; arba
- iii) apdoroja su 5-hidroksimetilcitozino-DNR glikozilaze, modifikuotoje DNR formuojant abazinį taikinį, kuris gali būti toliau modifikuotas kitais žinomais metodais.

Tolimesnis tikslinės derivatizacijos būdo plėtojimas yra biomolekulės tikslinio žymėjimo būdas, apimantis biomolekulės modifikavimą pagal šį išradimą, toliau įterpiant grupę, kuri būtų tinkama kaip žymuo ir leistų identifikuoti žymėtas biomolekules tarp kitų nežymėtų molekulių.

Kitame šio išradimo įgyvendinimo variante, DNR žymėjimas sekai specifiskai pasiekiamas, paeiliui prijungiant junginį (I) (aldehidą) ir junginį (II) (tiolį), esant nukreipiančiai DNR metiltransferazei, po kurių seka chemoselektyvus žymių, pavyzdžiui fluorescuojančių žymių, gebančių reaguoti su amino grupėmis, prijungimas.

Schema 3: Sekai specifinis DNR žymėjimas, paeiliui prijungiant junginį (I) (R1-CHO) ir junginį (II) (Z2-SH), esant DNR metiltransferazei (M.HhaI).



Aukščiau pateikta schema 3 demonstruoja šio sekai specifinio DNR žymėjimo principą, paaiškindamą (pavyzdyje 18) plazmidinės DNR žymėjimu. Plazmidinė DNR yra pažymėta fluoresceinu sekai specifiskai, veikiant DNR paeiliui (i) pirmiausiai formaldehidu, o po to L-cisteinu, esant HhaI metiltransferazei. Po to seka (ii) amino selektyvus fluoresceino-NHS esterio prijungimas.

Šio išradimo optimaliame įgyvendinimo variante (I) junginys arba po to veikiantis jo darinys turi fluorescuojančią žymę; ir (b) nemetilinti taikiniai yra nustatomi dėka fluorescencijos buvimo minėtoje nukleorūgšties molekulėje (kaip pavyzdyje 18).

- 5 Šio išradimo kitame optimaliame įgyvendinimo variante minėto analizuojamo junginio žymė yra aptinkama (a) naudojant antikūnius, kurie specifiskai jungiasi prie detektuojamo junginio žymės arba (b) naudojant avidiną ar streptavidiną, kurie specifiskai jungiasi prie detektuojamo junginio žymės.
- 10 Kaip anksčiau minėta, remiantis šiuo išradimu atsiveria daugybė tikslinio biopolimerų taikinio žymėjimo arba tikslinės derivatizacijos galimybių. Šiam tikslui pasiekti junginys (I) arba junginys (II) turi turėti cheminį fragmentą LX ($R = LX$ arba $Z = LX$), kuriame X apima funkcinę grupę arba reporterinę grupę, kuri yra prijungta per jungtuką L.
- 15 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 stabilus amidus, sulfonamidus, tiokarbamidus, imino eterius ar iminus, kurie gali būti redukuojami iki stabilų antrinių aminų. Tioliai specifiskai reaguoja su halogenacetamidais, maleimidais, aziridinais 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 tiazolidinidus (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 imanomas vandeniniuose tirpaluose. Kita moderni technika
- 20
- 25
- 30

remiasi paladžio katalizuojama arilhalogenidų ir galinių alkinų kryžminio prijungimo 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 prijungimo 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 tikslinio biopolimerų žymėjimo, X taip pat apima sunkiuosius atomus ar sunkiųjų atomų grupes, tinkamas X spindulių difrakcijos duomenų fazėms nustatyti; radioaktyvius ar stabilus retuosius izotopus; fluorofuorų, fluorescencijos gesintojų, chromoforų, afiniškų uodegų, sukinio žymių (stabilios paramagnetinės grupės) radikalus; tarpgrandines sąsajas formuojančius agentus, grupes, karpančias nukleorūgštis, haptenus, nanodaleles ir rutuliukus.

Šis išradimas taip pat susijęs su nukreipiančiosios metiltransferazės nemetilintų taikinių biomolekulėje nustatymo būdu, apimančiu: (a) biomolekulės modifikavimą su nekofaktoriniu junginiu (I) arba paeiliui su junginiu (I) ir junginiu (II) esant minėtai metiltransferazei; ir (b) nustatymą, ar minėtos metiltransferazės taikiniai buvo modifikuoti nekofaktoriniu(iais) junginiu(iais) arba jų dariniais, kai metiltransferazės taikininio modifikacija nurodo nemetilinto taikinio buvimą.

Terminas "nustatymas ar minėtos metiltransferazės taikiniai buvo modifikuoti junginiu arba jo dariniu" reiškia įvertinimą ar nekofaktorinis junginys (I) arba paeiliui junginiai (I) ir (II) ar jų dariniai yra prijungti prie biomolekulės. Teikiama pirmenybė detekcijos metodams, kurie apima konkrečios bazės metiltransferazės taikinio sekoje identifikavimą, kuris prieš tai buvo modifikuotas nekofaktoriniu junginiu (I) arba junginiais (I) ir (II).

Šio išradimo autoriai pastebėjo, kad nekofaktorinio junginio, kurio formulės (I) arba (II), prijungimas pagal šį išradimą atpažinimo sekos akceptoriniame taikinyje blokuoja DNR skaldymą restrikcijos fermentais su persidengiančia arba identiška atpažinimo seka. Restrikcijos fermentų skaldymo blokavimas, naudojamas čia, reiškia, kad restrikcijos endonukleazės nehidrolizuoja DNR savo taikiniuose (pavyzdžiai 14-17).

Kitame šio išradimo įgyvendinimo variante (a) nekofaktorinis junginys, kurio formulė (I) arba (II) pagal šį išradimą, trukdo nukleorūgčių padauginimui metiltransferazės atpažinimo sekose; ir (b) nemetilinti taikiniai nustatomi testuojant, ar nukleorūgščių molekulės padauginimas metiltransferazės atpažinimo sekose yra uždelstas. Padauginimo uždelsimas galimas dėl pradmenų prisijungimo arba grandinės ilginimo trukdžių padauginimu reakcijos metu.

Taikant šio išradimo būdus gali būti atliekamas nukleorūgčių sekos nustatymas. Gali būti naudojami visi žinomi sekos nustatymo metodai.

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

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

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

Šio išradimo pavyzdžiuose (Pavyzdys 8, Fig. 3) parodyta, kad junginys formulės (I) pagal siūlomą išradimą arba jo darinys yra prijungiamas prie citozino liekanos ir negali būti prijungtas prie 5-metilcitozino liekanos DNR molekulėje.

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

- 5 Galiausiai, viename iš optimalių įgyvendinimo variantų rinkinys pagal siūlomą išradimą apima metiltransferazę ir nekofaktorinį junginį (I) arba junginius (I) ir (II) kaip apibrėžta šiame išradime, atskiruose kontaineriuose. Rinkinys taip pat gali turėti informacinį lapelį ar naudojimo instrukciją.
- 10 Junginiai (I) ir (II) gali būti taip pat pateikti chemiškai pakeista forma, pavyzdžiui modifikuoti apsauginėmis grupėmis, oligomerinėje ar polimerinėje formoje, iš kurių junginys(iai) išsiskiria nedelsiant arba iš lėto, patalpinus tinkamoje aplinkoje, pavyzdžiui metiltransferazės buferyje. Pavyzdžiui, yra žinoma, kad aldehidai egzistuoja dimerinėse (glicerolio aldehido dimeras, glikolio aldehido dimeras), trimerinėse (formaldehido trimeras arba 1,3,5-trioksanas),
15 polimerinėse (paraformas arba paraformaldehidas) arba apsaugotose formose (urotropinas, mono- ir diacetaliai, Šifo bazės ir t.t.). Šie junginiai iš lėto yra hidrolizuojami vandeniniuose tirpaluose (o greičiau – rūgštinėmis sąlygomis), susidarant atitinkamiems aldehydams. Panašiai, tioliai egzistuoja oksiduotose formose kaip bisulfidai arba polisulfidai ir t.t., kurie lengvai virsta į tiolius redukcijos sąlygomis. Šios ir panašios chemiškai pakeistos junginių (I) ir (II) formos taip
20 pat gali būti naudojamos modifikavimo reakcijose, aprašytose šiame išradime.

- Šis išradimas taip pat apima rinkinį, kuriame yra abu junginiai (I) ir (II), aprašyti šiame išradime, ir metiltransferazę arba diagnostinį preparatą, aukščiau aprašyto metodo pagrindu. Viename iš šio išradimo optimalių įgyvendinimo variantų diagnostinis preparatas yra sudarytas iš skystų
25 komponentų. Pirmenybė teikiama vandeniniams tirpalams. Be to, preparatas gali turėti kitų ingredientų arba nešiklių, kurie modifikuoja arba palaiko preparato pH, osmosinį slėgį, klampumą, skaidrumą, spalvą, sterilumą, stabilumą, tirpumo greitį ar kvapą. Panašiai, preparatas gali turėti kitokių farmakologiškai priimtinių ingredientų, modifikuojančių ar palaikančių diagnostinio rinkinio komponentų stabilumą, tirpimo greitį, atpalaidavimą ar
30 absorbciją. Kai diagnostinis preparatas yra paruoštas, jis gali būti laikomas steriliuose induose tirpalo, suspencijos, gelio, emulcijos, kieto, arba dehidratuotu ar liofolizuotų miltelių pavidalu. Šie rinkiniai gali būti laikomi iškart naudojimui tinkamose formose arba rekonstruojami prieš pat naudojimą.

Nauji junginiai, kurie susidaro DNR apdorojant junginiu (I) arba paeiliui junginiu (I) ir (II) ir esant MTazei, taip pat yra apimti šiuo išradimu.

- 5 Praktikoje šiame išradime aprašytų modifikuotų biomolekulių paruošimas yra vykdomas per kelias stadijas:
 - a) kartu sudedant biomolekulę, neturinčią kofaktoriaus MTazę ir junginį (I) tinkamo buferio vandeniniame tirpale (kuriame metiltransferazė yra fermentiškai aktyvi);
 - b) inkubuojant reakciją kambario temperatūroje (arba kitoje temperatūroje, kurioje metiltransferazė yra aktyvi) 5-120 min;
 - 10 c) sustabdant reakciją (pridedant slopinančių junginių, skiedžiant reakciją tinkamu tirpikliu, atšaldant iki žemos temperatūros ar inaktyvuojant metiltransferazę, pašildžius aukštesnėje temperatūroje 5-20 min);
 - d) išskiriant modifikuotą biomolekulę, jei reikia.
- 15 Biomolekulės modifikacija paeiliui su junginiu (I), o po to su junginiu (II) atliekama per tokias stadijas:
 - a) sudedant biomolekulę, neturinčią kofaktoriaus MTazę ir junginį (I) tinkamame vandeniniame buferyje;
 - 20 b) inkubuojant reakcijos mišinį kambario temperatūroje (arba kitoje temperatūroje, kurioje metiltransferazė yra aktyvi) 5-120 min;
 - c) (nebūtinai) sustabdant reakciją kaip aprašyta aukščiau (pridedant slopinančio junginio, skiedžiant reakciją tinkamu tirpikliu, atšaldant iki žemos temperatūros ar inaktyvuojant metiltransferazę, pašildžius aukštesnėje temperatūroje 5-20 min);
 - 25 d) (nebūtinai) išskiriant modifikuotą biomolekulę;
 - e) į reakcijos mišinį, gautą stadijoje b) pridedant junginio (II) (arba sudedant biomolekulę, gautą stadijoje d), neturinčią kofaktoriaus MTazę ir junginį (II) tinkamame vandeniniame buferyje);
 - f) inkubuojant reakcijos mišinį kambario temperatūroje (ar kitoje MTazės veikimui tinkamoje temperatūroje) 5-120 min;
 - 30 g) sustabdant reakciją (pridedant slopinančių junginių, skiedžiant reakciją tinkamu tirpikliu, atšaldant iki žemos temperatūros ar inaktyvuojant metiltransferazę, pašildžius aukštesnėje temperatūroje 5-20 min);
 - h) išskiriant biomolekulę, jei reikia.

Paprastai nukreipiančiosios MTazės yra pridedama ekvimoliariniai kiekiai lyginant su biomolekulės taikininiu kiekiu; junginių (I) ir (II) koncentracijos paprastai yra milimoliarinės.

Išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai

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

Pavydžiai 1-7. Sekos specifinis dvigrandžių oligodeoksiribonukleotidų modifikavimas, naudojant junginį (I) arba paeiliui junginius (I) ir (II) ir esant DNR citozino-C5 metiltransferazei HhaI

- 10 Citozino C5-pozicijos modifikavimas junginiu (I) (R1-CHO = formaldehidus, R2-CHO = acetaldehidus, R3-CHO = propionaldehidus, R4-CHO = 2-chloroacetaldehidus) arba paeiliui junginiu (I) (R1-CHO = formaldehidu) ir junginiu (II) (Z1-SH = 2-merkaptioetanolis, Z2-SH = L-cisteinas arba Z3-SH = 5'-tio-5'-deoksiadenozinas) pirmiausiai buvo atliekamas, naudojant
- 15 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 (pabrauktas) C5 atomo. Po fermentinės modifikacijos reakcijos, dvigrandis oligodeoksiribonukleotidas buvo fermentiškai sufragmentuotas iki 2'-deoksiribonukleozidų ir analizuotas atvirkščios fazės HPLC
- 20 aparatūra, sujungta su ESI-MS.

- Dvigrandis oligodeoksiribonukleotidas I:II buvo paruoštas lygiais moliniais kiekiais (150 μ M) vandenyje sumaišant komplementarius viengrandžius oligodeoksiribonukleotidus I (SEQ ID NO:1) (5'-TAATAATGCGCTAATAATAATAAT) ir II (SEQ ID NO:2) (3'-TTATTACGCGATTATTATTATTA), pakaitinus 95°C 5 min ir lėtai atšaldant iki kambario temperatūros. Fermentinė modifikacija buvo atlikta inkubuojant dvigrandį oligodeoksiribonukleotidą I:II (13 μ M) su junginiu (I) (R1-CHO, 13 mM; R2-CHO, 800 mM, R3-CHO ir R4-CHO, 200 mM) ir M.HhaI (15 μ M) buferiniame tirpale (200 μ L, 50 mM MOPS, 50 mM MES pH 7.0, 1 mM Na₂EDTA, 15 mM NaCl, 0.2 mg/ml jaučio serumo albumino, 5%
- 25 glicerolio) 20°C temperatūroje 1 val. Vieno po kito junginių (I) ir (II) prijungimas buvo atliekamas pirmiausiai inkubuojant dvigrandį oligodeoksiribonukleotidą I:II (13 μ M) su junginiu (I) (R1-CHO – 13 mM) 40 min aukščiau aprašytomis sąlygomis ir po to pridedant junginio (II) iki nurodytos koncentracijos (Z1-SH (300 mM), Z2-SH (50 mM) arba Z3-SH (400 μ M)) ir inkubuojant 1 val kambario temperatūroje.
- 30

Po to DNR buvo išsodinta 3 tūriais etanolio, išdžiovinta ir ištirpinta buferiniame tirpale (100 µl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnio chlorido, 1 mM cinko acetato). Mėginiai veikiami 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

5 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), plaunant 0.3

10 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 kolonėlės išplaunami junginiai detektuojami UV absorbciniu diodinės matricos detektoriumi. UV absorbcijos spektrai buvo užrašyti (190-400 nm bangos ilgių intervale) smailių viršūnėse, o tirpiklio indėlis epašalintas atėmus fono spektrus prieš ir po smailių. Iš kolonos ištekantis srautas buvo nukreipiamas į masių spektrometrą. 2'-deoksicitidinių ir jo darinių

15 jonizacijos padidinimui 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

20 gauti atitinkamas HPLC frakcijas išanalizavus LTQ Orbitrap masių spektrometru (Thermo Electron), kuris sujungtas su nanoelektroišpurškimo įtaisu (Proxeon NanoSpray ESI).

Pavyzdys 1. Dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido nukleozidų sudėties analizė po inkubacijos su formaldehidu ir M.HhaI

25 Formaldehidu (R1-CHO) modifikuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido (I:II) nukleozidų sudėties HPLC analizė parodė, kad šalia natūralių nukleozidų dC, dG, dT ir dA randamas naujas produktas, kurio išėjimo laikas yra 3.3 min (eliucijos buferis 20 mM amonio formiatas pH 3.5) arba 4.2 min (eliucijos buferis 20 mM amonio acetatas pH 5.5). Toks produktas nesusidaro, kai nėra M.HhaI arba formaldehido. Šis naujas produktas buvo išanalizuotas ESI-

30 MS (m/z: 280 [M + Na]⁺, 164 [5-hidroksimetilcitozinas + Na]⁺) ir HR-MS (m/z rasta: 258.1085; suskaičiuota [M + H]⁺ C₁₀H₁₆N₃O₅: 258.1084). Nustatytos masės ir UV absorbcijos spektras (λ_{max} = 282 nm, pH 3.5) leidžia teigti, kad susidaręs naujas junginys yra 5-hidroksimetil-2'-deoksicitidinas dC^{CH(OH)R1}. Taigi, junginys R1-CHO yra prijungiamas DNR citozino C5 pozicijoje veikiant M.HhaI. Žiūrėti Fig. 1, takelis 4 ir Fig. 2, takelis 2.

Pavyzdys 2. Dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido nukleozidų sudėties analizė po inkubacijos su acetaldehidu ir M.HhaI

Acetaldehidu (R2-CHO) modifikuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido (I:II) nukleozidų sudėties HPLC analizė parodė, kad šalia natūralių nukleozidų dC, dG, dT ir dA randamas naujas produktas, kuris išeina dviejose HPLC smailėse (du α -anglies chiralinio centro izomerai). Naujo produkto išėjimo laikai yra 6.5 ir 8.3 min (eliucijos buferis 20 mM amonio formiatas pH 3.5). Šie nauji produktai buvo išanalizuoti ESI-MS (m/z : 294 $[M + Na]^+$, 178 $[5-(1-hidroksietil)citozinas + Na]^+$) ir HR-MS (m/z rasta: 272.1243; suskaičiuota $[M + H]^+$ $C_{11}H_{18}N_3O_5$: 272.1241). Nustatytos masės ir UV absorbcijos spektras (λ_{max} = 282 nm, pH 3.5) leidžia teigti, kad susidaręs naujas junginys yra 5-(1-hidroksietil)-2'-deoksicitidinas $dC^{CH(OH)R2}$. Taigi, junginys R2-CHO yra prijungiamas DNR citozino C5 pozicijoje veikiant M.HhaI. Žiūrėti Fig. 1, takelis 3.

Pavyzdys 3. Dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido nukleozidų sudėties analizė po inkubacijos su propionaldehidu ir M.HhaI

Propionaldehidu (R3-CHO) modifikuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido (I:II) nukleozidų sudėties HPLC analizė parodė, kad šalia natūralių nukleozidų dC, dG, dT ir dA susidaro naujas produktas, kuris išeina dviejose HPLC smailėse (du α -anglies chiralinio centro izomerai). Naujo produkto išėjimo laikai yra 16.1 ir 16.8 min (eliucijos buferis 20 mM amonio formiatas pH 3.5). Šie nauji produktai buvo išanalizuoti ESI-MS (m/z : 308 $[M + Na]^+$, 192 $[5-(1-hidroksipropil)citozinas + Na]^+$) ir HR-MS (m/z rasta: 286.1398; suskaičiuota $[M + H]^+$ $C_{12}H_{20}N_3O_5$: 286.1397). Nustatytos masės leidžia teigti, kad susidaręs naujas junginys yra 5-(1-hidroksipropil)-2'-deoksicitidinas $dC^{CH(OH)R3}$. Taigi, junginys R3-CHO yra prijungiamas DNR citozino C5 pozicijoje veikiant M.HhaI. Žiūrėti Fig. 1, takelis 6.

Pavyzdys 4. Dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido nukleozidų sudėties analizė po inkubacijos su 2-chloroacetaldehidu ir M.HhaI

2-chloroacetaldehidu (R4-CHO) modifikuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido (I:II) nukleozidų sudėties HPLC analizė parodė, kad šalia natūralių nukleozidų dC, dG, dT ir dA randamas naujas produktas, kurio išėjimo laikas yra 13.5 (eliucijos buferis 20 mM amonio formiatas pH 3.5). Šis naujas produktas buvo išanalizuotas ESI-MS (m/z : 328 $[M + Na]^+$, 212 $[5-(1-hidroksi-2-chloretil)citozinas + Na]^+$) ir HR-MS (m/z rasta: 306.0852; suskaičiuota $[M + H]^+$ $C_{11}H_{17}N_3O_5Cl$: 306.0851). Nustatyta masė ir UV spektras leidžia teigti, kad susidaręs naujas

junginys yra 5-(1-hidroksi-2-chloretil)-2'-deoksicitidinas $dC^{CH(OH)R4}$. Taigi, junginys R4-CHO yra prijungiamas DNR citozino C5 pozicijoje veikiant M.Hhal. Žiūrėti Fig. 1, takelis 2.

Pavyzdys 5. Dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido nukleozidų sudėties analizė po inkubacijos su formaldehidu, 2-merkaptoetanoliu ir M.Hhal

Formaldehidu (R1-CHO, 13 mM) ir 2-merkaptoetanoliu (Z1-SH, 300 mM) modifikuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido (I:II) nukleozidų sudėties HPLC analizė parodė, kad šalia natūralių nukleozidų dC, dG, dT ir dA randami du nauji produktai, iš kurių vieno išėjimo laikas sutampa su 5-hidroksimetil-2'-deoksicitidinu (Pavyzdys 1), o kito išėjimo laikas yra 16.8 min (eliucijos buferis 20 mM amonio acetatas pH 5.5). Šis naujas produktas buvo išanalizuotas ESI-MS (m/z : 340 $[M + Na]^+$, 224 $[5-(2-hidroksietiltio)metilcitozinas + Na]^+$) ir HR-MS (m/z rasta: 318.1118; suskaičiuota $[M + H]^+$ $C_{12}H_{20}N_3O_5S$: 318.1119). Nustatyta masė leidžia teigti, kad susidaręs naujas junginys yra 5-(2-hidroksietiltio)metil-2'-deoksicitidinas $dC^{CH(R1)SZ1}$. Taigi, junginiai R1-CHO ir Z1-SH yra vienas po kito prijungiami DNR citozino C5 pozicijoje veikiant M.Hhal. Žiūrėti Fig. 2, takelis 3.

Pavyzdys 6. Dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido nukleozidų sudėties analizė po inkubacijos su formaldehidu, L-cisteinu ir M.Hhal

Formaldehidu (R1-CHO, 13 mM) ir L-cisteinu (Z2-SH, 50 mM) modifikuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido (I:II) nukleozidų sudėties HPLC analizė parodė, kad šalia natūralių nukleozidų dC, dG, dT ir dA randami du nauji produktai, iš kurių vieno išėjimo laikas sutampa su 5-hidroksimetil-2'-deoksicitidinu (Pavyzdys 1), o kito išėjimo laikas yra 2.7 min (eliucijos buferis 20 mM amonio acetatas pH 5.5). Šis naujas produktas buvo išanalizuotas HR-MS (m/z rasta: 361.1176; suskaičiuota $[M + H]^+$ $C_{13}H_{21}N_4O_6S$: 361.1176). Nustatyta masė leidžia teigti, kad susidaręs naujas junginys yra 5-(S-cistein)metil-2'-deoksicitidinas $dC^{CH(R1)SZ2}$. Taigi, junginiai R1-CHO ir Z2-SH yra vienas po kito prijungiami DNR citozino C5 pozicijoje veikiant M.Hhal. Žiūrėti Fig. 2, takelis 4.

Pavyzdys 7. Dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido nukleozidų sudėties analizė po inkubacijos su formaldehidu, 5'-tio-5'-deoksiadenozinu ir M.Hhal

Formaldehidu (R1-CHO, 13 mM) ir 5'-tio-5'-deoksiadenozinu (Z3-SH, 400 μ M) modifikuoto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido (I:II) nukleozidų sudėties HPLC analizė parodė, kad šalia natūralių nukleozidų dC, dG, dT ir dA randami du nauji produktai, iš kurių vieno išėjimo laikas sutampa su 5-hidroksimetil-2'-deoksicitidinu (Pavyzdys 1), o kito išėjimo laikas yra 27.5 min

(eliucijos buferis 20 mM amonio acetatas pH 5.5). Šis naujas produktas buvo išanalizuotas ESI-MS (m/z : 545 $[M + Na]^+$, 429 $[5-(5'-adenozil)tiometil-2'-deoksicitidinas + Na]^+$) ir HR-MS (m/z rasta: 523.1718; suskaičiuota $[M + H]^+$ $C_{20}H_{27}N_8O_7S$: 523.1718). Nustatyta masė leidžia teigti, kad susidaręs naujas junginys yra 5-(5'-adenozil)tiometil-2'-deoksicitidinas $dC^{CH(R1)SZ3}$.

- 5 Taigi, junginiai R1-CHO ir Z3-SH yra vienas po kito prijungiamai DNR citozino C5 pozicijoje, veikiant M.HhaI. Žiūrėti Fig. 2, takelis 5.

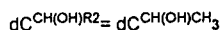
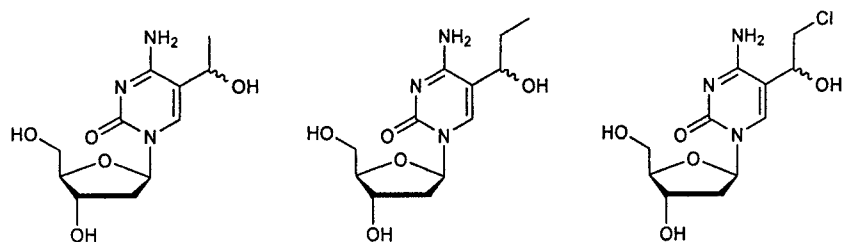
Kaip pademonstruota aukščiau, šio išradimo būdas leido efektyviai gauti naujus produktus, nurodytus Lentelėje 1.

10

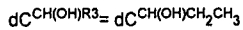
Lentelė 1

Egzogeninis reagentas (-ai)	Reakcijos produktas		
	Žymėjimas	Formulė	Pavadinimas
R1-CHO	$dC^{CH(R1)OH}$	$C_{10}H_{15}N_3O_5$	5-hidroksimetil-2'-deoksicitidinas
R2-CHO	$dC^{CH(R2)OH}$	$C_{11}H_{17}N_3O_5$	5-(1-hidroksietil)-2'-deoksicitidinas
R3-CHO	$dC^{CH(R3)OH}$	$C_{12}H_{19}N_3O_5$	5-(1-hidroksipropil)-2'-deoksicitidinas
R4-CHO	$dC^{CH(R4)OH}$	$C_{11}H_{16}N_3O_5Cl$	5-(2-chlor-1-hidroksietil)-2'-deoksicitidinas
R1-CHO and Z1-CHO	$dC^{CH(R1)SZ1}$	$C_{12}H_{19}N_3O_5S$	5-(2-hidroksietil)tiometil-2'-deoksicitidinas
R1-CHO and Z2-CHO	$dC^{CH(R1)SZ2}$	$C_{13}H_{20}N_4O_6S$	5-(2-amino-2-karboksietil)tiometil-2'-deoksicitidinas
R1-CHO and Z3-CHO	$dC^{CH(R1)SZ3}$	$C_{20}H_{26}N_8O_7S$	5-(5'-adenozil)tiometil-2'-deoksicitidinas

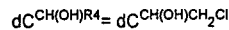
Nauji 2'-deoksicitidino dariniai susidarę DNR dėka apdorojimo su junginiu (I) arba paeiliui junginiais (I) ir (II), esant metiltransferazei, gauti pavyzdžiuose 1-7, yra:



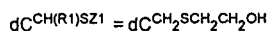
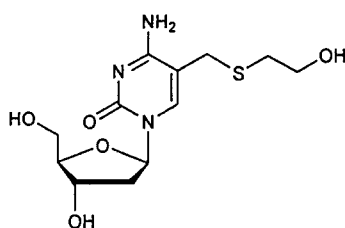
5-(1-hidroksietil)-
2'-deoksicitidinas



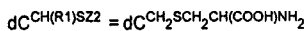
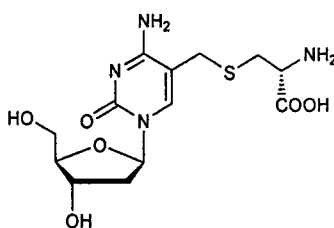
5-(1-hidroksiipil)-
2'-deoksicitidinas



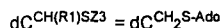
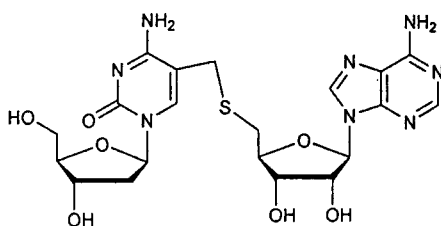
5-(2-chlor-1-hidroksietil)-2'-
deoksicitidinas



5-(2-hidroksietil)tiometil-2'-
deoksicitidinas



5-(2-amino-2-karboksietil)tiometil-2'-
deoksicitidinas



5-(5'-adenozil)tiometil-2'-deoksicitidinas

- Pavyzdžiai 8-13.** Žymėto dvigrandžio oligodeoksiribonukleotido sekos specifinis modifikavimas, naudojant junginį (I) arba junginius (I) ir (II) ir DNR citozino-C5 metiltransferazę. DNR modifikacija junginiu (I) (R1-CHO = formaldehidai, R2-CHO = acetaldehidai, R3-CHO = propionaldehidai, R4-CHO = 2-chloroacetaldehidai, R5-CHO = betaino aldehidai, R6-CHO = benziloksiacetaldehidai) arba paeiliui junginiu (I) (R1-CHO = formaldehidai) ir junginiu (II) (Z1-SH = 2-merkaptioetanolis, Z2-SH = L-cisteinas, Z3-SH = 5'-tio-5'-deoksiadenozinas) buvo vykdoma esant DNR citozino-5 MTazėms M.HhaI, M.SssI, M.HpaII arba M.AluI. M.HhaI 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), M.HpaII (atpažinimo taikiny CCGG) arba M.AluI (atpažinimo taikiny AGCT). Taikinio citozinų modifikacija buvo analizuojama, naudojant dvigrandį oligodeoksiribonukleotidą, kuriame taikinio citozinas buvo pažymėtas 33P (M.HhaI atveju buvo pažymėti abu taikinio citozinai). Po modifikacijos reakcijos, dvigrandis oligodeoksiribonukleotidas buvo fermentiškai sufragmentuojamas iki 2'-deoksiribonuclezid-5'-monofosfatų, kurie analizuoti TLC ir autoradiografija, kas leidžia atrankiai stebėti tik taikinio nukleotidą ir jo modifikacijas.

- 10 Dvigrandžiai oligodeoksiribonukleotidai III:IV (nemetilintas M.HhaI DNR substratas), V:VI (hemimetilintas M.HhaI 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'-TCGGATGTTGTGGGTCA) (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)
- 15 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 μM), [α-33P]CTP (1.5 μM, Hartmann Analytic, Vokietija) ir Klenow Fragmentą (0.16 u/μL, Fermentas Life Sciences) ir inkubuojant 37°C temperatūroje 30 min
- 25 Klenow reakcijos buferyje; po to sekė polimerazės inaktyvacija 75°C temperatūroje 15 min. Mėginiai su 125 nM M.HhaI, 1000 nM M.HpaII, 5–10 u/μl M.AluI arba 0.4–0.8 u/μl M.SssI ir 20–100 nM žymėto dvigrandžio DNR substrato buvo inkubuojami buferiniame tirpale (5–20 μL, 50 mM MOPS, 50 mM MES pH 7.0 (M.HhaI) ir pH 7.5 (kitos metiltransferazės), 1 mM Na₂EDTA, 15 mM NaCl, 0.2 mg/ml jaučio serumo albumino, 5% glicerolio) su junginiu (I) (R= R1–R6, R1-CHO – 13 mM, R2-CHO – 800 mM, R3-CHO, R4-CHO – 200 mM, R5-CHO, R6-CHO – 100 mM) 1 val kambario temperatūroje. Viena po kitos einanti modifikacija junginiais (I) ir (II) buvo atliekama pirmaisiai inkubuojant dvigrandį DNR substratą, DNR metiltransferazę ir junginį (I) (R1-CHO 13 mM) 30 – 40 min kambario temperatūroje, o po to, pridėjus junginio (II) (Z1-SH = 2-merkaptioetanolio (300 mM), Z2-SH = L-cisteino (50 mM) arba Z3-SH = 5'-tio-5'-

deoksiadenozino (400 μ M)), inkubacija pratęsiama dar 1 val. Po reakcijos DNR buvo išsodinta 3 tūriais etanolio, ištirpinta nucleazės BAL31 buferyje (5 μ L) su nukleaze BAL31 (0.4 u)(Fermentas Life Sciences). Reakcija inkubuota 2 val 30°C temperatūroje, o po to 0.5–3 μ L tirpalo buvo užnešta ant TLC plokštelės (PEI CelluloseF, 20 x 20 cm, Merck). Naudotas TLC
5 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. Santykinis radioaktyvumo kiekis dėmelėse išmatuotas MultiGauge programa (Fujifilm). Modifikuoti 2'-deoksiribocitidino-5'-monofosfatai (dXMP) buvo detektuojami atsiradus naujoms radioaktyvumo dėmėms šalia pagrindinės 2'-
10 deoksiribocitozino-5'-monofosfato (dCMP) dėmės. Modifikuoto nukleotido (dMXP) pozicija buvo nustatoma išmatuojant jo nueitą kelią TLC plokštelėje ir palyginus jį su citozino (dCMP) nueitu keliu ($R_c(X) = R_f(dXMP)/R_f(dCMP)$).

Pavyzdys 8: Dvigrandžių DNR substratų su specifiniu, metilintu specifiniu ir nespecifiniu
15 taikiniais modifikacija aldehydais esant M.HhaI

Nespecifinis dvigrandis DNR substratas (VII:VIII) buvo naudojamas ištirti aldehydų prijungimo prie metiltransferazių taikinių reakcijos specifiškumą. Tuo tarpu specifinis metilintas DNR substratas (metilintas III:IV) buvo naudotas siekiant išsiaiškinti ar reakcija vyksta tik su citoziniais, o ne su 5-metilcitoziniais. Naujas produktas, kurio $R_c = 0.85$, buvo aptiktas naudojant
20 specifinį DNR substratą, manoma, kad tai 5-hidroksimetilcitozinas, kuris susidaro iš taikinio citozino (takelis 4). Naujų produktų nebuvo pastebėta naudojant nespecifinį DNR substratą, kas rodo, jog prijungimo reakcija yra specifinė ir vyksta tik esant taikiniui (Pav. 3, takeliai 6, 9). Esant specifiniam metilintam taikiniui (taikiny s užmetilintas M.HhaI, naudojant AdoMet), junginio (I) prijungimas, esant M.HhaI, nevyksta (Pav. 3, palyginti takelius 4 ir 5, 7 ir 8). Taigi,
25 aldehido prijungimas M.HhaI pagalba gali būti naudojamas nemetilintų taikinio citozinų modifikavimui, o su metilintais taikiniais modifikacija nevyksta.

Pavyzdys 9. Dvigrandžio DNR substrato taikinio nukleotido analizė po inkubacijos su aldehydu ir DNR citozino-5 metiltransferaze (M.HhaI)

30 Reakcijos produktų TLC analizė po DNR-M.HhaI komplekso inkubavimo su formaldehydu (R1-CHO), acetaldehydu (R2-CHO), propionaldehydu (R3-CHO), betaino aldehydu (R5-CHO) ir benziloksiacetaldehydu (R6-CHO) parodė, jog susidaro nauji produktai, kurių R_c atitinkamai yra 0.85, 1.1, 1.5, 1.9 ir 1.7. Naujų produktų nesusidaro kai nėra M.HhaI arba junginio (I). Taigi, aldehydai R-CHO (R=R1–R6) yra prijungiami taikinio citozinuose esant M.HhaI.

Pavyzdys 10. DNR substrato taikinio citozino analizė po reakcijos su formaldehidu ir junginiu (II) esant DNR citozino-5 metiltransferazei HhaI (M.HhaI)

Reakcijos produktų, gautų po DNR-M.HhaI komplekso inkubacijos su formaldehidu (R1-CHO) ir po to 2-merkaptoetanoliu (Z1-SH), L-cisteinu (Z2-SH) arba 5'-deoksi-5'-tioadenozinu (Z3-SH), TLC analizė parodė, kad susidaro nauji modifikuoti nukleotidai, kurių R_c yra atitinkamai 1.1, 1.5, 0.55 (Pav. 5). Nauji produktai nesusidarė, jei nebuvo pridėta junginio (I), junginio (II) ar M.HhaI. Taigi, sekai specifinė taikinio citozino modifikacija formaldehidu (R1-CHO) ir junginiu (II) (Z=Z1–Z3) vyksta esant M.HhaI.

Pavyzdys 11. DNR substrato taikinio nukleotido analizė po inkubavimo su aldehidu ir DNR citozino-5 metiltransferaze SssI (M.SssI)

Reakcijos produktų TLC analizė po DNR-M.SssI komplekso inkubavimo su formaldehidu (R1-CHO), acetaldehidu (R2-CHO), propionaldehidu (R3-CHO) ir benziloksiacetaldehidu (R6-CHO) parodė, jog susidaro nauji produktai, kurių R_c atitinkamai yra 0.85, 1.1, 1.5 ir 1.7 (Pav. 6a). Naujų produktų nesusidaro kai nėra M.SssI arba junginio (I). Taigi, aldehydai R-CHO (R=R1–R3, R6) yra prijungiami taikinio citozinuose esant M.SssI.

Pavyzdys 12. DNR substrato taikinio nukleotido analizė po inkubavimo su aldehidu ir DNR citozino-5 metiltransferaze HpaII (M.HpaII)

Reakcijos produktų TLC analizė po DNR-M.HpaII komplekso inkubavimo su formaldehidu (R1-CHO) ir acetaldehidu (R2-CHO) parodė, jog susidaro nauji produktai, kurių R_c atitinkamai yra 0.85 ir 1.1 (Pav. 6b). Naujų produktų nesusidaro kai nėra M.HpaII arba junginio (I). Taigi, aldehydai R-CHO (R=R1, R2) yra prijungiami taikinio citozinuose esant M.HpaII.

Pavyzdys 13. DNR substrato taikinio nukleotido analizė po inkubavimo su aldehidu ir DNR citozino-5 metiltransferaze AluI (M.AluI)

Reakcijos produktų TLC analizė po DNR-M.AluI komplekso inkubavimo su acetaldehidu (R2-CHO) ir propionaldehidu (R3-CHO) parodė, jog susidaro nauji produktai, kurių R_c atitinkamai yra 1.1 ir 1.5 (Pav. 6c). Naujų produktų nesusidaro kai nėra M.AluI arba junginio (I). Taigi, aldehydai R-CHO (R=R2, R3) yra prijungiami taikinio citozinuose esant M.AluI.

Pavyzdžiai 14-17. Didelių DNR molekulių sekai specifinis modifikavimas junginiu (I) ir esant DNR citozino C5 metiltransferazei

Sekai specifinė modifikacija formaldehidu (R1-CHO) ir acetaldehidu (R2-CHO) veikiant DNR citocino C5 metiltransferazėms HhaI, SssI ir HpaI 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. Fragmentacijos pobūdis yra analizuojamas agaroziniame gelyje.

10 **Pavyzdys 14.** 618 bp DNR fragmento sekai specifinis modifikavimas formaldehidu arba acetaldehidu esant M.HhaI

DNR substratui buvo naudotas 618 bp plazmidės pUC19 (pUC-618) fragmentas su vienu M.HhaI taikiniu. pUC-618 buvo paruoštas PGR padauginimo metodu naudojant pUC19 plazmidę (Fermentas Life Sciences), du pradmenis Dir (5'-AACGTTGTTGCCATTGCTAC) (SEQ ID No:11) ir Rev (5'-GCTCATGAGACAATAACCCTGA) (SEQ ID No:12) ir Taq DNR polimerazę (Fermentas Life Sciences). PGR fragmentas buvo išgrynintas sefakrilu S-400 (GE Healthcare) ir išsodintas etanolio. pUC-618 fragmentas turi vieną M.HhaI atpažinimo taikinį. Modifikacijos reakcijos su 100 nM pUC-618 ir 50 nM M.HhaI buvo inkubuojamos buferiniame tirpale (50 mM MOPS, 50 mM MES pH 7.0, 1 mM Na₂EDTA, 15 mM NaCl, 0.2 mg/ml jaučio serumo albumino, 5% glicerolio) su 13 mM formaldehido (R1-CHO) arba 800 mM acetaldehido (R2-CHO) 1 val kambario temperatūroje. Reakcijos buvo sustabdytos, pašildant 75°C temperatūroje 20 min, ir inkubuotos su R.Hin6I restrikcijos endonukleaze pagal gamintojo rekomendacijas (Fermentas Life Sciences). Mėginiai buvo praskiesti 1/6 tūrio 6x užnešimo dažų (Loading Dye Solution, Fermentas Life Sciences) ir analizuoti 2% agarozės gelyje.

20 Fig. 7 rodo, kad formadehidas (R1-CHO) (takeliai 2, 3) arba acetaldehidas (R2-CHO) (takeliai 1, 2) veikiant M.HhaI pilnai (formaldehido atveju) arba beveik pilnai (acetaldehido atveju) apsaugo DNR nuo karpimo R.Hin6I. Taigi, dėl aldehidų prijungimo veikiant M.HhaI, GCGC taikiniai DNR fragmente yra efektyviai modifikuojami.

30 **Pavyzdys 15.** 618 bp DNR fragmento sekai specifinis modifikavimas formaldehidu esant M.SssI

DNR substratu buvo naudotas pUC-618 fragmentas (žiūrėti aukščiau), turintis 32 M.SssI atpažinimo taikinius. Modifikacijos reakcijos su 100 nM pUC-618 ir 500 nM M.SssI buvo

inkubuojamos buferyje (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 13 mM formaldehido (R1-CHO) 1 val kambario temperatūroje. Reakcijos buvo sustabdytos, pašildant 75°C temperatūroje 20 min, ir

5 inkubuotos su R.Hin6I restrikcijos endonukleaze pagal gamintojo rekomendacijas (Fermentas Life Sciences). Mėginiai buvo praskiesti 1/6 tūrio 6x užnešimo dažų (Loading Dye Solution, Fermentas Life Sciences) ir analizuoti 2% agarozės gelyje

Fig. 7 rodo, kad formaldehidas (R1-CHO) veikiant M.SssI (atpažinimo seka GC) apsaugo 70% DNR nuo karpimo R.Hin6I (atpažinimo seka GCGC) (takeliai 3, 5). Taigi, dėl aldehydų prijungimo veikiant M.SssI, GCGC taikiniai DNR fragmente yra efektyviai modifikuojami.

10

Pavyzdys 16. 618 bp DNR fragmento sekai specifinis modifikavimas formaldehidu esant M.HpaII

DNR substratu buvo naudotas pUC-618 fragmentas (žiūrėti aukščiau), turintis 2 M.HpaII atpažinimo taikinius. Modifikacijos reakcijos su 100 nM pUC-618 ir 1000 nM M.HpaII buvo

15 inkubuojamos buferyje (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 13 mM formaldehido (R1-CHO) 1 val kambario temperatūroje. Reakcijos buvo sustabdytos, pašildant 75°C temperatūroje 20 min, ir inkubuotos su R.HpaII restrikcijos endonukleaze pagal gamintojo rekomendacijas (Fermentas Life Sciences). Mėginiai buvo praskiesti 1/6 tūrio 6x užnešimo dažų (Loading Dye Solution, Fermentas Life Sciences) ir analizuoti 2% agarozės gelyje

20

Fig. 7 rodo, kad formaldehidas (R1-CHO) veikiant M.HpaII apsaugo 70% DNR nuo karpimo R.HpaII (takeliai 7, 8). Taigi, dėl aldehydų prijungimo veikiant M.HpaII, CCGG taikiniai DNR fragmente yra efektyviai modifikuojami.

25

Pavyzdys 17. Sekai specifinis didelių natūralių DNR modifikavimas su formaldehidu esant M.HhaI

DNR substratu buvo naudota bakteriofago λ DNR (48502 bp, 215 GCGC taikinių). Modifikacijos reakcijos su 0.12 mg/ml λ DNR (817 nM GCGC taikinių koncentracija) ir 4 μM M.HhaI buvo

30 inkubuojama su 13 mM formaldehido (R1-CHO) arba 200 μM AdoMet (kontrolė) 1 val kambario temperatūroje kaip aprašyta aukščiau. Reakcijos buvo sustabdytos pašildžius 75°C temperatūroje 20 min. Po to mėginiai inkubuoti su restrikcijos endonukleazėmis (R.Hin6I, R.AluI, R.MspI arba R.BsuRI) pagal gamintojo rekomendacijas (Fermentas Life Sciences).

Reakcijos buvo sustabdytos, inkubuojant su proteinaze K (0.1 mg/ml) ir NDS (0.5%) 55°C temperatūroje 1 val. Mėginiai buvo praskiesti 1/6 6x DNR užnešimo dažų (Loading Dye Solution, Fermentas Life Sciences) ir analizuoti 1% agarozės gelyje.

Fig. 8 rodo, kad GCGC taikinių modifikacija formaldehidu veikiant M.HhaI, vyksta efektyviai (GCGC taikiniai tampa atsparūs GCGC specifinės restrikcijos endonukleazės (R.Hin6I) fragmentacijai). Tačiau DNR buvo fragmentuojama kitų restrikcijos endonukleazių, atpažįstančių kitus taikinius. Tai rodo sekai specifinę DNR modifikaciją. Taigi, DNR modifikacija formaldehidu (R1-CHO) veikiant M.HhaI vyksta sekai specifiskai: GCGC taikiniai yra blokuojami nuo restrikcijos endonukleazių veikimo (takelis 6), tačiau AGCT, CCGG ir GGCC taikiniai išlieka hidrolizuojami restrikcijos endonukleazių (takeliai 7-9).

Pavyzdys 18. Plazmidinės DNR sekai specifinis DNR žymėjimas fluorescuojančia žyme, naudojant formaldehidą ir L-cisteiną ir esant M.HhaI

Plazmidinės pUC19 DNR žymėjimas fluorescuojančia žyme buvo atliktas naudojant vieną po kito formaldehidą (R1-CHO) ir L-cisteiną (Z2-SH) ir veikiant metiltransferazei. Po to prie amino grupės buvo prijungta su amino grupe reaguojanti fluorescuojanti žymė (Schema 2).

Plazmidinė pUC19 DNR (30 µL, 0.21 mg/ml, 2 µM M.HhaI atpažinimo taikinių), M.HhaI (8 µM) ir formaldehidas (R1-CHO, 13 mM) buvo inkubuojami 1 val kambario temperatūroje; šviežiai ištirpintas L-cisteinas (Z2-SH) buvo pridėtas iki 50 mM galutinės koncentracijos ir toliau inkubuojama 1 val. Mėginiai buvo praskiesti iki 200 µL ir modifikuota DNR išgryninta fenoliu/chloroformu (1 x 200 µL fenolis; 2 x 200 µL 25:24:1 fenolis : chloroformas : izoamilio alkoholis; 3 x 200 µL chloroformas). DNR išsodinta izopropanoliu, ištirpinta 30 µl 0.15 M NaHCO₃ pH 8.8 ir inkubuota su 300 µM 6-[Fluorescein-5(6)-karboksamido]heksanoinės rūgšties N-hidroksisukcinimido esteriu (ištirpintu dimetilsulfoksidu, Fluka) 1 val kambario temperatūroje tamsoje. Po to DNR buvo išgryninta su nukleotidų pašalinimo rinkiniu (Nucleotide Removal Kit (Qiagen), sukarpyta su R.FspBI (Fermentas Life Sciences) ir analizuota 2% agarozės gelyje (10 V/cm) be etidžio bromido. Geliai pirmiausiai buvo nuskanuoti su skanerių Fuji FLA-5100, naudojant 473 nm lazerį. Po nuskanavimo geliai nudažyti etidžio bromidu. Kontrolinėse reakcijose be M.HhaI nebuvo matyti DNR fragmentų prieš nudažant etidžio bromidu. Fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymas keturiose pUC19-FspBI fragmentuose atitinka M.HhaI taikinių pasiskirstymą, kas rodo plazmidinės DNR pažymėjimą sekai specifiskai (Lentelė 2).

Lentelė 2

Fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymas R.FspBI-pUC19 fragmentuose

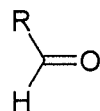
Fragmentas (dydis, bp)	M.HhaI taikinių skaičius	Apskaičiuotas fluorescencijos intensyvumas, %	Išmatuotas fluorescencijos intensyvumas, %
F1 (1221)	7	41	40±2
F2 (877)	7	41	43±3
F3 (335)	1	6	6±1
F4 (253)	2	12	11±1

5 Kaip matyti Lentelėje 2, fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymas R.FspBI-pUC19 fragmentuose (Fig. 9) rodo, kad sekai specifinis plazmidinės DNR žymėjimas yra pasiektas, paeiliui DNR veikiant formaldehidu ir L-cisteinu ir esant metiltransferazei. Fluoresceinas yra prijungiamas pačiame gale, fluoresceinu-NHS esteriu modifikuojant DNR, kuri jau buvo pažymėta amino grupe.

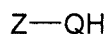
IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Nekofaktorinių junginių, kurių formulės (I) arba (II),

5



(I)



(II)

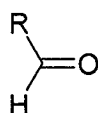
10

kur R ir Z yra nepriklausomai pasirinkti iš H, D, C₁–C₁₂-alkilo, optimaliai C₁–C₄-alkilo, arba –LX, kur X žymi funkcinę grupę arba reporterinę grupę, prijungtą per jungtuką L, ir QH yra pasirinktas iš –SH, –SeH, –NHNH₂ arba –ONH₂, panaudojimas biomolekulės tiksliniam modifikavimui arba derivatizacijai, kovalentiškai prijungiant prie biomolekulės, esant nukreipiančiai metiltransferazei.

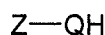
15

2. Biomolekulės tikslinio modifikavimo būdas, apimantis biomolekulės inkubavimą su modifikuojančiu junginiu(-iais), esant nukreipiančiai metiltransferazei, sąlygomis, užtikrinančiomis metiltransferazės fermentinį aktyvumą, besiskiriantis tuo, kad minėtą tikslinį modifikavimą vykdo, kovalentiškai priijungiant prie biomolekulės nekofaktorinį modifikuojantį junginį, kurio formulė (I) arba (II) arba paeiliui junginius (I) ir (II),

20



(I)



(II)

25

kur R ir Z yra nepriklausomai pasirinkti iš H, D, C₁–C₁₂-alkilo, optimaliai C₁–C₄-alkilo, alkeno, alkino, fenilo arba –LX grupės, kur X žymi funkcinę grupę arba reporterinę grupę, prijungtą per jungtuką L, ir QH yra pasirinktas iš –SH, –SeH, –NHNH₂ arba –ONH₂.

30

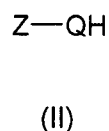
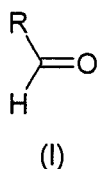
3. Būdas pagal 2 punktą arba panaudojimas pagal 1 punktą, kur R yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš vandenilio, –CH₃, –CH₂CH₃, –CH₂Cl, –CH₂N⁺(CH₃)₃Cl[–] ir –CH₂OCH₂C₆H₅; QH optimaliai yra –SH; ir Z yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš –CH₂CH₂OH, –CH₂CH(CO₂H)NH₂ ir 5'-adenozilo.

4. Būdas pagal 2 arba 3 punktą arba panaudojimas pagal 1 arba 3 punktą, kuriame X yra nepriklausomai pasirinktas iš pirminio amino grupės, tiolio grupės, 1,2-diolio grupės, halogenacetamido grupės, maleimido grupės, aldehido grupės, ketono grupės, azido grupės, alkino grupės, 1,3-dieno funkcijos, dienofilo funkcijos, arilhalogenido grupės, arilboroninės rūgšties grupės, galinės halogenalkino grupės, galinės silicio alkino grupės ir apsaugotos amino, tiolio, 1,2-diolio, hidrazino, hidroksilamino, aldehido, ketono ir 1,2-aminotiolio grupės.
5
5. Būdas pagal bet kurį iš 2-4 punktų arba panaudojimas pagal 1 arba 3-4 punktą, kur minėta biomolekulė yra nukleorūgščių molekulė, optimaliai DNR, ir minėta metiltransferazė yra DNR citozino-5 metiltransferazė, optimaliai pasirinkta iš grupės, susidedančios iš M.HhaI, M.SssI, M.HpaII ir M.AluI arba jų darinių.
10
6. Biomolekulės tikslinės derivatizacijos būdas, apimatis pirminį biomolekulės modifikavimą ir bet kurią iš tokių stadijų:
15
 - a) kovalentinį ligavimą su junginiu, turinčiu chemiškai aktyvią grupę, prie kurios gali būti kovalentiškai prijungiama modifikuotos biomolekulės funkcinė grupė X; arba
 - b) antrinį cheminį biomolekulės modifikavimą modifikuoto taikinio bazės vietoje, kur antrinis modifikavimas apima, be funkcinės grupės X, dar kitų prijungtų grupių reakcijas; arba
 - c) antrinį vidinį biomolekulės modifikavimą, apimantį prijungtos funkcinės grupės X tolimesnę cheminę reakciją su taikinio baze arba gretimomis bazėmis; arba
 - d) modifikuotos biomolekulės 5-hidroksimetilcitozino liekanos fermentinį antrinį modifikavimą;
- 25 b e s i s i k i r i a n t i s t u o , kad biomolekulės pirminis modifikavimas yra vykdomas būdu pagal 2-5 punktus.
7. Tikslinės derivatizacijos būdas pagal 6 punktą, kuriame minėto biomolekulės antrinio cheminio modifikavimo stadija b) modifikuotoje taikinio bazėje apima apdorojimą
30 švelniu oksidatoriumi, pavyzdžiui MnO_2 arba perjodato rūgštimi, po kurio seka susidariusios karbonilo grupės tolesnis selektyvus cheminis prijungimas prie junginių, turinčių grupę, reaguojančią su karbonilo grupe, pasirinktą iš pirminių aminių, hidrazino, hidroksilamino arba 1,2-aminotiolio.

8. Tikslinės derivatizacijos būdas pagal 6 punktą, kuriame minėto biomolekulės antrinio vidinio modifikavimo stadija c) apima prijungtos funkcinės grupės X tolimesnę cheminę reakciją su taikinio baze arba gretimomis bazėmis, dėl kurios modifikuotoje biomolekulėje žinomais metodais pakeičiamos taikinio bazės bazių poravimosi savybės, vykdomas taikinio bazės iškirpimas, grandinės perkirpimas arba grandinių skersinis susiuvimas.
9. Tikslinės derivatizacijos būdas pagal 6 punktą, kuriame minėtos modifikuotos biomolekulės 5-hidroksimetilcitozino liekanos fermentinio antrinio modifikavimo stadija d) vykdo bet kuriuo iš toliau nurodytų metodų:
 - i) apdoroja su UDP-gliukose: DNR D-gliukoziltransferaze ir UDP-gliukoze arba jų dariniais, kurių poveikyje D-gliukozė arba jos darinys yra tikslingai įterpiamas į biomolekulės taikinį; arba
 - ii) apdoroja su 5-hidroksimetilcitozino-DNR deaminaze, 5-hidroksimetilcitoziną paverčiant 5-hidroksimetiluridinu, ir ši konversija yra nustatoma, nuskaitant DNR seką; arba
 - iii) apdoroja su 5-hidroksimetilcitozino-DNR glikozilaze, modifikuotoje DNR formuojant abazinį taikinį, kuris gali būti toliau modifikuotas kitais žinomais metodais.
10. Biomolekulės tikslinio žymėjimo būdas, apimantis biomolekulės modifikavimą, įterpiant reporterinę grupę, kuri yra tinkama žymė ir kuri leidžia identifikuoti pažymėtą molekulę tarp kitų nežymėtų molekulių, besiskiriantis tuo, kad biomolekulė yra modifikuota pagal bet kurį iš 2-9 punktų.
11. Būdas pagal 10 punktą, kuriame žymė yra pasirinkta iš fluoroforų, fluorescencijos gesintojų, chromoforų, giminingumo žymenų, stabilių paramagnetinių grupių, radioaktyvių arba retus stabilus izotopus turinčių grupių, grupių, turinčių sunkiuosius atomus, tinkamus kristalografinių difrakcijos duomenų fazėms gauti, tarpgrandinės sąsajas formuojančių agentų, nukleorūšties karpančių grupių, haptelių, nano-dalelių ir rutuliukų.
12. Nemetilintų taikinių biomolekulėje nustatymo būdas apimantis biomolekulės modifikavimą esant metiltransferazei ir nustatymą, ar minėtos metiltransferazės taikiny

buvo modifikuotas, kur metiltransferazės taikinio modifikavimas nurodo nemetilinto taikinio buvimą, besiskiriantis tuo, kad biomolekulė yra modifikuota būdu pagal 2-5 punktus.

- 5 13. Būdas pagal 12 punktą, kuriame prijungtas junginys trukdo nukleorūšių padauginimą metiltransferazės atpažinimo sekose; ir nemetilinti taikiniai yra nustatomi testuojant, ar būta nukleorūšių molekulės padauginimo uždelsimo metiltransferazės atpažinimo sekose.
- 10 14. Būdas pagal bet kurį vieną iš 12 ar 13 punktų, kuriame prijungiamas junginys(iai) turi fluorescencinę žymę, ir nemetilinti taikiniai yra nustatomi matuojant fluorescencijos buvimą arba kiekį minėtoje nukleorūšių molekulėje.
- 15 15. Būdas pagal bet kurį vieną iš 12-14 punktų, kuriame modifikuojantis(ys) junginys(iai) yra prijungiami prie DNR citozino liekanos ir negali būti prijungti prie 5-metilcitozino liekanos.
- 20 16. Būdas pagal bet kurį iš 10-11 arba 12-15 punktų, kuriame žymė biomolekulėje, optimaliai DNR molekulėje, yra identifikuota DNR sekos nustatymu, hibridizacija, MALDI-TOF arba nustatant nukleozidų sudėtį po fermentinės fragmentacijos ir chromatografijos.
- 25 17. Rinkinys, skirtas atlikti būdą pagal bet kurį vieną iš 2-5, 6-9, 10-11 arba 12-15 punktų, apimantis nukreipiančiąją metiltransferazę ir nekofaktorinį junginį (I) arba junginius (I) ir (II),



- 30 kur R ir Z yra nepriklausomai pasirinkti iš H, D, C₁ – C₁₂-alkilo, optimaliai C₁-C₄-alkilo arba -LX, kur X yra funkcinė grupė arba reporterinė grupė, prijungta per jungtuką L, ir QH yra pasirinktas iš SH, -SeH, -NHNH₂ arba -ONH₂, patalpintus skirtinguose konteneriuose ir, nebūtinai, naudojimo instrukciją.

- 5
18. Sekai specifinio 2'-deoksicitidino darinio DNR gamybos būdas, besiskiriantis tuo, kad jis apima būdą pagal 2-5 punktus, ir 2'-deoksicitidino darinys DNR yra 5-(W)-2'-deoksicitidinas, kur W yra pasirinktas iš -CH(OH)R, -CH(R)QZ arba jų darinio, ir R, Q ir Z yra tokie, kaip nurodyta 1 punkte.
 19. Susidaręs DNR 2'-deoksicitidino darinys, kuris yra 5-(W)-2'-deoksicitidinas, kur W yra pasirinktas iš grupės, susidedančios iš 1-hidroksipropilo, 2-chlor-1-hidroksietilo, (2-hidroksietil)tiometilo, (2-amino-2-karboksietil)tiometilo, (5'-adenozil)tiometilo.

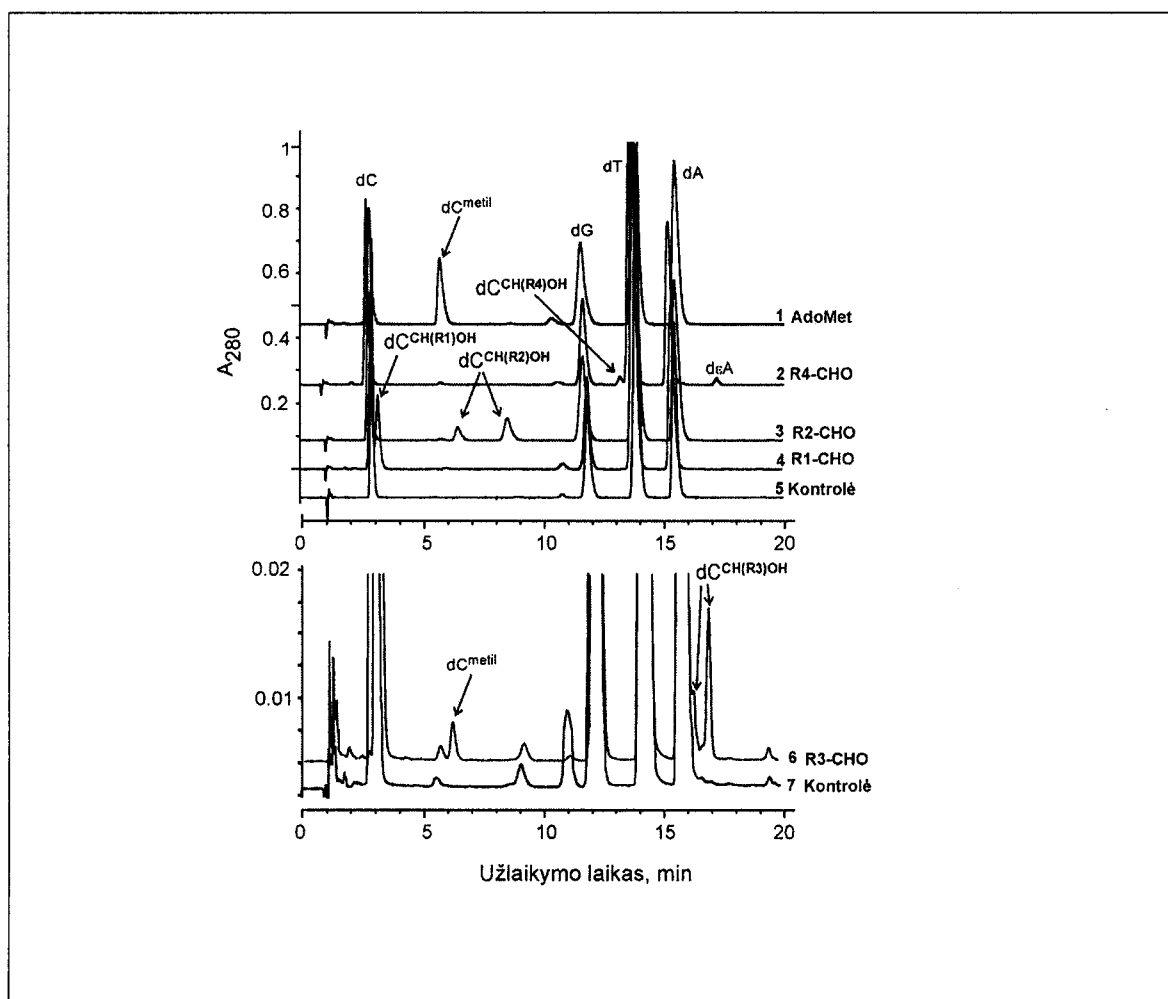


Fig. 1

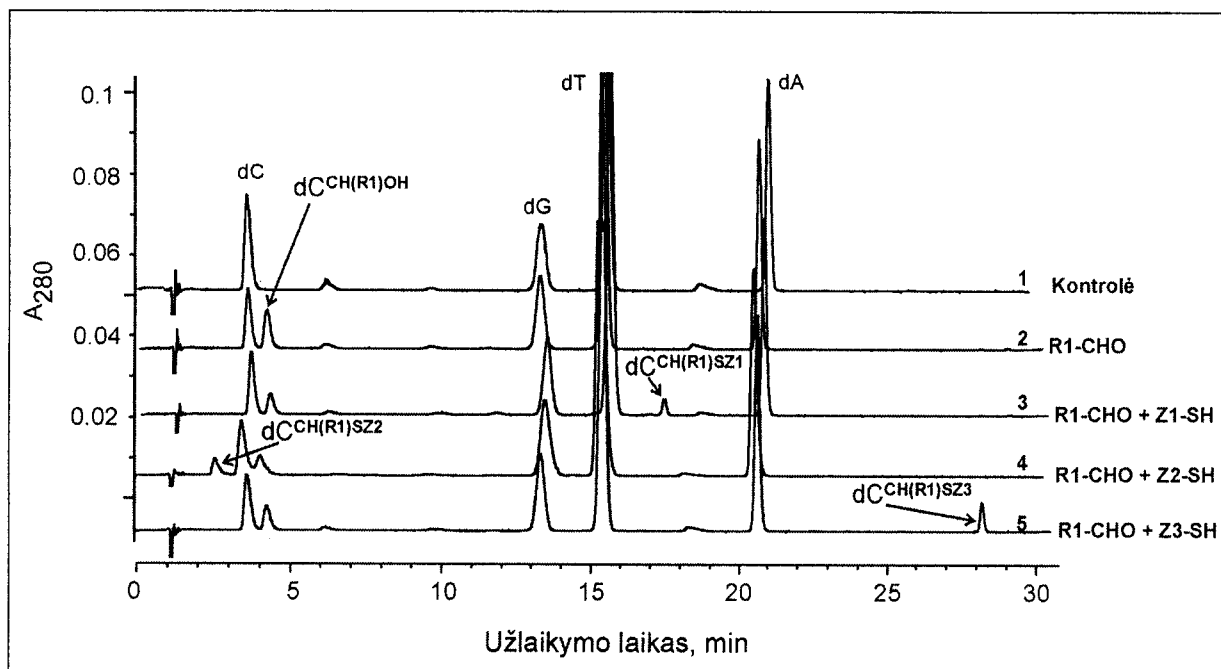


Fig.2

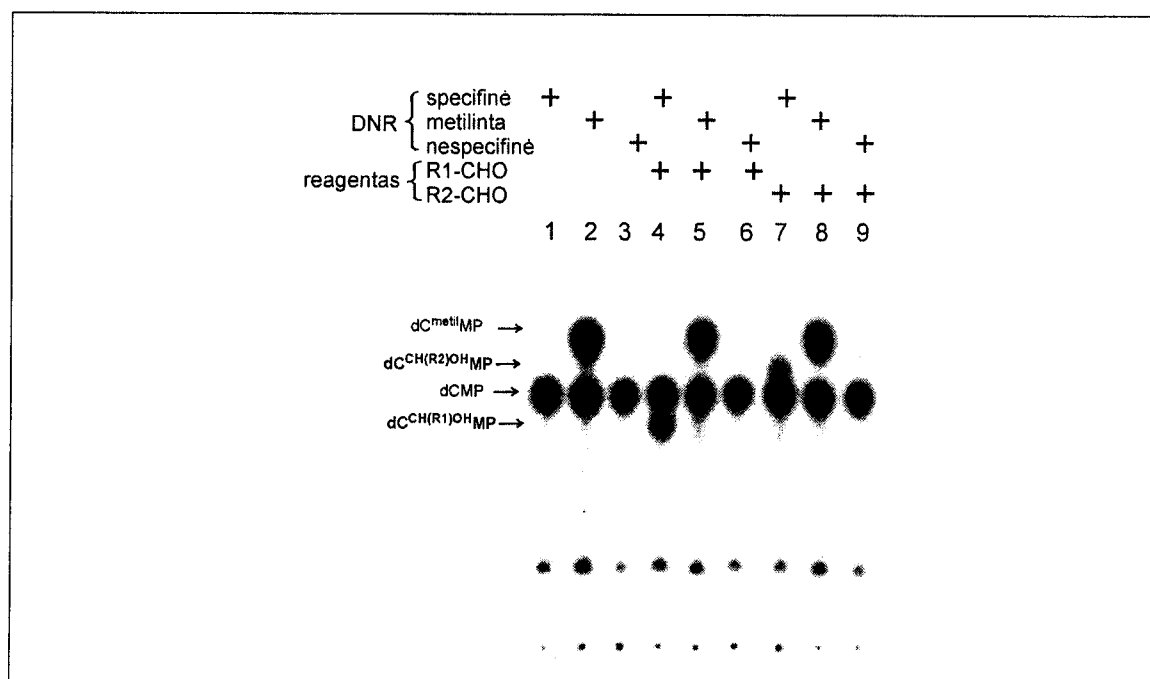


Fig. 3

3/5

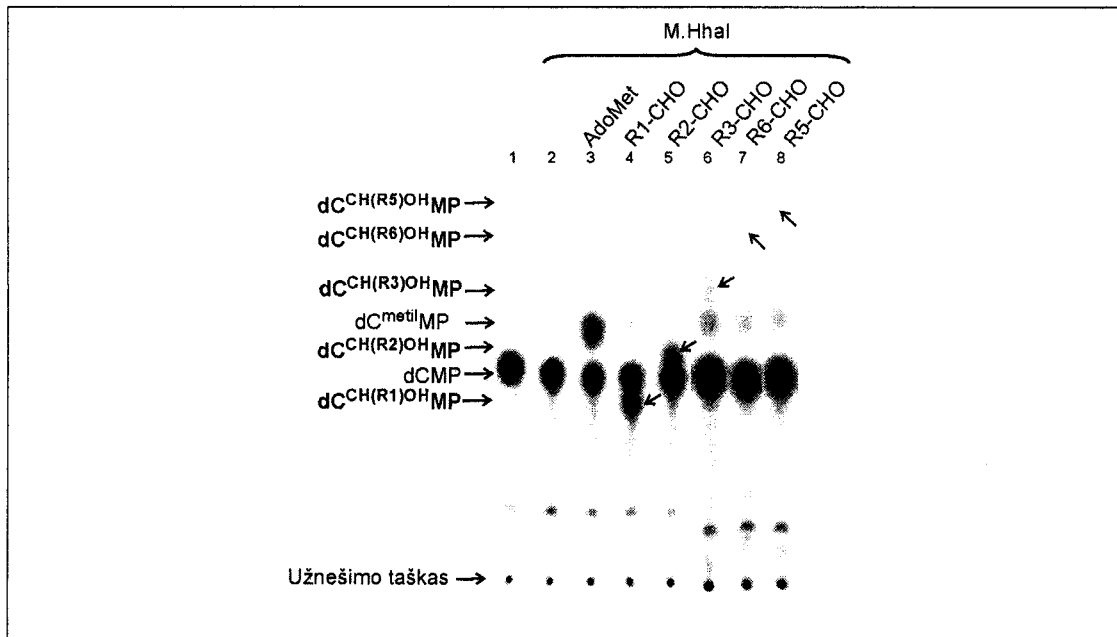


Fig. 4

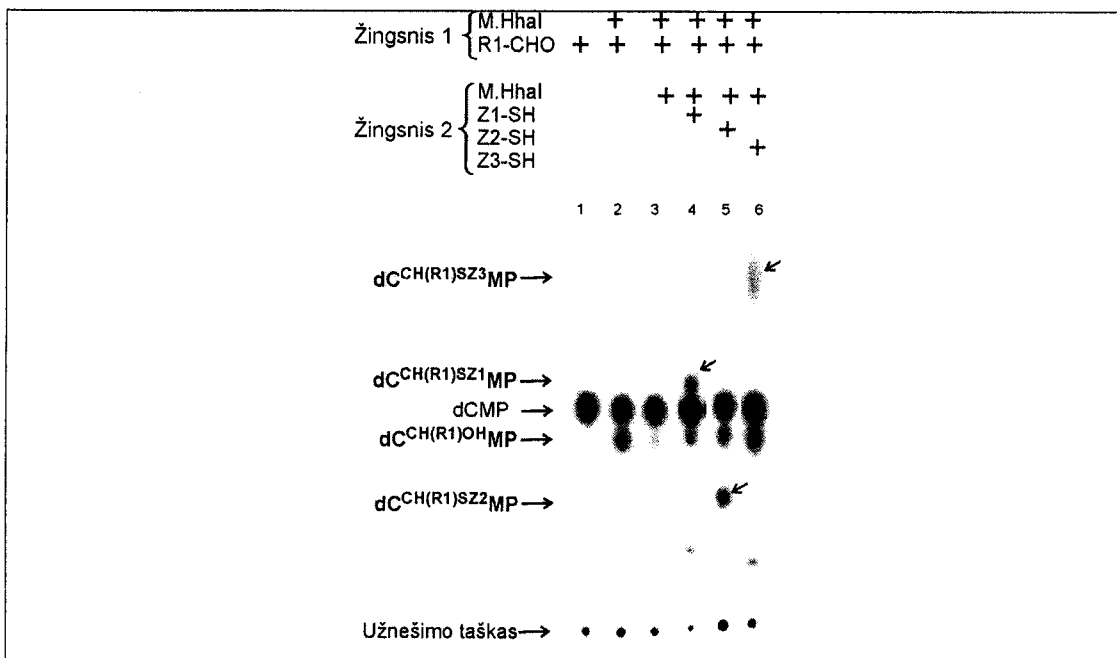


Fig. 5

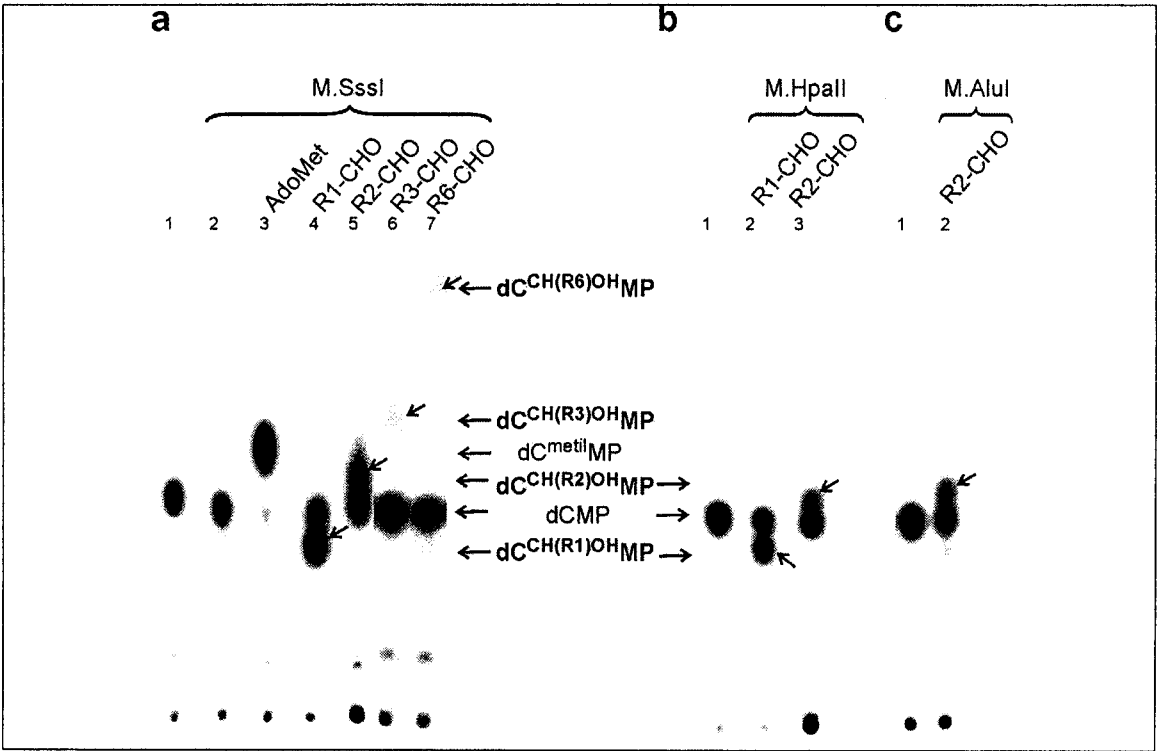


Fig. 6

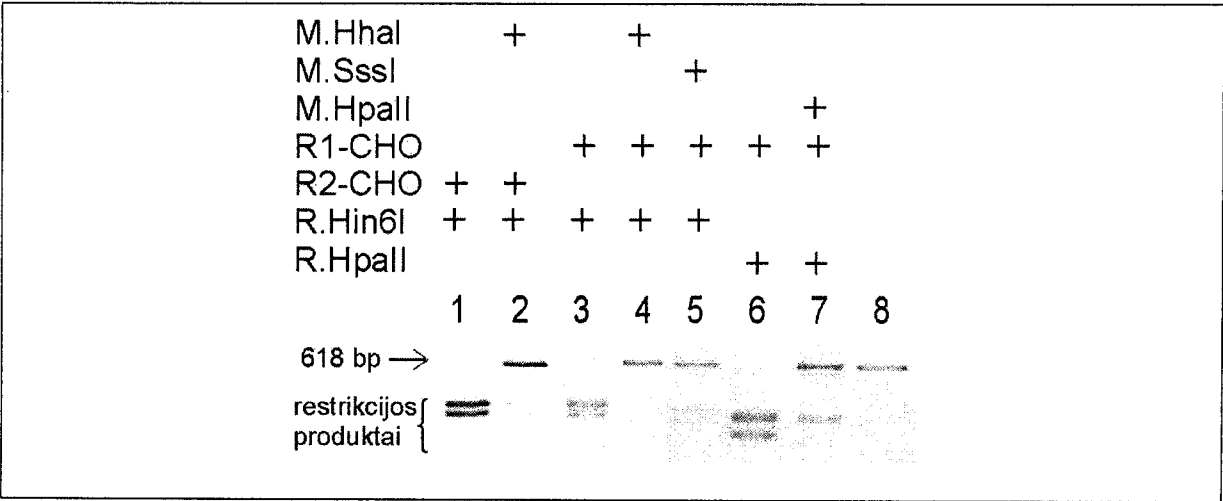


Fig. 7

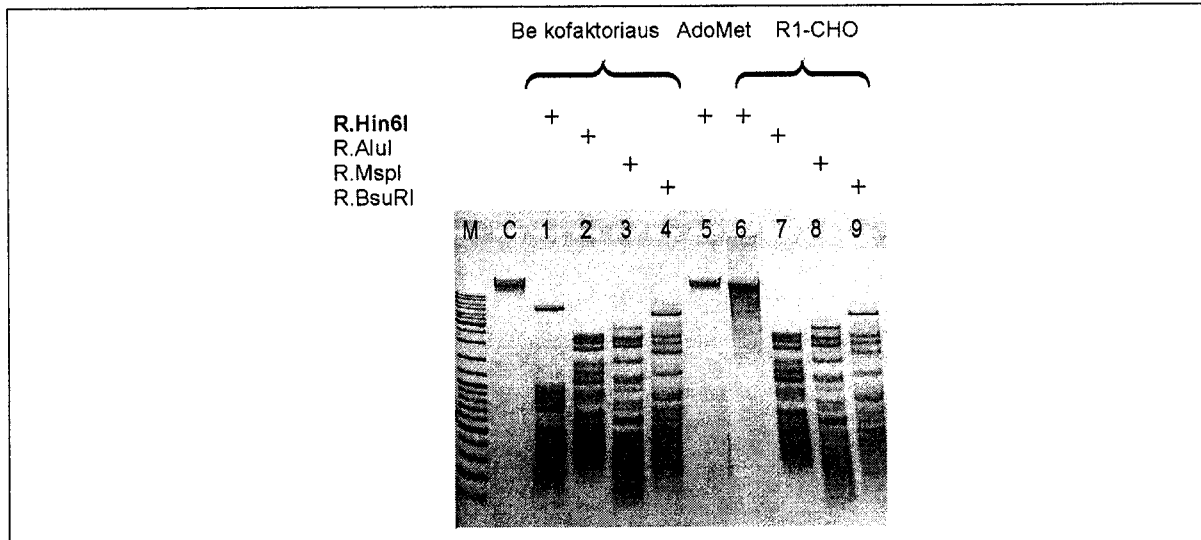


Fig. 8

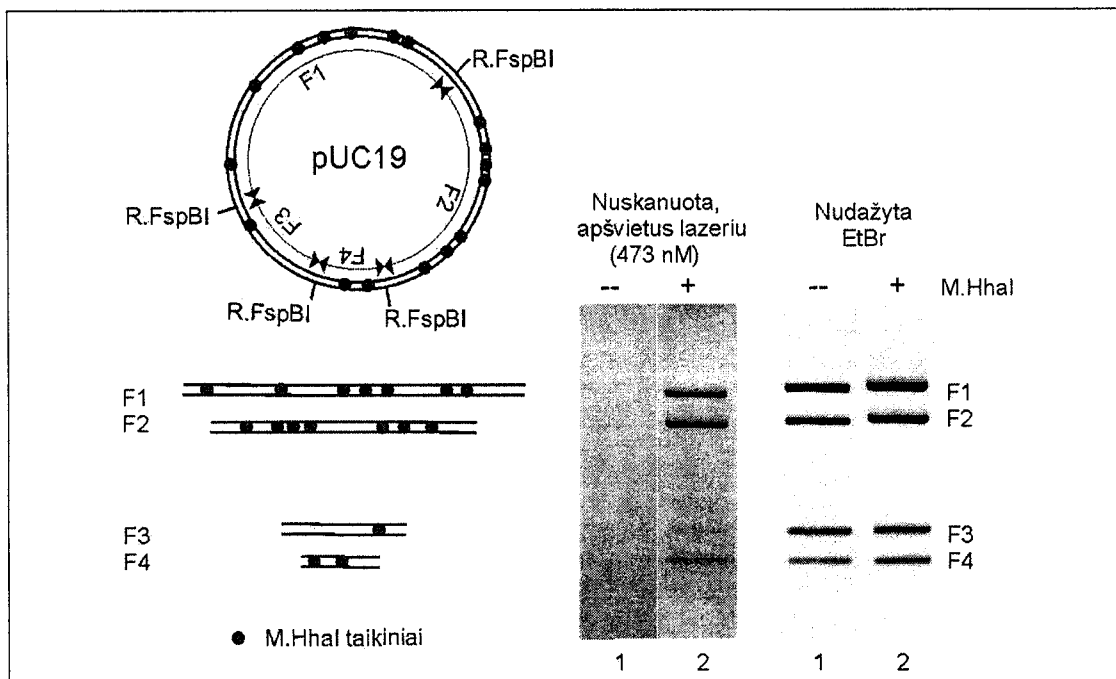


Fig. 9