

(19)



(10) **LT 6340 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **6340**

(51) Int. Cl. (2016.01): **C12N 15/00**

(21) Paraiškos numeris: **2015 018**

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

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

(45) Patent 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) Patent 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:

5-Hidroksimetilcitozinų DNR sekos analizė

(57) Referatas:

Pateiktas 5-hidroksimetilintų CG sekų vietų nustatymo genominiame DNR metodus, kuris apima tiriamos DNR veikimą nukleorūgšties polimeraze, kuomet nukleorūgšties polimerazė sintetina nukleorūgšties molekulę nuo matricos, turinčios kovalentines tarpnukleotidines jungtis minėtų 5-hidroksimetilintų CG sekų vietose.

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 poveikį vykstančiu šių liekanų kovalentiniu susiuvimu su gretimais nukleotidais ir DNR polimerazės grandinės sintezės nutraukimu susiūtų liekanų vietose, kurios atskleidžia 5-hidroksimetilcitozino liekanų vietas genomine 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-alkitimetilcitozinams 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 purinais (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 polimerazės vykdomos dukterinės DNR grandinės sintezės nutrūkimą, kas leidžia nustatyti hmC buvimo vietą DNR.

hmC modifikacijų analizei CG dinukleotiduose naudojome MTazes M.SssI ir M.HhaI, kurių atpažinimo sekos yra CG ir GCGC (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 NaJO₄.

Yra žinoma, kad DNR polimerazių vykdoma DNR grandinės pratęsimo reakcija stringa ties susiūtais nukleotidais matricinėje grandinėje, susidarant trupesnei dukterinei DNR grandinei. Iš tiesų, vykdant grandinės pratęsimo reakcijas su T4 DNA pol. (Pav. 2) arba Taq DNA pol. (Pav. 3), naudojant DNR matricomis perjodatu veiktus pavyzdžius, buvo stebimas DNR grandinės sintezės nutrūkimas pozicijose, atitinkančiose selenoliu modifikuotas hmC liekanas, tuo būdu parodant hmC buvimo vietas DNR. Grandinės nutrūkimas nebuvo stebimas kontroliniuose eksperimentuose, nesant MTazės ar nepaveikus NaJO₄.

Paveikslų aprašymai

Šis išradimas toliau detaliau aprašomas naudojant paveikslus, kuriuose pateikta:

Pav. 1. Chemo-enzimatinė reakcijų schema, apibudinanti MTazių-sąlygotą selenolio prijungimą, oksidaciją ir kovalentinį hmC liekanų susiuvimą, lemiantį DNR polimerazės užstrigimus ties susiūtais nukleotidais.

Pav. 2. Sekai-specifinis hmC modifikacijų nustatymas DNR, naudojant polimerazės grandinės pratęsimo reakciją. DNR turintis hmC modifikacijas GCGC

sekose buvo inkunbuota su M.HhaI ir selenoliu, oksiduota su NaIO₄ ir analizuota polimerazių pagalba. Pradmens pratęsimo reakcijos naudojant naudojant DNR matricomis perjodatu veiktus pavyzdžius (takeliai 2, 4 ir 6) buvo stebimas DNR grandinės sintezės nutrūkimas pozicijose, atitinkančiose selenoliu modifikuotas hmC liekanas. Sanger'io sekoskaitos takeliai (G, C, T, A) įgalina DNR sekos sugretinimą, GCGC taikiniai yra paryškinti.

Pav.3. Hidroksimetilintų CG taikinių nustatymas DNR, naudojant polimerazės grandinės pratęsimo reakciją. 618 bp DNR fragmentas, kuriame visi citozinai pakeisti į hmC, buvo inkubuotas su M.SssI ir selenoliu, oksiduotas natrio perjodatu, ir galop analizuotas Taq polimerazės pradmens pratęsimo reakcijose. Pradmens pratęsimo reakcijos naudojant perjodatu oksiduotus pavyzdžius (takeliai 3 ir 5) aiškiai matomas trumpesnių DNR grandinių, kurios baigiasi ties hmC nukleotidais, susidarymas. Sanger'io sekoskaitos takeliai (G, C, T, A) įgalina DNR sekos sugretinimą, CG 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

618 bp ir 1252 bp DNR fragmentai paruošti standartiniu PGR metodu naudojant pUC19 plazmidės matricą ir, atitinkamai, pradmenų poras 5'-AACGTTGTTGCCATTGCTAC, 5'-GCTCATGAGACAATAACCCTGA arba 5'-CTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTG, 5'-GATACCGCTCGCCGCAG. Po PGR amplifikacijos, DNR fragmentai išgryninti naudojant QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). DNR, turinti hmC liekanas GCGC sekose, paruošta pagal (Liutkeviciute et al, Nat Chem. Biol., 2009, 5: 400-402) inkubuojant 120 ng/μl DNR su 8 μM M.HhaI ir 13 mM formaldehido 1 val. kambario temperatūroje reakcijos buferyje (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 0,5 mM Na₂EDTA 0,2 mg/ml BSA) bei išgryninant susidariusią DNR su QIAquick PCR Purification Kit.

Sekai-specifinis hmC modifikacijų nustatymas DNR naudojant pradmens

pratęsimo reakciją

hmC analizė GCGC sekose (reakcijos su M.HhaI). 1252 bp PGR fragmentas (38 ng/μl, 0,44 μM taikinių konc) veikiamas M.HhaI (5 μM) ir 12,5 mM selenoliu reakcijos buferyje (15 mM Na-citratas pH 5,5, 0,2 mg/ml BSA) 1 val. kambario temperatūroje. DNR išgryninama naudojant QIAquick PCR Purification Kit ir inkubuojama su 10 mM NaIO₄ (10 mM Na-PO₄ pH 7,5 buferyje) 1 val. kambario temperatūroje, ir gryninimas rinkiniu pakartojamas.

Pradmens pratęsimo reakcijos naudojant T4 DNR polimerazę. Modifikuota DNR pakaitinta 3 min. 95°C ir po to staigiai perkelta ant ledo. 20 nM 5' žymėtas pradmuo (5'-GATACCGCTCGCCGCAG), 0,2 mM dNTP ir buferis (T4 polymerase buffer, Thermo Fisher Scientific) pridėti į denatūruotą šaltą DNR tirpalą. Pradmens hibridizacija vykdyta 3 min. 54 °C temp., po to vėl pernešant mėginį ant ledo. Pridėjus T4 polimerazės (0.031 vnt/μl), mėginiai inkubuoti 20 min. 37 °C temp. Reakcija sustabdyta pridedant 1/3 tūrio STOP solution (Thermo Fisher Scientific).

DNR sekoskaitos reakcijas (palyginamiesiems takeliams) vykdytos naudojant CycleReader™ DNA Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific).

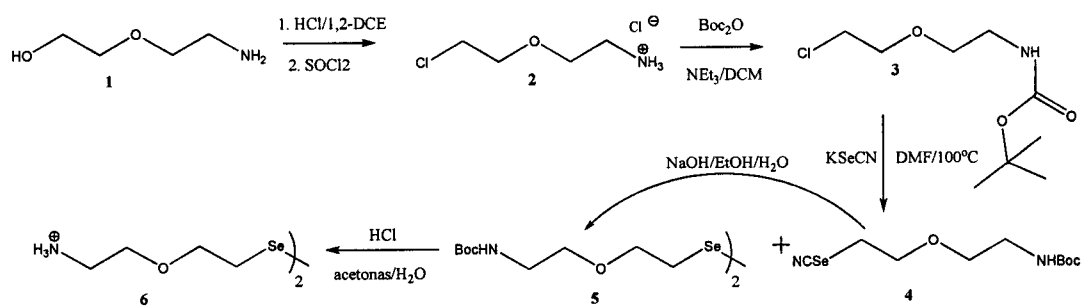
hmC analizė CG sekose (reakcijos su M.SssI). 618 bp PGR fragmentas (63 ng/μl, 5 μM taikinių konc.) veikiamas M.SssI (10 μM) ir 12,5 mM selenolio reakcijos buferyje (50 mM Na-acetatas pH 6,0, 0,2 mg/ml BSA) 1 val. kambario temperatūroje. DNR išgryninama naudojant QIAquick PCR Purification Kit ir inkubuota su 10 mM NaIO₄ (10 mM Na-PO₄ pH 7,5 buferyje) 1 val. kambario temperatūroje, ir gryninimas rinkiniu pakartojamas.

Pradmens pratęsimo reakcijos naudojant Taq DNR polimerazę. Modifikuotos DNR ir kontroliniai pavyzdžiai buvo sekvenuojami naudojant 0.2 mM dNTP, 130 ng DNR, 50 nM 5' žymėto pradmens 5'- AACGTTGTTGCCATTGCTAC ir 0,125 vnt./μl Taq pol. 8 μl reakcijos tūryje su Sequencing buffer. PGR reakcijos sąlygos: 1) 95 °C 3 min., 2) 95 °C 1 min, 3) 49 °C 1 min., 4) 72 °C 1 min; žingsniai 2-4 kartojami 25 kartus. PGR reakcija sustabdyta pridedant 4 μl STOP solution (Thermo Fisher Scientific).

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

buvo susintetintas pagal žemiau aprašytas metodikas:



IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Būdas, skirtas 5-hidroksimetilintų CG sekų nustatymui DNR, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad būdas apima matricos nukleorūgšties sekos veikimą nukleorūgšties polimeraze, esant sąlygoms, kurios leidžia nukleorūgšties polimerazei produkuoti nukleorūgšties molekulę nuo matricos, kur matricos nukleorūgšties seka turi tarpnukleotidines kovalentines jungtis minėtos 5-hidroksimetilintos CG vietos padėtyje.

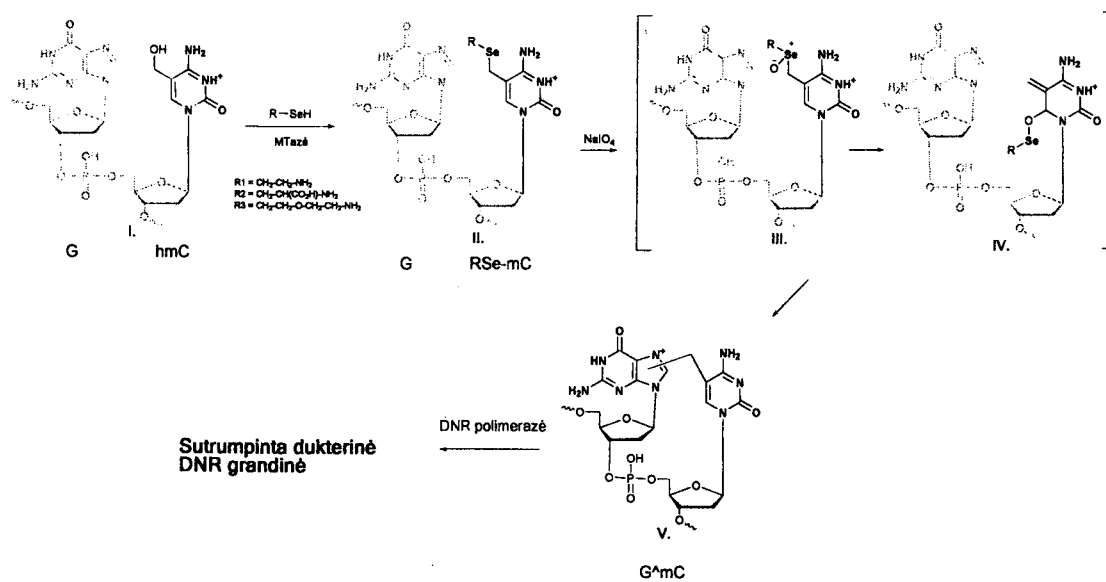
2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta tarpnukleotidinė kovalentinė jungtis 5-hidroksimetilintos CG vietos padėtyje yra pasiekama DNR veikiant alifatinio selenolio, dalyvaujant metiltransferazei, po to sekančiam oksidavimui švelniais reagentais.

3. Būdas pagal 2 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.

4. Būdas pagal 2 arba 3 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.

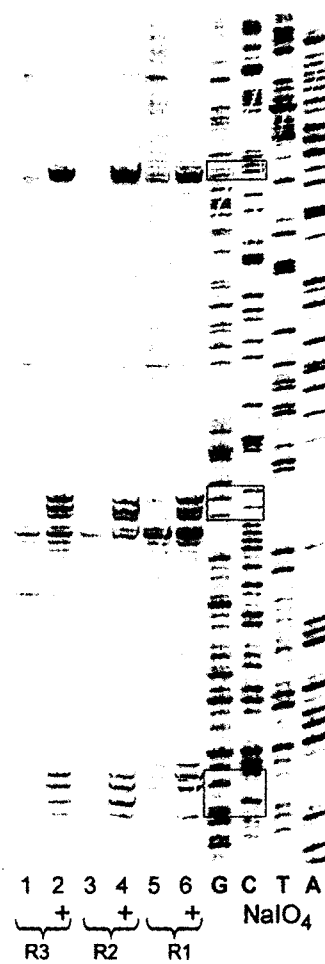
5. Būdas pagal bet kurį iš 2-4 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas švelnus reagentas yra NaIO_4 .

1/3



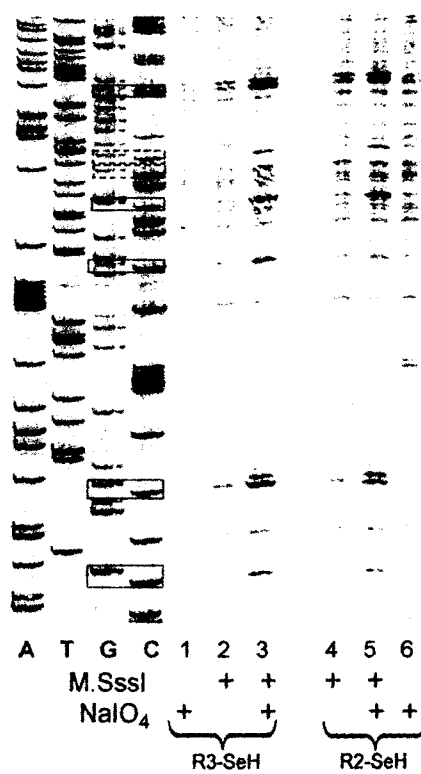
Pav.1

2/3



Pav. 2

3/3



Pav. 3