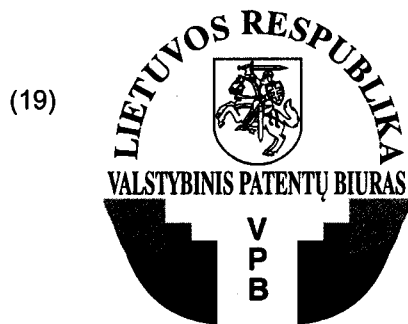




(10) **LT 6339 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **6339** (51) Int. Cl. (2016.01): **C12N 15/00**

(21) Paraiškos numeris: **2015 017**

(22) Paraiškos padavimo data: **2015-03-19**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2016-09-26**

(45) Patento paskelbimo data: **2016-12-27**

(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

Viktoras MASEVIČIUS, LT

(73) Patento savininkas:

VILNIAUS UNIVERSITETAS, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Law, J.Jasinskio g. 16A, LT-03163 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

DNR grandinės skėlimo 5-hidroksimetilcitozinų analizė

(57) Referatas:

Pateiktas 5-hidroksimetilcitozino liekanų vietų nustatymo genominėje DNR metodas, kuris apima tiriamos DNR veikimą DNR metiltransferaze ir selenoliu, kuomet DNR metiltransferazė prijungia selenolį prie 5-hidroksimetilcitozino liekanų, susidarant kovalentėms tarpnukleotidinėms jungtims, kurios lemia DNR grandinės trūkumus minėtose vietose, veikiant piperidinu.

Išradimo sritis

Išradimas susijęs su metiltransferazių vykdoma sekai-specifine modifikacija ir 5-hidroksimetilcitozino liekanų analizę DNR, konkrečiai su metiltransferazių vykdomu selenolių prijungimu prie 5-hidroksimetil grupės minėtose liekanose, bei oksidatoriaus poveikyje vykstančiu šių liekanų kovalentiniu susiuvimu su gretimais nukleotidais ir DNR grandinės trūkių susidarymu susiūtų liekanų vietose veikiant piperidinui, kurie leidžia nustatyti 5-hidroksimetilcitozino liekanų vietas genominėje DNR.

Išradimo technikos lygis

Kovalentinė citozino modifikacija 5-je padėtyje yra viena iš geriausiai ištirtų epigenetinių DNR reguliacijos mechanizmų organizmuose nuo augalų iki žinduolių. Pirminė epigenetinė DNR modifikacija yra 5-metilcitozinas (5mC), kuris susidaro pernešant metilo grupę nuo kofaktoriaus SAM DNR metiltransferazių pagalba. Ši DNR modifikacija yra plačiai paplitusi žinduolių genome CpG sekose. Tačiau nauji tyrimai parodė, kad veikiant TET oksigenazėms 5mC gali būti paverstas į 5-hidroksimetilcitoziną (hmC) ir po to į 5-formilcitoziną ar 5-karboksilcitoziną. Nors hmC yra antra labiausiai sutinkama modifikacija DNR (Tahiliani et al., 2009, *Science*, 324, 930-935; Kriaucionis & Heintz, 2009, *Science*, 324, 929-930), jos biologinė reikšmė nėra pakankamai ištirta, didžia dalimi dėl tyrimo metodų netobulumo. Neseniai mes atradome netipinę metiltransferazės vykdomą reakciją, kurios metu susidaro hmC. hmC toliau gali būti modifikuojamas metiltransferazės nesant jos gamtiniam kofaktoriui SAM (Liutkeviciute et al., *Nat Chem. Biol.*, 2009, 5: 400-402). Neseniai mes atradome, kad hmC liekanos gali būti selektyviai modifikuojamos tioliais ar selenoliais, susidarant atitinkamai 5-alkitiometilcitozinams arba 5-alkilselenometilcitozinams specifinėse DNR sekose in vitro (Liutkeviciute et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, 50, 2090–2093). Aprašyta, kad oksiduojant švelnias oksidantais, pvz., NaJO₄, panašūs 5-arilselenometilpirimidinų dariniai gali sudaryti kovalentinius metileno tiltelius su gretimais toje pat ar kitoje grandinėje esančiais puriniais (Peng ir kt., 2008, *J Am Chem Soc* 130, 10299-10306; Ding ir kt., 2008 *J Am Chem Soc* 130, 17981-17987); reakcija, manoma, vyksta 5-arilseleno(oksi)metilpirimidinų sigmatropinio persigrupavimo keliu susidarant elektrofiliniam 5-metilencitozino dariniui (IV, Pav. 1), kuris aktyviai reaguoja su kaimyninėmis guanino nukleobazėmis (Romieu et al. 2000 *Org Lett* 2, 1085-1088.; Bellon et al. 2001 *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* 20, 967-971; Zhang and Wang 2003, *J Am Chem Soc* 125, 12795-12802; Bellon et al. 2006, *Org Biomol Chem*

4, 3831-3837; Hong et al. 2006, *J Am Chem Soc* 128, 485-491; Ding et al. 2008 *J Am Chem Soc* 130, 17981-17987; Peng et al. 2008; *J Am Chem Soc* 130, 10299-10306).

Išradimo esmė

Čia pirmąkart pademonstruota, kad veikiant DNR alifatiniu selenoliu ir esant DNR C5-MTazei bei toliau švelniai oksiduojant NaJO₄, susidaro sekai-specifinės kovalentinės jungtys tarp hmC ir gretimo guanino (intra-grandininis guanino-metilcitozino aduktas G^mC); susidariusi jungtis lemia DNR grandinės trūkį veikiant piperidinu, kas leidžia nustatyti hmC buvimo vietą DNR.

hmC modifikacijų analizei CG dinukleotiduose naudojome MTazes M.HhaI ir M.SssI, kurių atpažinimo sekos yra GCGC ir CG (modifikuoja pabrauktą citoziną). Demonstraciniuose eksperimentuose naudojome modelinį DNR substratą, turintį hmC nucleotidą, kuris buvo modifikuotas selenoliu (2-aminoetanselenolis, R1-SeH; L-selenocisteinas, R2-SeH ir 2-(2-aminoetoksi) etanselenolis, R3-SeH) esant vienai iš MTazių, bei veikiamas NaIO₄.

Kadangi guanino nukleozidų alkilinimas susilpnina N-glikozidinę jungtį, galima buvo tikėtis, kad susiūtieji guaninai nesunkiai atskils nuo DNR grandinės, susidarant chemiškai nestabiliam abaziniam taikiniui. Iš tiesų, po inkubacijos su piperidinu ir produktų analizės poliakrilamidiniame (PAA) gelyje denatūruojančiomis ir nedenatūruojančiomis sąlygomis buvo stebimas DNR grandinės trūkių susidarymas pozicijose, atitinkančiose prognozuojamas G^mC dinukleotidų vietas. Taigi, eksperimentuose buvo stebimas padidintas DNR grandinės jautrumas trūkiams vietose atitinkančiose 5'- kaimyninius guaninus (pav. 2), tuo būdu parodant hmC buvimo vietas DNR. Grandinės skilimas nebuvo stebimas kontroliniuose eksperimentuose, nesant selenolio ar nepaveikus NaIO₄.

Paveikslų aprašymai

Šis išradimas toliau detaliau aprašomas naudojant paveikslus, kuriuose pateikta:

Pav. 1. Chemo-enzimatinių reakcijų schema, apibudinanti MTazių-sąlygotą selenolio prijungimą, oksidaciją ir kovalentinį hmC liekanų susiuvimą, lemiantį DNR grandinės trūkį ties gretimais guaninais.

Pav. 2. Sekai-specifinis hmC modifikacijų nustatymas DNR, naudojant

piperidinu indukuotą grandinės skilimą. 24-merinis DNR dupleksas, turintis 5'-gale žymėtą tikslinę grandinę, po reakcijos su M.HhaI ir selenoliu bei oksidacijos NaIO_4 buvo inkubuotas su 1 M piperidinu, o po to analizuotas 15 % poliakrilamidiniame gelyje ir autoradiografijos metodu. Takeliuose 4, 6 ir 8, kuriuose buvo M.HhaI ir perjodatas, aiškiai matomas trumpesnių DNR grandinių, kurios baigiasi ties G-hmC dinukleotidais, susidarymas. "Purinų" G+A takelis pagal Maxam-Gilbert įgalina DNR sekos sugretinimą, GhmCGC taikiniai yra paryškinti.

Detalus išradimo aprašymas

DNR substratų paruošimas

Oligonukleotidai

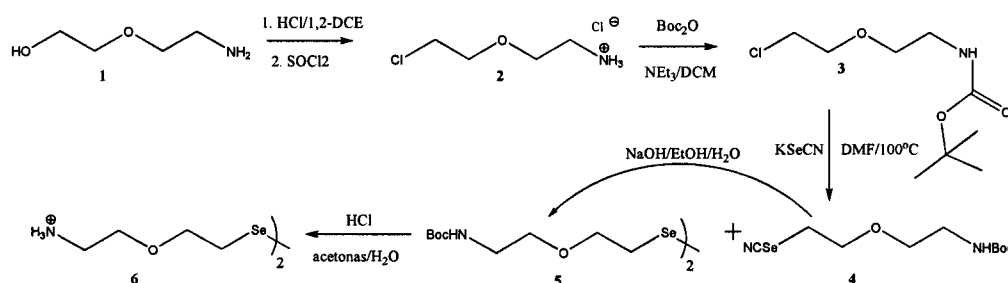
DNR oligonukleotidai (gryninti HPLC būdu) gauti iš IDT (JAV), IBA (Vokietija) ar Metabion (Vok.)

DNR substratų paruošimas

24-meriniai DNR dupleksai 5'-33P-TAATAATGMGCTAATAATAATAAT/3'-ATTATTACGHGATTATTATTATTA paruošti "sulydant" atitinkamas oligonukleotidų grandines.

Selenolių paruošimas

Selenoliai (R-SeH) paruošti prieš pat naudojimą iš atitinkamų diselenidų (R-Se-Se-R) pastaruosius redukuojant ditionitritoliu (DTT). Diselenidai R1-Se-Se-R1 ir R2-Se-Se-R2 yra komerciškai prieinami junginiai, tuo tarpu diselenidas R3-Se-Se-R3 (6) buvo susintetintas pagal žemiau aprašytas metodikas:



2-(2-chloretoksi)etanamino hidrochloridas (2)

Dietilenglikolaminas (3,0 g, 30 mmol) ištirpintas 150 ml 1,2-dichloreto, tirpalas prisotintas vandenilio chlorido dujomis. Į gautą suspensiją atšaldytą ledų vonioje supiltas sulfinilchloridas (6 ml, 81 mmol). Mišinys paliktas sušilti iki kambario

temperatūros, vėliau mišinys kaitintas 65 °C (smėlio vonios) temperatūroje 1 val. Tada tirpalas atšaldytas iki kambario temperatūros, tikslinis produktas išsodintas 80 ml dietileterio. Nuosėdos filtruotos, išeiga 3,8 g (83%). Balta kristalinė medžiaga, higroskopinė (lyd.t. 86-89°C).

^1H BMR (300 MHz, DMSO- D_6): δ = 2,97 (pl s, 2H, CH_2N); 3,67 (t, J = 5,4Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 3,70-3,80 (m, 4H, $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 8,15 (pl s, 3H, CH_2NH_3).

^{13}C BMR (75 MHz, DMSO- D_6): δ = 39,0; 44,1; 67,1; 71,05.

Tret-butil 2-(2-chloretoksi)etilkarbamatas (3)

Į 2-(2-chloretoksi)etanamino hydrochlorido (2) (1,1 g, 6,88 mmol) suspensiją dichlorometane (15 ml) supiltas trietilaminas (0,955 ml, 6,87 mmol). Tirpalui išskaidrėjus į mišinį subertas di-*tret*-butil karbonatas (1,35 g, 6,19 mmol). Reakcijos mišinys maišytas 3 dienas kambario temperatūroje (argono atmosfera). Tada 15 ml 0,5 M HCl supilta į reakcijos mišinį, organinis sluoksnis atskirtas, plautas sūrymu ir džiovintas natrio sulfatu. Nugarinus dichlorometaną gautas 1 g (70%) tikslinio produkto bespalvės alyvos pavidalu.

^1H BMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 1,47 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 3,30-3,40 (m, 2H, CH_2N); 3,59 (t, J = 5,1Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 3,60-3,77 (m, 4H, $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 4,95 (pl s, 1H, NHBoc).

^{13}C BMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 28,6; 40,5; 43,1; 70,5; 71,2; 79,6; 156,2.

N, *N'*-bis-Boc-bis[2-(2-aminoetoksi)etil]diselenidas (5)

Į *tret*-butil 2-(2-chloretoksi)etilkarbamato (3) (0,5 g, 2,23 mmol) tirpalą dimetilformamide (5 ml) subertas kalio selenocianatas (1,3 g, 9,03 mmol). Reakcijos mišinys kaitintas 90°C (smėlio vonios) temperatūroje 8 val. Tada tirpalas atšaldytas iki kambario temperatūros, į mišinį įpiltas vanduo (10 ml). Tikslinis produktas ekstrahuotas dietileteriu, organinis sluoksnis du kartus praplautas vandeniu (2 x 10 ml) ir džiovintas natrio sulfatu. Nugarinus dietilerį gautas Bis-Boc diselenido 5 ir pakeitimo produkto 4 mišinys. Šie junginiai jų neatskiriant ištirpinti etanolyje (0,5 ml), į šį mišinį supiltas 6M NaOH (0.1 ml) vandeninis tirpalas. Reakcijos mišinys užvirintas ir iš karto atšaldytas iki kambario temperatūros. Produktas ekstrahuotas dietileteriu, organinis sluoksnis

džiovinatas natrio sulfatu. Nugarinus dietileterį gauta 0,41 g (69%) tikslinio produkto gelsvos alyvos pavidalu.

^1H BMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 1,48 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 3,13 (t, J = 6,9 Hz, 2H, $\text{SeCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 3,29-3,40 (m, 2H, CH_2N); 3,56 (t, J = 5,1 Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 3,77 (t, J = 6,9 Hz, 2H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 5,00 (pl s, 1H, NHBoc).

^{13}C BMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 28,7; 29,4; 40,6; 70,1; 71,0; 79,6; 156,2.

bis[2-(2-aminoetoksi)etil]diselenido hidrochloridas (6)

Į *N, N*-bis-Boc-bis[2-(2-aminoetoksi)etil]diselenido (5) (0.18 g, 0.34 mmol) tirpalą acetono (2 ml) ir vandens (2 ml) mišinyje supilta konc. HCl (0.28 ml, 3.4 mmol). Reakcijos mišinys kaitintas 60°C temperatūroje 24 val. Tirpikliai nugarinti sumažintame slėgyje, gauta 0.07 g (85%) tikslinio produkto bespalvių kristalų pavidale.

^1H BMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 2.95-3.05 (m, 2H, CH_2N); 3.15 (t, J = 6,6 Hz, 2H, $\text{SeCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 3.65 (t, 2H, J = 5,4 Hz, CH_2O); 3.73 (t, 2H, J = 6,6 Hz, OCH_2); 8.05 (pl s, 3H, CH_2NH_3).

^{13}C BMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 29.2; 39.1; 66.8; 71.0.

Sekai-specifinis hmC modifikacijų nustatymas DNR, naudojant grandinės skėlimo piperidinu reakciją

DNR (30 nM taikinių konc.) veikiama 200 nM M.HhaI (taikinio seka GCGC) ir 12.5 mM selenolio reakcijos buferyje (15 mM Na-citratas pH 5.5, 0.2 mg/mL BSA) 1 val. kambario temperatūroje. DNR išgryninama naudojant Oligo Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research) ir Oligo Clean-Up and Concentration (Norgen Biotek Corp.) rinkinį ir inkubuota su 20 mM NaIO₄ (10 mM Na-PO₄ pH 7.5 buferyje) 1 val kambario temperatūroje. Pridėjus oiperidino iki 1M koncentracijos reakcija inkubuota 30 min 90°C temp., ir po to liofilizuota. Likutis suspenduotas gelio užnešimo tirpale (STOP solution, Thermo Fisher Scientific), denatūruotas 3 min 95°C temp. ir užneštas į 15% PAA gelį su 7 M ūrėja. Elektroforezė vykdyta 1-4 val 90 mM Tris-borato (pH 8.3), 2 mM Na₂EDTA buferyje 60 W pastovaus galingumo režime. Geliai nusausti Whatman 3MM popieriumi ir radioaktyvios juostos autoradiografuotos su vaizdinimo plokšte (Fujifilm) bei skanuotos su FLA-5100 vaizdintuvu. Purinų (G+A) takeliai paruošti naudojant tradicines Maxam-Gilbert cheminės sekoskaitos reakcijas

(Sambrook and Russell, 2001). Sanger'io sekoskaitos reakcijas vykdytos naudojant CycleReader™ DNA Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific).

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Būdas, skirtas 5-hidroksimetilintų DNR CG vietų padėčių modifikavimui, kur būdas apima DNR paveikimo alifatiniu selenoliu žingsnį, dalyvaujant metiltransferazei, po to sekančiu oksidavimu švelniais reagentais, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šio poveikio pasekoje susidaro kovalentinis ryšys tarp taikinio 5-hidroksimetilcitozino (hmC) liekanos ir gretimo guanino liekanos.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad alifatinis selenolis yra parinktas iš 2-aminoetilselenolio, L-selenocisteino ir 2-(2-aminoetoksi)etilselenolio.

3. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta metiltransferazė yra DNR citozino-5 metiltransferazė, geriau M.HhaI arba M.SssI.

4. Būdas pagal bet kurį iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas švelnus reagentas yra NaIO₄.

5. Būdas pagal bet kurį ankstesnį punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad papildomai apima modifikuotos DNR sekos paveikimo piperidinu pakopą, kur piperidinu indukuotas DNR grandinės skilimas rodo hmC liekanos buvimą DNR vietai.

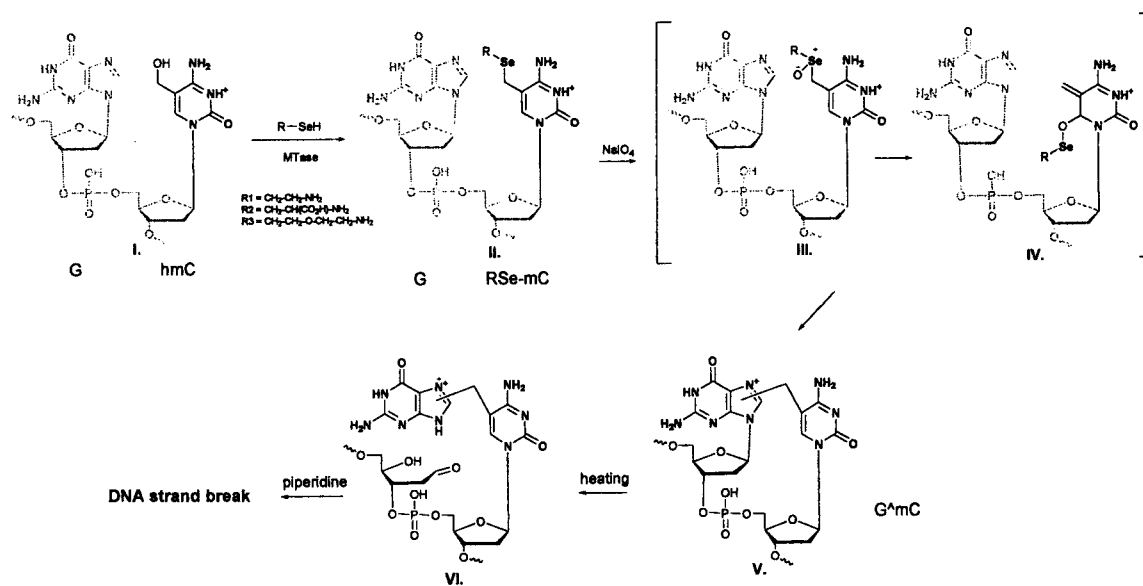


Fig.1

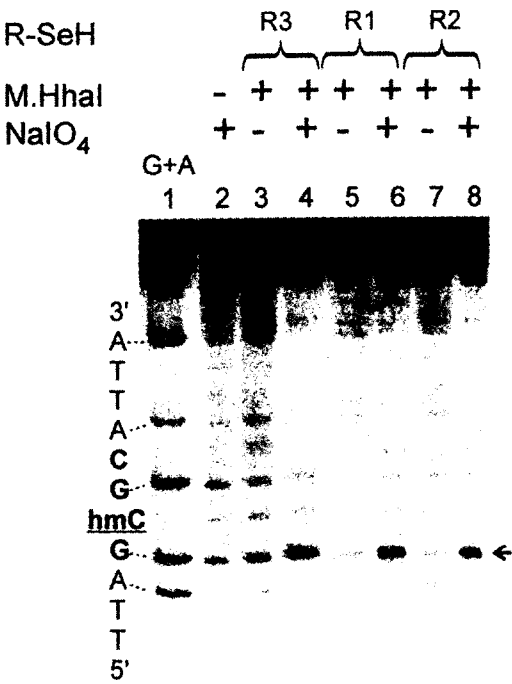


Fig. 2