

VYTAUTO DIDŽIOJO UNIVERSITETAS

GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS

BIOLOGIJOS KATEDRA

Julija Stukalina

**CpG metilinimo įtakA restrikcijos endonukleazių katalizuojamai DNR hidrolizEI**

Magistrinis baigiamasis darbas

Molekulinės biologijos ir biotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 621C71001

Molekulinės biologijos, biofizikos ir biochemijos studijų kryptis

**Vadovai**: Gamtos mokslų daktaras. Arūnas Lagunavičius \_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_

(Mokslinis laipsnis, vardas, pavardė) (parašas) (data)

Nina Urbelienė \_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_

(Mokslinis laipsnis, vardas, pavardė) (parašas) (data)

**Apginta** prof. habil. dr. Algimantas Paulauskas \_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_

(Fakulteto/studijų instituto dekanas/direktorius) (parašas) (data)

Kaunas, 2013

**TURINYS**

**SANTRAUKA 4**

**SUMMARY 5**

**ĮVADAS 7**

1. **LITERATŪROS APŽVALGA 8**
   1. Epigenetikos samprota 8
   2. Epigenetinių modifikacijų charakteristikos 9
   3. DNR metilinimas ir jo paplitimas 11
      1. CpG salos, jų metilinimas 14
      2. DNR metilinimas kaip biomarkeris 15

### Restrikcijos - modifikacijos (R-M) sistemos 16

#### Atradimas, paplitimas ir funkcijos 16

#### R-M sistemų nomenklatūra 17

* + 1. R-M sistemų klasifikacija ir savybės 18
       - 1. I ir III tipų R-M sistemos 18
         2. II tipo R-M sistemos 19
         3. II M tipo restrikcijos endonukleazės 22
         4. IV tipo R-M sistemos 25

1.4.4. Restrikcijos endonukleazių jautrumas metilinimui 26

1.5. Pagrindiniai kiekybinės PGR veikimo principai 28

1.6. Pagrindiniai radioaktivumo matavimo principai 28

1. **MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI 30**

2.1. Aparatūra ir darbo priemonės 30

2.2. Medžiagos 30

2.2.3. Reagentai 30

2.2.1. Buferiniai tirpalai 31

2.2.1. Rinkiniai 31

2.2.2. Fermentai 31

2.2.5. Oligonukleotidai ir pradmenys 32

2.3. Tyrimo metodai 32

2.3.1. Oligonukleotidų paruošimas 32

2.3.2.5‘galo viengrandžio oligonukleoido fosforilinimas 33

2.3.3.Radioaktyvumo nustatymas 33

2.3.3. Oligonukleotidų hidrolizė 33

2.3.4. Mėginių paruošimas vertikaliai DNR elektroforezei 34

2.3.5. 15% akrilamido su bisakrilamidu ir karbamidu tirpalo paruošimas 34

2.3.6. 15 % PAA (poliakrilamidinio) gelio paruošimas 34

2.3.7. Vertikali DNR elektroforezė 34

2.3.8. Rezultatų vizualizavimas 34

2.3.9. Žmogaus genominės DNR restrikcija 35

2.3.10. kPGR sistemos parinkimas 35

2.3.11. Mėginių paruošimas kalibracinės tiesės gavimui 35

2.3.12. Tikslinės geno dalies padauginimas kPGR metodu 36

1. **DARBO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS 37**

3.1. Kontrolinė sistema restrikciniam įvertinimui 37

3.1.1.Kontrolinių oligonukleotidų formavimas 37

3.1.2. Restrikcijos endonukleazių jautrumo metilinimui įvertinimas 38

3.2. Modelinės sistemos, DNR metilinimui įvertinti, kūrimas 45

3.2.1. Tikslinės žmogaus gDNR srities tyrimas kPGR metodu 46

**IŠVADOS 47**

**PADĖKA 48**

**LITERATŪROS SĄRAŠAS 49**

**SANTRAUKA**

**Magistro baigiamojo autorė:** Julija Stukalina.

**Magistro baigiamojo darbo pavadinimas:**. CpG metilinimo įtaka restrikcijos endonukleazių katalizuojamai DNR hidrolizei.

**Darbo vadovai:** dr. Arūnas Lagunavičius ir Nina Urbelienė.

**Darbas atliktas:** 2012 – 2013 m. Inc Thermofisher Scientific, Vilniaus padalinyje.

**Darbas pristatytas:** Vytauto Didžiojo Universitete, Gamtos mokslų fakultete.

Kaunas, 2013

**Puslapių skaičius:** 54

**Lentelių skaičius:** 16

**Paveikslų skaičius:** 15

**Priedų skaičius:** 1

Per pastaruosius 20 metų mokslinis pasaulis sparčiai pasistūmėjo į priekį, ir toks intensyviai besivystantis mokslas kaip epigenetika įnešė milžinišką indelį tiriant žmogaus biologinių požymių genotipinę, fenotipinę ir fiziologinę raišką. Epigenetinų reguliacijų tyrimai padėjo suprasti ne tik kancerogenezės mechanizmus, bet ir kitus mechanizmus, kurie nepaklūsta Mendelio dėsniams. Genetiniai pokyčiai negali būti sukoreguoti ir, kaip rezultatas, pažeisto geno funkcijos negrįžtamai prarandamos, tačiau epigenetinės modifikacijos teoriškai yra grįžtamos, ir teisingai parinktas terapeutinis poveikis leistų gydyti ne tik vėžinius susirgimus, bet ir kitus fiziologinius organizmo sutrikimus.

Šio darbo metu buvo tiriamas restrikcijų endonukleazių jautrumas pavienių CpG metilinimui. Parinkti sintetiniai oligonukleotidai, kuriuos veikiant atitinkama restrikcijos endonukleaze buvo nustatytas fragmentacijos lygis. Buvo sukurta modelinė sistema, leidžianti analizuoti tam tikrų žmogaus genominės DNR sričių metilinimo lygius. Remiantis šia sistema nustatytas pasirinkto amplikono metilinimo lygis.

**ABSTRACT**

**Author of Masters Thesis:** Julija Stukalina.

**Full title of Masters Thesis:** CpG methylated DNA hydrolysis by restriction endonucleases.

**Supervisors:** Phd. Arūnas Lagunavičius and Nina Urbelienė

**Work accomplished:** During y. 2012 – 2013 in Inc Thermofisher Scientific, Vilnius site.

**Presented at:** Vytautas Magnus University, Faculty of Biology

Kaunas, 2013

**Namber of pages:** 54

**Number of tables:** 16

**Number of pictures:** 15

**Number of appendices:** 1

Epigenetics, being a very dynamic discipline, has made a considerable progress during last 20 years in deciphering the mechanisms of genotypical, phenotypical and physiological expression of human biological traits. Studies in epigenetic regulations provided great insight into the mechanisms of cancerogenesis, as well as other non-Mendelian mechanisms. In contrast to the genetic lesions that could not be corrected whereupon the function of affected gene is irreversibly impaired, epigenetic modifications in principle could be reversed, and well designed therapeutic intervention could become effective against cancer and other physiological malfunctions.

This work pursues to elucidate the sensitivity of restriction endonucleases to the methylation of isolated CpG duplexes. Synthetic oligonucleotides carrying restriction endonuclease recognition sequences have been designed, and levels of their cleavage by corresponding endonuclease have been estimated. Model system has been devised to figure the extent of methylation in the specific sites of human genomic DNA. According to this system it was appointed the methylation level of selected amplicon.

**SANTRUMPOS**

A adeninas

AdoMet S-adenozil-L-metioninas

AdoHcy S-adenozil-L-homocisteinas

ATP adenozintrifosfatas

bp bazių pora

C citozinas

Con Conventional sistema

Ct ciklo numeris

DAPK su mirtimi susijusi baltymų kinazė

DNR dezoksiribonukleino rūgštis

DNMT DNR metiltransferazė

EDTA etilendiamintetraacto rūgštis

FD FastDigest sistema

G guaninas

gDNR žmogaus genominė DNR

GTP guanozintrifosfatas

kPGR kiekybinė polimerazės grandininė reakcija

M specifiškumo subvienetas

met metilinta

METazė metiltransferazė

Mod R-M sistemos modifikacijos subvienetas

Mrr *E. Coli* koduojama restrikcijos sistema

m4C 4-metilcitozinas

5mC 5-metilcitozinas

m6A 6-metiladeninas

PGR polimerazės grandininė reakcija

R restrikcijos subvienetas

REazės / RE restrikcijos endonukleazė

Res R-M sistemos restrikcijos subvienetas

R-M restrikcija – modifikacija

RNR ribonukleino rūgštis

S modifikacijos subvienetas

T timinas

TAD taikinio atpažinimo domenas

TE Tris/EDTA buferinis tirpalas

unmet nemetilinta

v vienetas

**ĮVADAS**

Restrikcijos endonukleazės pasižymi unikaliu sugebėjimu atpažinti specifines DNR grandinės sekas ir jas hidrolizuoti. Dėl griežto specifiškumo šie fermentai yra plačiai taikomi molekulinėje biologijoje ir biotechnologijoje. Jos yra nepakeičiami instrumentai fiziniam DNR kartiravimui, pirminės DNR struktūros nustatymui, atskirų genų išskyrimui, plazmidžių konstravimui, genų klonavimui. (Roberts et al., 2010). Ištyrus rastų restrikcijos fermentų savybes, atsivėrė jų atpažįstamų sekų, hidrolizės pozicijų, subvienetinės struktūros, poreikio kofaktoriams įvairovė. Restrikcijos endonukleazių tretinių struktūrų nustatymas ir DNR hidrolizės kinetiniai tyrimai atskleidė katalizuojamos reakcijos mechanizmų sudėtingumą. (Pingoud ir Jeltsch, 2001).

Šių produktų asortimentas ir jų įvairovė lemia jų taikymus epigenetikos srityje bei galimybes atlikti genomų tyrimus, metilintų sekų ir metilinimo apimties analizę genomo lygmenyje. Tiriant restrikcijos endonukleazių savybes ir jų specifiškumą, ypatingo dėmesio susilaukia jų sugebėjimas fragmentuoti metilintą DNR ir jautrumas įvairioms citozino modifikacijoms. Nemažos dalies restrikcijos fermentų atpažinimo sekos persidengia su žinduolių genominėje DNR esančiais CpG metilinimais bei augaluose sutinkamais CpG, CpHpG, CpHpH metilinimais. Jos gali skirtis ypatybe diferencijuotai hidrolizuoti DNR, kai atpažinimo sekoje vietoje citozino yra metilintas citozinas ar hidroksimetilcitozinas (Roberts et al., 2010).

DNR metilinimas yra vienas iš pagrindinių epigenetinės modifikacijos tipų. DNR metilinimo lygio pokyčiai sutinkami daugelio patologijų atveju, tiriant autoimunines, onkologines, neurodegeneracines ir psichosomatines ligas.

**Darbo tikslas:**

* išanalizuoti restrikcijos endonukleazių, atpažinimo sekoje turinčių keletą CG dupletų, jautrumą pavienių CpG metilinimui (5mC), ir pritaikyti ištirtų restrikcijos endonukleazių savybes žmogaus genominės DNR tyrimuose.

**Tikslui pasiekti iškelti šie uždaviniai:**

1. Parinkti tyrimo objektą – restrikcijos endonukleazes su nežinomu jautrumu DNR metilinimui;
2. Pritaikyti kontrolinę sistemą, pasirinktų REazių jautrumo CpG metilinimui analizuoti;
3. Įvertinti pasirinktų restrikcijos endonukleazių jautrumą pavienių CpG metilinimui;
4. Pritaikyti modelinę sistemą, leidžiančią analizuoti tikslinių DNR sričių metilinimo lygį kPGR metodu.
5. **LITERATŪROS APŽVALGA**

**1.1. Epigenetikos samprata**

Epigenetika – tai mokslas apie paveldimus ląstelės ar organizmo fenotipo pokyčius ir genomo funkcijas, nesusijusias su DNR sekoje koduojama informacija. Tradicinė genetika domisi išskirtinai DNR sekomis, o epigenetikos požiūriu genai nėra vieninteliai paveldimumo vienetai: genomo veiklą reguliuoja epigenetiniai veiksniai, susiję su paveldimais, tačiau potencialiai grįžtamais genų raiškos ir funkcijos pokyčiais (Callinan ir Feinberg, 2006).

Kiekvienoje žmogaus ląstelėje yra pilnas genų rinkinys, t.y. DNR, koduojanti apie 25 tūkstančius potencialių genų. Iš šio rinkinio skirtingose ląstelėse pasireiškia skirtingi genai (tik tam tikra jų dalis), o kiti – nuslopinami. Genų raišką ląstelėje reguliuoja tam tikri epigenetiniai mechanizmai, susiję su DNR sekų modifikavimu bei genų funkcijos pokyčiais ir apsprendžiantys ląstelių diferencijacijos procesus, t.y., kokioje ląstelėje kokie genai turi veikti (Barros ir Offenbacher, 2009).

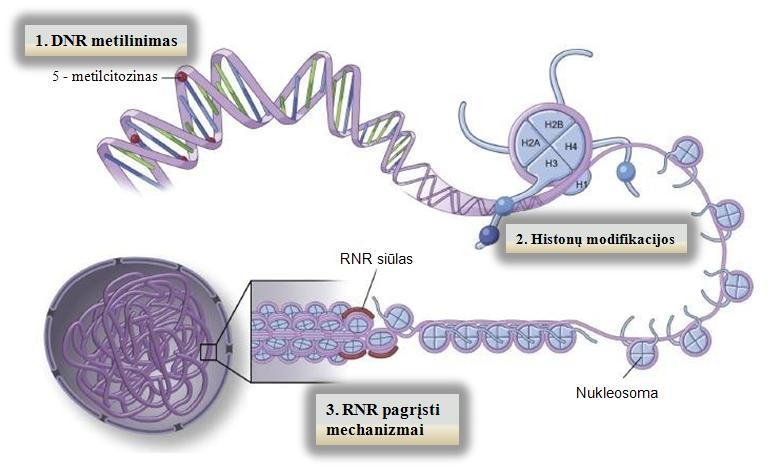
Epigenetiniai tyrimai yra labai svarbūs, analizuojant žmogaus vystymosi ir senėjimo procesus. Epigenetiniai žymenys reguliuoja ne tik genų raišką embriogenezės metu, bet ir genetinį imprintingą, X chromosomos inaktyvaciją, kamieninių ląstelių vystymąsi bei somatinių ląstelių diferencijacią (Matouk. et. al. 2012). Epigenetinių mechanizmų sutrikimai lemia klaidingą genetinės informacijos transformavimą į fenotipinius ar fiziologinius požymius, sukeldami patologines organizmo būsenas (1 lentelė).

**1 lentelė**. veiksniai ir procesai, galintys turėti įtaką epigenetikos mechanizmams bei ligos, susijusios su epigenetinių mechanizmų sutrikimais (Begin before birth, 2013 ).

|  |  |
| --- | --- |
| **Veiksniai ir procesai** | **Ligos** |
| * Embriono vystymasis, * Aplinka (chemikalai, radiacija ir t.t), * Vaistai, * Alkoholis, narkotinės medžiagos, * Senejimas, * Dietos; | * Onkologinės ligos, * Autoimuniniai susirgimai, * Psichikos sutrikimai, * Diabetas; |

* 1. **Epigenetinių modifikacijų charakteristikos**

Epigenetikos objektas susideda iš trijų tarpusavyje susijusių sričių: DNR metilinimo, posttransliacinių histonų modifikacijų ir RNR pagrįstų mechanizmų (1 pav.). Šios epigenetinės modifikacijos modeliuoja DNR struktūrą ir prieinamumą bei nustato transkripcijos reguliacijos lygį. Kitaip sakant, šie trys mechanizmai reguliuoja euchromatino ir heterochromatino formavimąsi. (Shu-Ching Yan et. al. 2010)



**1 pav**. 3 pagrindiniai epigenetinių modifikacijų, reguliojančių genų raišką, tipai (Shu-Ching Yan et. al. 2010).

Dažniausios epigenetinės modifikacijos – DNR metilinimas ir kovalentinės histoninių baltymų modifikacijos: metilinimas, acetilinimas, fosforilinimas, ubikvitinilinimas bei sumoilinimas (Murrell. et al., 2005; [Fischle](http://genesdev.cshlp.org/search?author1=Wolfgang+Fischle&sortspec=date&submit=Submit), 2008). 2 lentelėje nurodomi histoniniai baltymai su jiems charakteringomis modifikacijomis ir galimos DNR bazių modifikacijos. Viena iš plačiausiai ištirtų DNR modifikacijų yra citozino metilinimas, t.y. metilo grupės prijungimas prie citozino pirimidininio žiedo, susidarant metilintam citozinui, arba metilcitozinui. DNR metilinimo profilis apsprendžia, kokie genai bus aktyvūs, o kokie ne. Be to, metilinimas kinta priklausomai nuo ląstelę supančių sąlygų. Jeigu DNR metilinimo pobūdis bus pakeistas, pavyzdžiui, veikiant toksiška chemine medžiaga, tai paveldimi pokyčiai gali išlikti keliose kartose. DNR metilinimo lygio pokyčiai sutinkami daugelio patologijų atveju, tiriant autoimunines, onkologines, neurodegeneracines ir psichines ligas (Weinhold, 2006; [McCabe](http://clincancerres.aacrjournals.org/search?author1=Michael+T.+McCabe&sortspec=date&submit=Submit) et al., 2009).

**2 lentelė.** Cheminėmis reakcijomis pagrįstos epigenetinės modifikacijos (K. Sasnauskas, 2006 ir Roberts, 2011)

|  |  |
| --- | --- |
| **Histonų amino rūgščių modifikacijos** | |
| Amino rūgštis | Modifikacijos tipas |
| Lizinas | Metilinimas, acetilinimas, ubikvitinilinimas, sumoilinimas, ADP-ribozilinimas |
| Argininas | Metilinimas |
| Serinas | Fosforilinimas |
| Treoninas | Fosforilinimas |
| **Metilintų DNR bazių tipai** | |
| 5-metilcitozinas (5mC) | |
| 5-hidroksimetilcitozinas (h5mC) | |
| N4-metilcitozinas (m4C) | |
| N6-metiladeninas (m6A) | |
| 5-karboksilcitozinas (fC) | |
| 5-formilcitozinas (cC) | |

Ląstelės genomo funkcionalumas yra epigenetiškai kontroliuojamas chromatino (baltymų - histonų komplekso, ant kurių „susivynioja“ DNR) lygmenyje (Raulinaitis, 2007). Histonai, ypač H3/H4 N-galai ir H2A/H2B C–galai yra intensyviai modifikuojami. Geriausiai charakterizuotos histonų modifikacijos yra acetilinimas, metilinimas ir fosforilinimas (Sasnauskas 2006). Histoninių H3 ir H4 amino rūgščių acetilinimas dažniausiai siejamas su chromatinu aktyvioje būsenoje (euchromatinu). Tuo tarpu kita histonų modifikacija – metilinimas – daugelių atvėjų siejama su chromatino kondensacija (heterochromatinu) ir genų raiškos slopinimu (Reik et. al. 2003). Svarbu paminėti ir histoninių baltymų fosforilinimą. Kinazių fosforilinti substratai reguliuoja signalų perdavimą nuo ląstelės paviršiaus į branduolį (per citoplazmą); kitaip tariant ši modifikacija tarnauja kitų baltymų atpažinimui ir prisijungimui prie ląstelių paviršiaus receptorių. Šitaip reguliojama transkripcija, DNR reparacija, apoptozė, chomosomų kondensavimas. (Sasnauskas 2006; Mahadevan et. al. 1991).

Neseniai buvo įrodyta, kad RNR pagrįsti mechanizmai taip pat turi įtakos aukštesnės eilės chromatino struktūroms (Shu–Ching Yan et. al., 2010)*.* RNR indukuota inhibicija gali vykti įvairiuose genetinės informacijos nuskaitymo lygmenyse. Šis procesas yra vadinamas interferencija: dvigrandės RNR molekulės geba efektyviai slopinti genų raišką. Dvigrandė RNR skyla į 21 – 25 nukleotidų ilgio fragmentus – siRNR (small interferering RNA) (Elbashir et. al. 2001). Tokios RNR molekulės gali sudaryti kompleksus su baltymais ir taip sukelti matricinės RNR degradaciją, kitaip tariant siRNR blokuoja genų raišką posttranskripciniame lygmenyje. (Zenget. al. 2002*).*

RNR gali slopinti genų raišką transkripcijos metu ir sukelti nuo RNR priklausomą DNR metilinimą. Trumpų fragmentų, susidarančių iš dvigrandės RNR, struktūra yra labai panaši į genų promotorinių sekų struktūrą, todėl jie ir gali indukuoti šių sekų metilinimą, susijungdami su jomis ir taip suaktyvindami DNR metiltransferazes (Morris et. al. 2004).

* 1. **DNR metilinimas ir jo paplitimas**

Tiek prokariotinės, tiek eukariotinės ląstelės turi fermentus, modifikuojančius DNR. Bakterijų ląstelėse egzistuoja kamienui specifiška fermentinė restrikcijos–modifikacijos (R-M) sistema, kurią sudaro du fermentai: endodeoksiribonukleazė (restrikcijos endonukleazė, REazė), atpažįstanti ir fragmentuojanti specifines DNR sekas, bei DNR-metiltransferazė (MTazė), modifikuojanti tas pačias sekas, kad apsaugotų savo DNR nuo specifinės endonukleazės poveikio. Savos metiltransferazės atliekama modifikacija buvo pavadinta kanonine (angl. canonical site-specific) (McClelland et al., 1994).

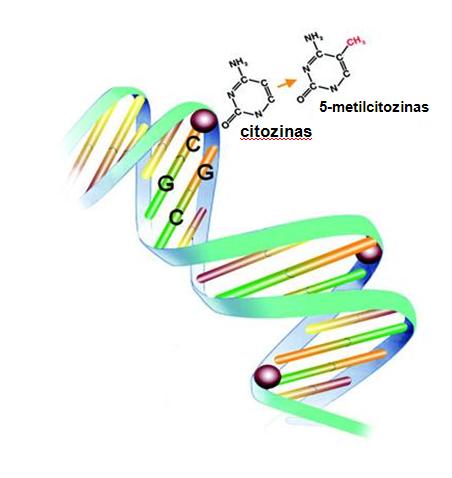
DNR modifikacija bakterijose vyksta metilinant citoziną arba adeniną. Dažniausiai sutinkami trys metilinimo tipai: 5-metilcitozinas (5mC), N4-metilcitozinas (m4C) ir N6-metiladeninas (m6A). Kartais gali būti sutinkami ir kiti nukleotidų bazių modifikacijos tipai, 5-hidroksimetilcitozinas (h5mC) ir 5-hidroksimetiluracilas (hm5U). *E. coli* bakterijos turi dvi specifines metiltransferazes, neturinčias giminingos restrikcijos endonukleazės: Dam ir Dcm. Viena iš jų (Dam) sekoje GATC metilina adeniną N6- padėtyje, kita (Dcm) sekoje CCWGG metilina vidinį citoziną C5-padėtyje.

Metilinimas įvyksta pirmosiomis minutėmis po DNR replikacijos. Dėl bakterijose funkcionuojančios restrikcijos-modifikacijos sistemos ląstelės sugeba identifikuoti savo genetinius duomenis ir atskirti juos nuo svetimų DNR, prasiskverbusių į ląstelę vienu ar kitu būdu. Taip bakterinės ląstelės apsaugo save nuo svetimų DNR molekulių patekimo (Bickle ir Kruger, 1993).

DNR metilinimas augalų genomuose gali vykti simetriškai citozinuose CpG ir CpHpG (H = A, T arba C), arba asimetriškai CpHpH sekoje. Augalų DNR randama santykinai daug metilinto citozino (5mC): nuo 5% iki 30% visų citozinų. Nustatyta, kad plačiai tyrinėjamo augalo *Arabidopsis thaliana* genome citozino metilinimo lygis CpG, CpHpG ir CpHpH nukleotidų sekose yra apie 24%, 6,7% ir 1,7% atitinkamai (Lee et al., 2010). Be to, ir kitų žiedinių augalų, pvz., ryžių, metilinimo profiliai labai panašūs, o metilinami beveik išimtinai nemetilinti CpG dinukleotidai.

DNR metilinimą augaluose atlieka įvairios metiltransferazės (Chan et al., 2005; Zhang 2008). MET1 metiltransferazė yra priskiriama palaikančių metilazių grupei ir metilina hemimetilintas dvigrandės DNR CpG sekas. Augaluose rastas unikalus fermentas, savo katalitiniame domene turintis domeną su chromo heteroatomu. Ši MTazių grupė vadinama chromo metiltransferazėmis – CMTs. CMTs metilina tiek *de novo*, tiek pusiau metilintas CpHpG sekas (Pavlopoulou ir Kossida, 2007).

Žinduolių DNR metilinimas dažniausiai vyksta simetriškai (abiejose grandinėse) citozinuose, esančiuose CpG dinukleotiduose (2 pav.). Somatinėse ląstelėse CpG dinukleotidų metilinimo lygis siekia apytiksliai nuo 70 iki 80 % (Baylin et al., 1998).



**2 pav.** DNR metilinimas vyksta prijungiant metilo grupę prie citozino molekulėje esančio atomo CpG dinukleotiduose ir susidarant metilintam citozinui, arba metilcitozinui (Barros ir Offenbacher, 2009).

Žinduolių DNR metilinimo pobūdis nustatomas dar embrioninio vystymosi stadijoje ir yra palaikomas ląstelėms dalijantis. Tai leidžia išlaikyti stabilius genomo epigenetinius žymenis (Tate ir Bird, 1993). Normalaus metilinimo profilio palaikymas žinduolių embriono vystymosi metu yra ypač svarbus procesas, kuris sukuria skirtingas tėvinių ir motininių genų raiškos pobūdžius – imprintingą (Bartolomei ir Tilghman, 1997), palaiko stabilų vienos iš X chromosomų nutildymą (Heard et al., 1997), slopina virusinės kilmės ir endogeninių retrotranspozonų transkripciją (Walsh et al*.*, 1999) bei palaiko audiniams specifinių genų raiškos profilį (Illingworth et al., 2008).

DNR metilinimas yra biologiškai reikšmingas procesas, pažeidus metiltransferazių katalitinę funkciją, pasireiškia įvairūs vystymosi sutrikimai (3 lentelė).

**3 lentelė.** Fermentų, užtikrinančių žinduolių ląstelių metilinimo procesus, biologinis vaidmuo.

|  |  |
| --- | --- |
| **Fermentas** | **Biologinis vaidmuo** |
| Dnmt1 | palaiko nustatytą metilinimo pobūdį po ląstelės dalijimosi ciklų. (Brown ir Robertson, 2007). Šio fermento funkcijų sutrikimas sukelia embriono mirtį, imprintintų genų raiškos pokyčius, ektopinę X-chromosomos inaktyvaciją, „išjungtų“ retrotranspozonų aktyvaciją (Li and Birg, 2007). |
| Dnmt2 | pasižymi silpnu katalitiniu aktyvumu. Neturi aiškios įtakos fenotipiniam pasireiškimui (Okano et al*.,* 1999).. |

**3 lentelė.** Fermentų, užtikrinančių žinduolių ląstelių metilinimo procesus, biologinis vaidmuo. (tęsinys)

|  |  |
| --- | --- |
| Dnmt3a  Dnmt3b | *de novo* metiltransferazės, sukuriančios pradinį genomo metilinimo pobūdį, svarbios imprintingui. Visiškos šių genų delecijos nesuderinamos su pelių ląstelių gyvybingumu (Okano et al*.,* 1999). |
| Dnmt3l | homologiška DNMT3 metiltransferazėms, tačiau nepasižymi katalitiniu aktyvumu. Skatina DNMT3 šeimos metiltransferazių aktyvumą (Suetake et al*.,* 2004) |

DNR metilinimas – tai poreplikacinis cheminis DNR molekulės modifikavimas. DNR metilinimo metu metilo grupė (-CH3) kovalentiškai prijungiama prie citozino anglies molekulės aromatiniame žiede (bazėje) 5-je pozicijoje, ir susidaro metilintas citozinas, arba metilcitozinas. DNR metilinimo reakcija katalizuojama vieno ar kelių fermentų – DNR metiltransferazių. Metilo grupių donoru ląstelėje yra S-adenozilmetioninas, kuris per metilinimo reakciją virsta S-adenozilhomocisteinu (3 pav.). Kadangi DNR seka tokiu būdu nesikeičia, metilinimas yra natūraliai epigenetinis reiškinys.

|  |
| --- |
| 50.png |

**3 pav***.* DNR metiltransferazės katalizuojama DNR metilinimo reakcija (Merck 1996)*.*

Pirmą kartą metilintas citozinas buvo paminėtas ir išskirtas dar 1948 m., tačiau ilgą laiką jo biologinė reikšmė buvo neaiški.

Citozino metilinimas yra dažna DNR modifikacija, aptinkama daugelyje eukariotinių organizmų, tarp jų žinduoliuose, augaluose ir grybuose. Nors DNR metilinimas yra plačiai paplitęs epigenetinio reguliavimo mechanizmas, genomai įvairiuose organizmuose metilinami skirtingai. Dažniausiai metilinami CpG, CpNpG, CpHpG DNR motyvai; paprastai tai vyksta DNR replikacijos metu (ląstelėms dalijantis, aktyviai augant augalui ar reprodukcijos metu). Geno promotoriaus regione metilintoje DNR metilo grupė neleidžia transkripcijos veiksniams susirišti su DNR bei padeda susirišti baltymams-slopikliams, tokiu būdu reguliuodama transkripcijos nutildymą (prie metilinto citozino jungiasi represoriniai baltymai MeCP1 ir MeCP2). Metilinimas ne tik slopina genų veiklą, bet ir nutildo transpozonus.

Svarbu paminėti, kad neseniai buvo atrasta nauja citozino epigenetinė modifikacija 5-hidroksimetilcitozinas (5hmC). 2009 metais. paskelbti tyrimų duomenys, kad citozinas gali veikti genų raišką ne tik būdamas metilintas, bet ir hidroksilintas. Tiriant pelių nervinių ląstelių metilinimą, buvo atrastas nukleotidas, kuris skyrėsi nuo 5-metilcitozino. Masės spektroskopija atskleidė, kad tai yra 5-hidroksimetilcitozinas. 5-hidroksimetilcitozinas neseniai buvo surastas kamieninių ląstelių ir žmogaus smegenų DNR: Purkinje ląstelėse jis sudarė 40 % viso metilinto citozino, o granuliniuose neuronuose – 10 %. (Kriaučionis et. al. 2009).

Kitais duomenimis, rastas genas, kuris koduoja fermentą, verčiantį 5-metilcitoziną į 5-hidroksimetilcitoziną (Tahiliani et al., 2009). Šios citozino modifikacijos biologinė prasmė bei pasiskirstymas genome nėra aiškūs. Yra pagrindo manyti, kad tai gali būti dar vienas epigenetinis žymuo, kaip ir 5-metilcitozinas, arba tarpinis 5mC demetilinimo produktas (Huang, 2010; Robertson et al., 2011).

**1.3.1. CpG salelės, jų metilinimas**

CpG salos – regionai, kuriuose šalia vienas kito esantis citozinas ir guaninas sudaro pagrindinį DNR sekos turinį. Raidė “p“ parodo, kad citozinas ir guaninas sujungti fosfodiesterine jungtimi. Šiems regionams būdingas panašus arba didesnis CpG dinukleotidų konservatyvumas, negu statistiškai tikimasi (6%), tuo tarpu likusi genomo dalis turi daug žemesnį CpG dažnį (1%). Šis reiškinys yra vadinamas CG supresija. Skirtingai nuo koduojančio geno regiono CpG vietų, promotoriuose CpG vietos CpG salelėse dažniausiai nemetilinamos (Fatemi et al., 2005).

Žinduolių ląstelėse tik 3–5 proc. viso citozino yra metilinti, tuo tarpu metilinama 70–80% CpG citozinų (Baylin et al., 1998). Dažnai šios salos yra susijusios su genų 5’ galo reguliacinėmis sritimis – promotoriais ir pirmu egzonu. Todėl manoma, kad nemetilintų CpG dinukleotidų skaičiaus išlaikymas reguliacinėse geno srityse yra svarbus jų raiškos procesui (Deaton ir Bird, 2011). sekoskaitos tyrimais nustatyta, kad žmogaus genome yra 29000 CpG salų. Jose yra daugiau kaip 19 milijonų CpG dinukleotidų.

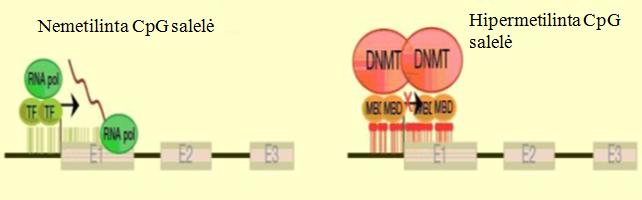
Pavienių CpG dinukleotidų metilinimas gali būti skirtingas skirtingose ląstelėse ir audiniuose. Metilinimas šiuo atveju nepadaro didelio poveikio chromatino struktūrai, kaip tai įvyksta CpG salų metilinimo metu, bet modifikuoja įvairių transkripcijos veiksnių prisijungimą ir specializuotose ląstelėse gali būti specifinis audiniams. Tokio metilinimo pavyzdys yra GK-interferono promotoriaus ir CREB 17 (transkripcijos veiksnio elementus sujungiantis baltymas) sekos surišimas beta-globino geno promotoriuje. Metilinimo vaidmuo pavieniuose CpG dinukleotiduose audinių specifinių genų atveju apsiriboja genais, kurių reguliacijoje dalyvauja metilinimui jautrūs transkripcijos veiksniai. (Walsh ir Bestor, 1999).

**1.3.2. DNR metilinimas kaip biologinis žymuo**

DNR metilinimas – ypač svarbus veiksnys reguliuojant genų raišką. Netipiškas DNR metilinimas promotorinėse CpG salų sekose ir su tuo susijęs klaidingas epigenetinių genų raiškos nutildymas yra laikomas reiškiniu, funkciškai ekvivalentišku fiziniam genu “išjungimui” (DNR mutacijų ar delecijų mechanizmui) (Ehab et. al., 2009).

Kaip jau buvo minėta, normalaus pobūdžio DNR metilinimas yra esminis reiškinys, palaikant genomo stabilumą. Tačiau esant tam tikriems veiksniams, epigenetinių mechanizmų eigoje gali atsirasti sutrikimai, kurie savo ruožtu gali lemti DNR sekų hiper-, ar hipo- metilinimus.

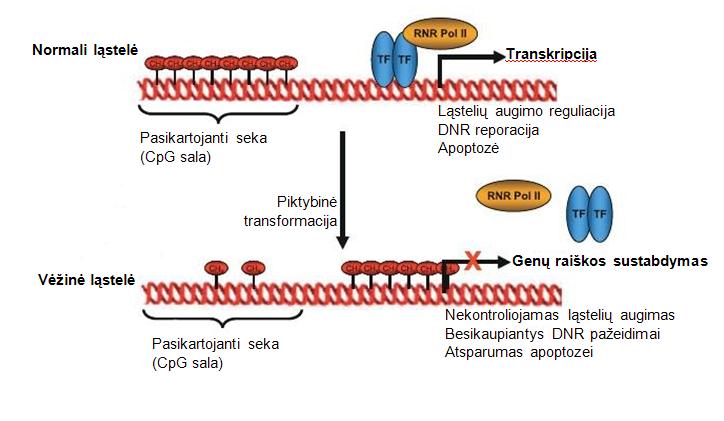
Dėl promotorinių sričių hipermetilinimo prarandama genų raiška (4 pav.). Onkogenai, ar kiti ligas sukeliantys genai, kurie nesant patologijai yra metilinti (neaktyvūs), klinikiniu požiūriu gali turėti priešvėžinį aktyvumą, jei įvyktų šių genų demetilinimas. Tačiau hipermetilinimo pasireiškimas koduojančiose ar ekspresiją reguliuojančiuose genuose (pavyzdžiui, *DAPK* gene) gali sukelti organizmo patologijas.



**4 pav.** DNR metilinimo būdai. DNR metilinimas gali įvykti įvairiuose genomo regionuose. Metilinimo būdo pakitimai lemia ląstelės patologijas. Normalus metilinimo scenarijus yra pateiktas dešinėje, o šio metilinimo scenarijaus pakitimai pateikiami kairėje. CpG salelių genų promotoriai normaliai yra nemetilinti. Netipiškas metilinimas lemia genų inaktyvaciją (Portela and Esteller, 2010).

DNR hipometilinimas – atvirkščiai nei hipermetilinimas, aktyvuoja genų raišką. Tai siejama su genominiu nestabilumu bei suintensyvėjusia onkogenų raiška (Ehab et. al., 2009, Duenas-Gonzalez et al., 2005, Cui et. al 2012).

Navikinės transformacijos eigoje prarandama ląstelių proliferacijos kontrolė, ima kauptis chromosominės aberacijos ir ląstelių dalijimasis tampa nevaldomas (5 pav.) (Lengauer ir Vogelstein, 1998).



**5 pav** Pasikartojančių DNR sekų ir tipiškų CpG salų vaizdas normalioje ir vėžinėje ląstelėje, kai intensyvus hipermetilinimas keičia molekulinę aplinką. (Ehab et. al., 2009)

DNR demetininimas hipometilinančiais agentais (pavyzdžiui, 5-azacitidinas, RG119, kurie slopina metiltransferazių katalitinę gebą (Brueckner et. al., 2005)) lemia genų ekspresijos reaktyvaciją, o klinikinių aspektu - priešvėžinį aktyvumą (Ehab et. al., 2009).

Dar vienas svarbus veiksnys, sukeliantis patologijas – tai pats 5-metilcitozinas. 5-metilcitozinas yra labai nestabili bazė ir stiprus mutacijų šaltinis, Jis lengvai deamininasi, virsdamas timinu. Pastarasis DNR sekose nėra atpažįstamas kaip mutacija ir išvengia reparacijos. Citozinas taip pat gali būti deaminintas, bet šios reakcijos produktas yra uracilas, normaliai neįeinantis į DNR sudetį, dėl to jis yra atpažįstamas ir reparuojamas (Ehab et. al., 2009).

**1.4. Restrikcijos** – **modifikacijos (R-M) sistemos**

**1.4.1. Atradimas, paplitimas ir funkcijos**

Vienu iš svarbiausių bakterijų ir jų bakteriofagų genetinių tyrimų rezultatų tapo restrikcijos – modifikacijos sistemų atradimas 1950 metų. pradžioje. Restrikcijos – modifikacijos reiškinį pirmieji pastebėjo ir aprašė S. E. Luria ir M. L. Human (1952 m.) ir G. Bertani ir J. J. Weigle (1953 m.). Tirdami λ bakteriofago gebėjimą daugintis įvairiuose *Escherichia coli* kamienuose, jie nustatė, kad fagas, padaugintas C kamiene, labai neefektyviai infekuodavo K-12 kamienus. Toks bakteriofagų vystymosi apribojimas buvo pavadintas restrikcija. Tačiau sugebėjęs pasidauginti *E. coli* K-12 ląstelėse fagas specifiškai modifikuojamas, todėl kito užkrėtimo metu be apribojimų infekuodavo tiek *E. coli* C, tiek K-12 kamienus. Pastarasis reiškinys pavadintas modifikacija (Heitman, 1993; Bickle ir Kruger, 1993; Murray, 2000). Kiek vėliau buvo išanalizuotos biocheminės stebėtų reiškinių priežastys – tai du viduląsteliniai fermentai, pasižymintys skirtingu aktyvumu: vienas jų atpažįsta ir hidrolizuoja nemodifikuotą DNR, kitas – apsprendžia specifines DNR modifikacijas, t. y. metilina tam tikras heterociklines bazes. Abu R-M sistemos komponentai atpažįsta tas pačias sekas, tačiau metilazės dėka ląstelėje DNR yra pastoviai specifiškai modifikuota ir, priešingai nei patekusi fago DNR, išvengia hidrolizės. Molekulės, pasižyminčios skirtingais fermentiniais aktyvumais gali egzistuoti kaip savarankiški baltymai – restrikcijos endonukleazė ir DNR metiltransferazė, arba R-M sistemą gali sudaryti daugiafunkcinis sudėtingos ketvirtinės struktūros baltymas.

Istoriškai taip susiklostė, kad beveik tuo pačiu metu *E. coli* ląstelėse buvo atrasti ir tokie restrikcijos fermentai, kurie fragmentavo tam tikrose sekose modifikuotą, t. y. metilintą arba hidroksimetilintą T lyginių bakteriofagų DNR. Šios ląstelės neturi modifikacijos fermento, todėl jų DNR nėra modifikuota ir išvengia sukarpymo. Sistemos buvo pavadintos modifikuotai DNR specifiškomis restrikcijos sistemomis (Bickle ir Kruger, 1993).

R-M sistemos beveik išimtinai yra paplytę tik prokariotiniuose mikroorganizmuose. Kelios jų yra koduojamos kai kurių bakterijų ir melsvadumblių *Chlorella* virusų genų (Roberts et al., 2010; Roberts, 2011). Dažnai tas pats bakterinis kamienas turi keletą, R-M sistemas. Paprastai viename kamiene rasti restrikcijos fermentai atpažįsta skirtingas DNR sekas, ir tik keliais atvejais užfiksuotas nepilnai persidengiantis specifiškumas (Roberts et al., 2010; Roberts, 2011).

R-M sistemos dažnai vadinamos bakterijų fermentinėmis apsaugos sistemomis. Iki šiol vyrauja nuomonė, kad viena pagrindinių restrikcijos-modifikacijos fermentų funkcijų – ląstelės apsauga nuo bakteriofaginės infekcijos. Tačiau R-M sistemos sugeba apriboti ir bet kokios svetimos DNR patekimą į ląstelę transformacijos, konjugacijos ar transdukcijos metu (Bickle ir Kruger, 1993). Vis daugiau informacijos atsiranda ir apie kitas R-M sistemų funkcijas – dalyvavimą DNR reparacijoje, rekombinacijoje.

Išsami informacija apie R-M sistemų fermentus, jų specifiškumą, jautrumą DNR metilinimams, izošizomerus, komercinius preparatus, sekoskaitos duomenis, kristalines struktūras, taip pat įvairūs statistiniai duomenys ir kt. pateikta duomenų bazėje REBASE – The Restriction Enzyme Database (Roberts et al., 2010; Roberts, 2011).

**1.4.2. R-M sistemų nomenklatūra**

Intensyvios R-M fermentų paieškos eigoje sukaupti duomenys vertė sukurti bendrą R-M sistemų nomenklatūrą. 1973 m. D. Nathans ir H.O. Smith pasiūlė R-M sistemų žymėjimo principus (Smith ir Nathans, 1973). R-M sistemos ir jų fermentai, pagal papildytas ir šiandien galiojančias taisykles (Roberts et al., 2003), sutrumpintai žymimi trimis lotyniškomis raidėmis – pirmąja mikroorganizmo genties pavadinimo raide ir dviem pirmosiomis rūšies pavadinimo raidėmis, pavyzdžiui.: *Escherichia coli* – Eco. Po sutrumpinto žymėjimo nurodomas kamieno pavadinimas ar numeris, pavyzdžiui.: Eco47, EcoB. Nechromosominiuose elementuose (plazmidėse, faguose) lokalizuotos R-M sistemos žymimos, nurodant šio elemento indeksą, pavyzdžiui., EcoR, EcoP. Jei tame pačiame kamiene yra kelios skirtingos R-M sistemos, jos numeruojamos romėniškais skaičiais, pavyzdžiui.: FnuDII, FnuDI, FnuDIII (esant vienai R-M sistemai, ji žymima skaičiumi I). Kai kelių skirtingų fermentų žymėjimai sutampa, antroji rūšies pavadinimo raidė pakeičiama kita, pvz., fermentai, išskirti iš įvairių *Bacillus stearothermophilus* kamienų, gali būti žymimi Bse, Bst, Bsa, arba įvedamas bakterinės kultūros muziejaus numeris, pvz., Bst1107I, Bst98I. Tos pačios sistemos restrikcijos ir modifikacijos fermentai turi tą patį pavadinimą, todėl atskiriami pagal indeksą, pavyzdžiui, R. FokI - restrikcijos endonukleazė, M. FokI – metiltransferazė. Atitinkamai REazę koduojantis genas žymimas fokIR, metilazę – fokIM (Roberts et al., 2003).

Naujo substratinio specifiškumo restrikcijos endonukleazės yra vadinamos prototipais. Atpažįstančios tą pačią DNR seką ir toje pačioje vietoje vykdančios fragmentaciją REazės vadinamos izošizomerais, hidrolizuojančios skirtingoje pozicijoje – neošizomerais. Vienodo specifiškumo, tą pačią heterociklinę bazę modifikuojančios metiltransferazės vadinamos izometimerais.

**1.4.3. R-M sistemų klasifikacija ir savybės**

Restrikcijos-modifikacijos sistemos, atsižvelgiant į atpažįstamos sekos struktūrinius požymius, fragmentacijos poziciją, kofaktorių poreikį bei subvienetinę struktūrą ir remiantis 2003 metais. R. J. Roberts ir bendraautorių apžvalgoje (Roberts et al., 2003) pateiktais pasiūlymais skirstomos į keturis tipus.

**1.4.3.1. I ir III tipų R-M sistemos**

I tipo R-M sistemų fermentai pasižymi sudėtingiausia struktūrine organizacija (**Dryden, 2001)**. Tai daugiafunkciniai oligomeriniai baltymai, sudaryti iš trijų subvienetų: HsdR (restrikcijos endonukleazės), HsdM (metiltransferazės) ir HsdS (sekos atpažinimo). Daugumos R-M fermentų subvienetų santykis yra S1:M2:R2. I tipo R-M fermentai gali fragmentuoti DNR tik tada, kai kompleksą sudaro visi trys subvienetai. Tuo tarpu metilinimo reakcijai pakanka tik M ir S subvienetų. Fermentų atpažinimo sekos asimetrinės dvipusės – pertrauktos. Jos sudarytos iš dviejų fiksuotų dalių (viena dalis – 3 nt, kita dalis – 4 ar 5 nt), atskirtų 6-8 bp nespecifiniu intarpu, pavyzdžiui.: EcoKI - 5'-AAC(N)6GTGC-3'. Fermentinio komplekso sąveikai su DNR būtinas AdoMet. Jei taikinys metilintas, ATP stimuliuoja fermento disociaciją nuo DNR, jei hemimetilintas – antros grandinės metilinimo reakciją. Kai seka nemetilinta, fermentas yra labiau linkęs fragmentuoti DNR. Endonukleazinės reakcijos metu fermentas intensyviai hidrolizuoja ATP, translokuoja DNR ir hidrolizuoja ją atsitiktinai, apytiksliai pusiaukelėje tarp dviejų atpažinimo sekų, 1000–7000 bp atstumu nuo sekos (Murray, 2000; Roberts et al., 2003).

III tipo R-M sistemos fermentus sudaro daugiafunkcinis baltymas, sudarytas iš dviejų subvienetų: Res (restrikcijos) ir Mod (modifikacijos). Mod subvienetas funkcionuoja nepriklausomai nuo Res subvieneto ir modifikuoja tik vieną atpažįstamos sekos grandinę. Res subvienetas fragmentuoja DNR, tačiau jis yra aktyvus, tik sąveikaudamas su Mod subvienetu (Bickle ir Kruger, 1993; Pingoud ir Jeltsch, 2001).

Fermentai atpažįsta asimetrinę nepertrauktą 5–6 bp seką ir skelia asimetriškai už 25–27 bp 3′ kryptimi nuo atpažinimo sekos. Restrikcijai būtini Mg2+ jonai, ATP. AdoMet yra stimuliuojantis reakciją kofaktorius. Be šių kofaktorių restrikciniam aktyvumui pasireikšti reikalingos mažiausiai dvi priešingai orientuotos atpažinimo sekos, tuo tarpu metilinimo reakcijai taikinių tarpusavio orientacija nėra svarbi. Esant terpėje visiems kofaktoriams, skėlimo ir metilinimo procesai konkuruoja, todėl stebima nepilna restrikcija (Bickle ir Kruger, 1993).

**1.4.3.2. II tipo R-M sistemos**

II tipo restrikcijos endonukleazės atpažįsta 4–8 bp ilgio sekas ir fragmentuoja DNR, susidarant 5’-fosfatui ir 3’-hidroksilo grupei bei pasižymi griežtu specifiškumu. Reakcijai kaip kofaktoriai reikalingi Mg2+ jonai, nors kai kurie fermentai pasižymi ir labiau neįprastomis savybėmis. Tokie fermentai vykdo reakcijas būdami monomerinės, dimerinės ar netgi tetramerinės struktūros, paprastai nepriklausomos nuo lydinčios kanoninės metiltransferazės (Roberts et al., 2003).

Didelė REazių dalis įvairiomis savybėmis skiriasi nuo įprastų II tipo ortodoksinių fermentų, kurie yra palindromines sekas atpažįstantys homodimerai ir hidrolizuoja DNR atpažinimo sekų ribose arba greta jos. Dalis restrikcijos endonukleazių atpažįsta asimetrines sekas ir dažniausiai hidrolizuoja DNR ne atpažinimo sekose, o fiksuotu atstumu nuo jų. Kai kuriais atvejais atstumas nuo taikinio iki skėlimo vietos gali priklausyti nuo taikinio apsupties. Kai kurios REazės skiriasi nuo įprastų fermentų ir oligomerine būsena, kofaktorių poreikiu, genų organizacija ar sąveikos su DNR ypatybėmis (Roberts et al., 2003; Pingoud ir Jeltsch, 2001).

Siekiant apjungti panašiomis savybėmis pasižyminčius fermentus į grupes, išskirta vienuolika II tipo restrikcijos endonukleazių potipių (4 lentelė). Pagal šią klasifikaciją, visos simetrines sekas atpažįstančios restrikcijos endonukleazės yra IIP, o asimetrines – IIA potipio, skeliančios nors vieną grandinę už atpažinimo sekos REazės priskiriamos IIS potipiui. Abiejose taikinio pusėse DNR hidrolizuojantys ir taip atpažinimo seką iškerpantys fermentai – IIB potipiui. Galinčios sąveikauti su dviem taikiniais vienu metu restrikcijos endonukleazės priskiriamos IIF arba IIE potipiui, priklausomai nuo to, ar abu taikiniai yra skeliami koordinuotai. REazės, kurių viena polipeptidinė grandinė pasižymi ir endonukleaziniu, ir modifikaciniu aktyvumu yra IIC, o inhibuojamos arba aktyvuojamos AdoMet − IIG tipo. Kadangi vieniems potipiams fermentai priskiriami pagal atpažinimo sekų, kitiems − pagal įvairias pačių fermentų savybes, ta pati REazė gali turėti kelių potipių savybių. Pavyzdžiui, FokI yra IIS ir IIA tipo, o visi IIG, IIB ir kai kurie IIH fermentai kartu yra ir IIC tipo (Roberts et al., 2003; Pingoud ir Jeltsch, 2001).

**4 lentelė.** II tipo restrikcijos endonukleazių klasifikacija ir savybės (Roberts et al., 2003; Pingoud ir Jeltsch, 2001).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Potipis** | **Savybės** | **Pavyzdžiai** | [**Atpažįstama**](http://rebase.neb.com/cgi-bin/azlist?md2+x2) **seka ir kirpimo pozicija** |
| A | Atpažįsta asimetrines sekas | FokI  AciI | GGATG (9/13)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| CCGC (-3/-1)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| B | Fragmentuoja DNR abiejose taikinio pusėse | BcgI | http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif(10/12) CGANNNNNNTGC (12/10)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| C | Simetrinis arba asimetrinis taikinys. R ir M funkcijos yra viename polipeptide | GsuI | CTGGAG (16/14) http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| HaeIV | http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif(7/13) GAYNNNNNRTC (14/9)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| BcgI | http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif(10/12) CGANNNNNNTGC (12/10)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| E | Sąveikauja su dviem taikiniais, iš kurių vienas yra kerpamas, o kitas – efektorius | EcoRII | http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gifCCWGG |
| NaeI | GCChttp://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gifGGC |
| F | Sąveikauja su dviem taikiniais, kurie abu koordinuotai kerpami | SfiI | GGCCNNNNhttp://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gifNGGCC |
| SgrAI | CRhttp://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gifCCGGYG |
| G | Simetrinis arba asimetrinis taikinys, reikalingas AdoMet | BsgI | GTGCAG (16/14)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| Eco57I | CTGAAG (16/14)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| H | Simetrinis arba asimetrinis taikinys, geno struktūra panaši į  I tipo sistemas | BcgI | http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif(10/12) CGANNNNNNTGC (12/10)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| M | Potipis IIP arba IIA, fragmentuoja tik  metilintą taikinį | DpnI | G m6Ahttp://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gifTC |
| P | Atpažįsta simetrines sekas | EcoRI | Ghttp://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gifAATTC |
| S | Asimetriškas taikinys ir kirpimo vieta | FokI | GGATG (9/13)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| MmeI | TCCRAC (20/18)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| T | Simetrinis arba asimetrinis. R genai yra heterodimerai. | Bpu10I | CCTNAGC (–5/–2)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| BslI | CCNNNNNhttp://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gifNNGG |

Įprastos II tipo restrikcijos endonukleazės, pavyzdžiui, EcoRI (6 pav.), DNR suriša griovyje tarp dviejų monomerų. Iš pradžių su DNR makromolekule jos susiriša nespecifiškai ir ieško atpažinimo seką. Radus taikinį, nespecifinis kompleksas virsta specifiniu, ir dėl konformacijos pokyčių yra aktyvuojami katalitiniai centrai. Susidarius specifiniam kompleksui, vienas įprastų restrikcijos endonukleazių monomeras atpažįsta pusę simetrinio taikinio ir fragmentuoja vieną DNR grandinę (Pingoud ir Jeltsch, 2001).

|  |
| --- |
|  |

**6 pav.** Restrikcijos endonukleazės EcoRI specifinio komplekso su DNR erdvinė struktūra. Monomerai nuspalvinti raudonai ir mėlynai, DNR – juodai (Sayle ir Milner–White, 1995).

REazės, kurios yra tetramerinės arba turi kelis DNR surišimo domenus, gali sąveikauti su dviem atpažinimo sekos kopijomis vienu metu. Tetramerinės restrikcijos endonukleazės, pavyzdžiui, IIF potipiui priklausanti NgoMIV (7 pav. (a)), yra homotetrameras, sudarytas iš dviejų pirminių dimerų, gebantis vienu metu surišti dvi DNR molekules, turinčias atpažinimo seką ir skelti fosfodiesterinius ryšius abiejuose taikiniuose (Deibert et al., 2000).

|  |
| --- |
|  |

**7 pav.** Restrikcijos endonukleazių NaeI ir NgoMIV specifinių kompleksų su DNR erdvinės struktūros. (a) NgoMIV specifinio komplekso [PDB:1fiu] erdvinė struktūra. Monomerai yra nuspalvinti raudonai, mėlynai, žaliai ir geltonai, DNR – juodai. (b) NaeI specifinio komplekso [PDB:1iaw] erdvinė struktūra. Katalitiniai domenai nuspalvinti mėlynai ir raudonai, efektoriniai – geltonai ir žaliai, DNR – juodai (Sayle ir Milner–White, 1995).

Nors IIE tipo fermentai taip pat sąveikauja su dviem taikiniais, jie skiriasi nuo tetramerinių restrikcijos endonukleazių tuo, kad IIE fermentų atveju tik vienas taikinys yra fragmentuojamas, o kitas atlieka aktyvatoriaus vaidmenį (Roberts et al., 2010). Pavyzdžiui, taip su DNR sąveikauja NaeI (7 pav. (b)), turinti du tą pačią seką atpažįstančius domenus, iš kurių tik vienas gali hidrolizuoti DNR (Huai et al., 2001).

IIA/IIS tipo restrikcijos endonukleazės negali sąveikauti su DNR taip pat, kaip aukščiau aprašytos restrikcijos endonukleazės, nes sunkiai tikėtina, kad vienodi subvienetai galėtų atpažinti po pusę asimetrinės sekos. Parodyta, kad dauguma charakterizuotų asimetrines sekas atpažįstančių restrikcijos endonukleazių tirpale yra monomerinės (Bath et al., 2002). Be to, mutagenezės metu iš kai kurių IIS tipo restrikcijos endonukleazių gali būti gaunami tik vieną DNR grandinę fragmentuojantys fermentai. Manoma, kad dalis IIS tipo fermentų turi du aktyvius centrus ir, nors yra monomerinės, gali hidrolizuoti abi DNR grandines (Zhu et al., 2004).

**1.4.3.3. II M tipo restrikcijos endonukleazės**

Pastaraisiais metais nemažai pokyčių pastebima REBASE duomenų bazėje (Roberts R.J. ) IIM restrikcijos endonukleazių tipo grupėje. Šiai grupei priklauso restrikcijos fermentai, kurie specifiškai atpažįsta modifikuotą (metilintą) seką ir skelia DNR fiksuotoje pozicijoje. Šių restrikcijos endonukleazių, kaip ir kitų II-ojo tipo REazių, aktyvumui yra reikalingas tik Mg2+. Iki šios dienos identifikuoti 25 šios grupės atstovai, 11 iš jų priskirti prototipams. Pirmoji atrasta ir geriausiai charakterizuota yra DpnI prototipinė restrikcijos endonukleazė, išgryninta iš *Diplococcus* *pneumoniae* kamieno. Ji atpažįsta 6-metiladeniną esantį taikinyje 5'-Gm6A↓TC-3', kaip kofaktorius DNR hidrolizei reikalingi Mg2+ jonai ([Lacks](http://rebase.neb.com/cgi-bin/authget?Lacks) ir [Greenberg](http://rebase.neb.com/cgi-bin/authget?Greenberg), 1975). Tokią pat nemetilintą seką 5'-GATC-3' atpažįsta ir modifikuoja dam metiltransferazė.

Pati didžiausia IIM tipo fermentų grupė atpažįsta ir hidrolizuoja metilintus taikinius, turinčius sekoje 5-metilcitoziną. Remiantis REBASE duomenų bazėje pateikta informacija 5 lentelėje pateikti restrikcijos fermentai, atpažįstantys ir skeliantys metilintą citoziną turinčias DNR sekas.

**5 lentelė**. IIM tipo restrikcijos endonukleazės, specifinės metilintą citoziną turintiems taikiniams (Roberts, 2011;)

|  |  |
| --- | --- |
| **Restrikcijos endonukleazė** | [**Atpažįstama**](http://rebase.neb.com/cgi-bin/azlist?md2+x2) **seka ir kirpimo pozicija** |
| [AoxI](http://rebase.neb.com/rebase/enz/AoxI.html) | http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gifGG5mCC |
| [AspBHI](http://rebase.neb.com/rebase/enz/AspBHI.html) | m5YSCNS(8/12)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| [BisI](http://rebase.neb.com/rebase/enz/BisI.html) | G5mChttp://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gifNGC |
| [BlsI](http://rebase.neb.com/rebase/enz/BlsI.html) (neoizošizomeras) | G5mCNhttp://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gifGC |
| [GluI](http://rebase.neb.com/rebase/enz/GluI.html) (neoizošizomeras) | G5mChttp://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gifNG5mC |
| [FspEI](http://rebase.neb.com/rebase/enz/FspEI.html) | C5mC(12/16)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| [GlaI](http://rebase.neb.com/rebase/enz/GlaI.html) | G5mChttp://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gifG5mC |
| [LpnPI](http://rebase.neb.com/rebase/enz/LpnPI.html) | C5mCDG(10/14)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |

**5 lentelė**. IIM tipo restrikcijos endonukleazės, specifinės metilintą citoziną turintiems taikiniams (Roberts, 2011;.) (tęsinys)

|  |  |
| --- | --- |
| **Restrikcijos endonukleazė** | [**Atpažįstama**](http://rebase.neb.com/cgi-bin/azlist?md2+x2) **seka ir kirpimo pozicija** |
| [MspJI](http://rebase.neb.com/rebase/enz/MspJI.html) | 5mCNNR(9/13)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| [PcsI](http://rebase.neb.com/rebase/enz/PcsI.html) | W5mCGNNNNhttp://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gifNNN5mCGW |
| [SgeI](http://rebase.neb.com/rebase/enz/SgeI.html) | 5mCNNG(9/13)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |
| [SgrTI](http://rebase.neb.com/rebase/enz/SgrTI.html) | C5mCDS(10/14)http://rebase.neb.com/rebase/cutdown3.gif |

Y = C/ T; S =C/G; D = A/G/T; R = G/A; W = A/T, N = C/G/A/T.

Pirmieji atrasti fermentai BlsI, GluI ir BisI (Chmuzh et al., 2005) yra izošizomerai ir hidrolizuoja palindrominę seką 5'-GCNGC-3', kuri yra visiškai ar dalinai metilinta C5 bazės pozicijoje, atpažinimo sekos viduje (3 lentelė). Nustatyta, jog šių fermentų aktyvumas priklauso nuo metilinto citozino kiekio ir lokalizacijos atpažinimo taikinyje. REazė GlaI skelia seką 5'-GCGC-3' skirtingu efektyvumu, jeigu joje yra 2, 3 ar 4 5-metilcitozinai, priklausančiu nuo 5mC metilintų citozinų kiekio ir pozicijų, tačiau neskelia m4C metilintų citozinų sekų. DNR dupleksas su keturiais 5-metilcitozinais pasižymėjo didžiausiu fragmentavimo efektyvumo lygiu (kanoninis substratas), tuo tarpu taikiniai su trim metilintais citozinais suskelti 27–61%, su dviem citozinais – 26% efektyvumu (Tarasova et al., 2008). Be to, nustatytas GlaI specifiškumas kitoms citozino modifikacijoms: taikiniai, turintys 5-hidroksimetilcitoziną (5–hmC), hidrolizuojami, o po gliukozilinimo T4 fago β-gliukoziltransferase (BGT). Gautų 5–gliukozilhidroksimetilcitoziną turinčių taikinių hidrolizė blokuojama.

Unikaliu specifiškumu pasižymi restrikcijos endonukleazė SgeI, kuri atpažįsta sekoje tik metilintus DNR taikinius, turinčius 5-metilcitoziną vienoje ar abiejose DNR grandinėse. Fragmentavimo pozicijos yra 9 bp už atpažinimo sekos toje pačioje grandinėje ir 13 bp priešingoje grandinėje. Tokie taikiniai gali persidengti su CpG metilintomis sekomis. Fermento aktyvumas testuotas tik naudojant DNR, išskirtą iš *E. coli* dcm+ kamieno. Fermento kiekis, reikalingas pilnai metilintos DNR fragmentacijai, priklauso nuo SgeI atpažįstamų taikinių skaičiaus, o DNR skilimo produkų perteklius aktyvuoja nespecifinį DNR fragmentaciją.

2010 metais publikuoti duomenys (Zheng et al., 2010) apie dar vieną nuo metilinimo priklausomų, į Mrr panašių restrikcijos endonukleazių grupę. Analizuojant REBASE duomenų bazėje sukauptus bakterinių kamienų genomus bioinformatiniais nukleotidų sekų homologijų paieškos ir analizės metodais, atrasta >100 biochemiškai necharakterizuotų *E. coli* Mrr homologų. Tipišką R-M sistemą, identifikuotą *Mycobacterium* sp. JLS genome, sudaro hipotetinė 5‘-metilcitozininė DNR metiltransferazė, endonukleazė ir *vsr* genas. Išgryninto rekombinantinio baltymo aktyvumas *in vitro* buvo nustatytas, naudojant skirtingus metilintus ir nemetilintus substratus. MspJI pasižymi tipišku endonukleaziniu aktyvumu, priklausomu nuo DNR metilinimo, t. y. fermentas hidrolizuoja metilintą *dcm+* plazmidinę DNR, tuo tarpu DNR be *dcm* modifikacijos nehidrolizuojama. MspJI savybės detaliau ištirtos genominės DNR hidrolizės tyrimuose, pasirinkus substratais žmogaus (HeLa ląstelių) ir augalų (Arabidopsis) DNR, turinčias modifikuotus citozinus CpG ir CpHpG sekose, bei mielių DNR. MspJI aktyvumas buvo analizuojamas ir kitų DNR modifikacijų atžvilgiu, naudojant fago T4 genominės DNR variantus, turinčius 5hmC (T4 gt DNR) ar gliukozil-5-hidroksimetilcitoziną (T4 wt DNR). Nustatyta, kad MspJI atpažįsta ir hidrolizuoja 5‘- metilcitoziną ir 5‘– hidroksimetilcitoziną turinčius taikinius, taip pat yra gliukozil-5-hidroksimetilcitozinui jautrus fermentas – fragmentacija blokuojama gliukozilintuose taikiniuose, turinčiuose glu-5hmC.

Eksperimentiškai nustatyta, kad MspJI atpažįsta 5‘– 5mCNNR–3‘ (R – G/A) seką ir skelia DNR 3‘ – kryptimi fiksuotu N12/N16 atstumu nuo metilinto citozino arba N9/N13 atstumu nuo atpažįstamos sekos ribų abiejose grandinėse (Zheng et al., 2010) (6 lentelė).

Keletas kitų artimų MspJI homologų, FspEI ir LpnPI (6 lentelė), pasižymi analogišku nuo modifikacijų priklausomu endonukleaziniu aktyvumu (Roberts, 2011).

Išskirtinė visų šių fermentų savybė yra tai, kad visiškai metilintuose substratuose jie atpažįsta kiekvieną hemimetilintą taikinį individualiai ir iš abiejų pusių iškerpa mažą DNR fragmentą, centrinėje dalyje turintį modifikuotą taikinį, pavyzdžiui, ~ 32 bp apie simetriškai metilintus CG taikinius ir ~ 31 bp apie metilintus CNG taikinius. Iškirpti fragmentai gali būti sekvenuoti ir nustatyta modifikacijų lokalizacija genominėje DNR; tokiu būdu MspJI šeimos fermentai, pasižymintys skirtingais atpažįstamos sekos specifiškumais ir hidrolizės savybėmis gali būti panaudoti skirtingų organizmų epigenomų tyrimams.

Eukariotiniuose organizmuose paplitusi epigenetinės modifikacijos dažniausiai yra metilinimas, aptinkamas CpG ir CHG taikiniuose. Tokių modifikuotų taikinių pogrupius specifiškai atpažįsta aptariami fermentai.

**6 lentelė.** MspJI šeimos fermentų specifiškumas (Roberts, 2011).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| [**Atpažinimo**](http://rebase.neb.com/cgi-bin/azlist?md2+x2) **seka ir skilimo pozicija** | **CpG taikiniai** | **CHG taikiniai** |
| **MspJI** | | |
| 5‘...5mCNNR(N) 9↓...3’  3‘... GNNY(N) 13↑...5‘ | 5‘...YN**5mC G**NR...3’  3‘...RN **G5mC**NY...5‘ | 5‘...Y**5mC**H **G**R...3’  3‘...R **G**D**5mC**Y...5‘ |
| **FspEI** | | |
| 5‘...C5mC (N) 12↓...3’  3‘...G G (N) 16↑...5‘ | 5‘...C**5mC G**G...3’  3‘...G **G5mC**C...5‘ | 5‘...C**5mC**H **G**G...3’  3‘...G **G**D**5mC**C...5‘ |
| **LpnPI** | | |
| 5‘...C5mCDG(N) 10↓...3’  3‘...G GHC(N) 14↑...5‘ | 5‘...C**5mC G**G...3’  3‘...G **G5mC**C...5‘ | 5‘...C**5mC**D **G**G...3’  3‘...G **G**H**5mC**C...5‘ |

Tokių nuo metilinimo priklausomų REazių buvimas leidžia ląstelei-šeimininkei apsisaugoti nuo bakteriofagų, kurių genomuose DNR modifikuota ir 5‘–citozinas pilnai metilintas (Raleigh ir Wilson, 1986).

**1.4.3.4. IV tipo R-M sistemos**

*Escherichia coli* K12 kamiene iki šiol identifikuotos keturios restrikcijos sistemos. Pirmoji iš jų yra I tipo restrikcijos sistema EcoKI, atpažįstanti nemodifikuotą DNR. Kitų trijų – EcoKMcrA, EcoKMcrBC ir EcoKMrr (**Dryden, 2001;** Panne et al., 2001) – substratas yra modifikuota, t. y. metilinta, hidroksimetilinta ar gliukozil-hidroksimetilinta DNR (Roberts et al., 2003; Panne et al., 2001). Geriausiai ištirta yra EcoKMcrBC, atpažįstanti ir fragmentuojanti seką, turinčią metilintą citoziną vienoje ar abiejose grandinėse:

5‘...PumC(N)40-3000PumC...3‘

kur m – 5-metilcitozinas, 5 – hidroksimetilcitozinas arba N4-metilcitozinas (Kruger et al., 1995; Panne et al., 1998; Roberts et al., 2003). EcoKMcrBC nehidrolizuoja nemodifikuotos DNR. McrBC atpažįstami DNR taikiniai sudaryti iš dviejų (G/A)mC sekų, atskirtų iki 3 bp dydžio intarpo, bet optimaliausias atstumas fragmentavimui yra 55–103 bp (Sutherland ir Coe, 1992). Skilimo pozicijos išsidėstę viduje tarp dviejų taikinio dalių, apytiksliai 30 bp atstumu nuo metilintos bazės.

IV tipo sistemas koduoja vienas ar du genai. Sistemos aktyvumui reikalingi Mg2+ jonai ir GTP (EcoKMcrBC atveju) (Sutherland ir Coe, 1992). EcoKMcrBC sudaryta iš trijų polipeptidų (McrBL – 53 kDa, McrC – 39kDa ir McrBS –34 kDa), kuriuos koduoja du genai (mcrB ir mcrC) (**Dryden, 2001;** Panne et al., 1998; Panne et al., 2001). McrBL (atsakingas už REazės specifiškumą) ir McrBS  (moduliuoja McrBC aktyvumą prisijungiant McrC), kai yra Mg2+, GTP, GDP ar GTP-γ-S, suformuoja galintį dimerizuotis heptamerą. Prie šio oligomero jungiasi jį stabilizuojantis McrC. Restrikcijai būtini du tokie oligomerai, iš kurių kiekvienas atpažįsta vieną modifikuotą citoziną (Panne et al., 2001).

DNR fragmentacijai reikalingos dvi atpažinimo sekos 40 – 3000 bp atstumu viena nuo kitos (Roberts et al., 2003; Panne et al., 2001). Nuo GTP hidrolizės priklausoma DNR translokacija vyksta tol, kol atitinkamai priartėja kitas oligomeras ar kita kliūtis (Panne et al., 2001). DNR fragmentuojama 30 bp atstumu nuo vienos iš atpažinimo sekų, nepriklausomai koks atstumas yra tarp modifikuotų 5mC (Roberts et al., 2003; Panne et al., 2001). Vienam dvigrandės DNR skilimui reikia daugelio GTP hidrolizės energijos. Mutantinė EcoKMcrBC su sutrikusiu GTPaziniu aktyvumu hidrolizuodavo tik tokią DNR, kurioje metilinti citozinai yra išsidėstę nedideliu atstumu vienas nuo kito (Panne et al., 2001).

**1.4.3.5. Restrikcijos endonukleazių jautrumas metilinimui**

Atliekant restrikcijos endonukleazių paiešką mikroorganizmų kamienuose, pagrindinis dėmesys buvo skiriamas naujų prototipų, atpažįstančių unikalias sekas, aptikimui. Nustatyti skirtingai tą pačią nukleotidų seką hidrolizuojantys fermentai – neoizošizomerai. Jų jautrumas metilinimui buvo vertintas fermento savybių tyrimo etape. Išaugus metilinimui jautrių fermentų svarbai ir REazių porų, pasižyminčių skirtingu jautrumu metilinimui, poreikiui, svarbu papildomai išanalizuoti ir įvertinti turimą REBASE (Roberts, 2011) ir kitose REazių duomenų bazėse sukauptą informaciją.

Nukleotido metilinimas atpažįstamoje sekoje gali turėti įtakos tiriamos DNR hidrolizavimui. Tais atvejais, kai restrikcijos endonukleazės atpažįstamas taikinys persidengia su metilinta seka, galimi trys hidrolizės variantai: jokio efekto, dalina hidrolizė (kai restrikcija yra lėtinama), ir visiškas blokavimas.

Duomenys apie restrikcijos endonukleazės jautrumą modifikuotoms nukleotidų bazėms atpažįstamoje sekoje yra labai svarbūs, nes nuo metilintos bazės prigimties ir jos padėties sekoje priklauso DNR hidrolizavimo galimybė. Daugelio plačiai naudojamų plazmidinių DNR gamybai yra naudojami *E. coli* kamienai. *E. coli* kamienuose yra dvi specifinės metiltransferazės: Dam ir Dcm. λ fago ir įvairių plazmidžių DNR turi Dcm ir Dam metilinimą.

Naudojant REazes, kurių atpažinimo sekos visai arba dalinai persidengia su Dam arba Dcm sekomis, svarbu atsižvelgti į metilinimo poveikį. Restrikcijos endonukleazė MboI, atpažįstanti seką GATC, nehidrolizuoja Dam metilintos DNR, nes jautri sekoje esančio adenino metilinimui. MboI izošizomeras Bsp143I fragmentuoja tą pačią DNR be apribojimų. Vadinasi, ši restrikcijos endonukleazė nėra jautri adenino metilinimui. *E. coli* K12- ar B kamienai papildomai turi I tipo R-M sistemas EcoKI ar EcoBI. Šių sistemų modifikacijos fermentai metilina adeniną jų atpažinimo sekose.

Žinduolių ir augalų genominėje DNR aptinkamas metilintas citozinas CpNG ir CpG (CpHpH ir CpHpG) sekose. Skirtingas izošizomerų porų jautrumas įvairioms modifikacijoms gali būti naudojamas modifikuotų DNR bazių aptikimui ir kiekio įvertinimui. Pavyzdžiui, esant dinukleotidui CpG fermentas HpaII atpažįstamoje sekoje CCGG, DNR hidrolizė yra visiškai blokuojama. Skirtingai nuo HpaII, jos izošizomeras MspI pilnai hidrolizuoja tokią DNR, nes jis nėra jautrus CG metilinimui (Waalwijk ir Flavell, 1978).

7–oje lentelėje pateikti duomenys apie kitas nustatytas izošizomerų poras ir jų galimybes fragmentuoti modifikuotą DNR (Thermo Scientific. 2013).

**7 lentelė.** Izošizomerai ir neoizošizomerai, pasižymintys skirtingu jautrumu metilintam taikiniui (Thermo Scientific, 2013).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Restrikcijos endonukleazė** | **Atpažinimo seka, skilimo pozicija (^)** | **Metilinimo efektai** |
| Acc65I | G^GTACC | Persidengiantis Dcm arba CpG metilinimas gali turėti įtakos DNR hidrolizei |
| KpnI | GGTAC^C | Dcm arba CpG metilinimas įtakos DNR karpymui neturi |
| ApaI | GGGCC^C | Persidengiantis Dcm arba CpG metilinimas gali turėti įtakos DNR karpymui |
| Bsp120I | G^GGCCC | Dcm arba CpG metilinimas DNR karpymą blokuoja |
| Bsp143I | ^GATC | Dam metilinimas įtakos DNR karpymui neturi. CpG metilinimas karpymą blokuoja |
| MboI | ^GATC | Dam metilinimas DNR karpymą blokuoja |
| DpnI | GA^TC | Kerpa tik Dam metilintą DNR |
| BspOI | GCTAG^C | CpG metilinimas įtakos DNR karpymui neturi |
| NheI | G^CTAGC | Persidengiantis CpG metilinimas gali turėti įtakos DNR karpymui |
| Cfr9I | C^CCGGG | CpG metilinimas gali turėti įtakos DNR karpymui |
| SmaI | CCC^GGG | CpG metilinimas karpymą blokuoja |
| Csp6I | G^TAC | CpG metilinimas įtakos DNR karpymui neturi |
| RsaI | GT^AC | Persidengiantis CpG metilinimas gali turėti įtakos DNR karpymui |
| Ecl136II | GAG^CTC | Persidengiantis CpG metilinimas gali turėti įtakos DNR karpymui |
| SacI | GAGCT^C | CpG metilinimas įtakos DNR karpymui neturi |
| EcoRII | ^CC(A/T)GG | Dam metilinimas DNR karpymą blokuoja |
| MvaI | CC^ (A/T)GG | Dcm metilinimas įtakos DNR karpymui neturi |
| HpaII | C^CGG | CpG metilinimas karpymą blokuoja |
| MspI | C^CGG | CpG metilinimas įtakos DNR karpymui neturi |

Naujų izošizomerų ir neoizošizomerų porų, pasižyminčių skirtingu jautrumu metilintam CpG taikiniui, suradimas būtų vertingas epigenetiniams genomo tyrimams, pralėstų metilintų sekų tyrimo galimybes. Metilinimo analizėje dažniausiai naudojama HpaII REazė turi tik 8 % visų žmogaus genome esančių CpG dupletų sekų. NotI, kita plačiai taikoma restrikcijos endonukleazė (atpažinimo seka GCGGCCGC) persidengia tik su 0,03 % sekų žmogaus DNR (Ammerpohl et al., 2009). Netgi plačios apimties genomo tyrimų metodai optimaliomis sąlygomis analizuoja tik nedidelę genomo dalį.

**1.5. Pagrindiniai kiekybinės PGR veikimo principai**

Kiekybinis PGR yra metodas, kuris kiekvieno ciklo metu matuoja fluorescencijos emisijos pokytis, kuri yra tiesiog proporcinga susintetintos DNR kiekiui. Lyginant mėginio Ct su standarto arba kito mėginio Ct, tiksliai apskaičiuojamas absoliutinis arba santykinis DNR kiekis pradiniame mėginyje (Higuchi et. al., 1993, Kubista et.al., 2006).

Fluorescencijos emisijos pokytis DNR padauginimo metu gali būti matuojamas keliais būdais. Vienas ši jų – naudojant fluorescencinius junginius, kurie gali įsiterpia į dvigrandę DNR molekulę mažajame griovyje. Dažniausiai naudojami asimetriniai cianino dažai, tokie kaip SYBR Green I, BOXTO ir EvaGreen. Tirpale fluorescensijos emisija būna silpna, tačiau ši emisija labai suintensyvėja, kai dažas įsiterpia į dvigrandę DNR. Fluorescencijos signalo intensyvumas priklauso ne tik nuo dauginamų produktų koncentracijos, bet ir nuo produkto dydžio: didesnis dauginamas – intensyvesnė fluorescensijos signalo emisija. (Kubista et. al., 2006).

Kiekybinis PGR dažniausiai naudojama šiems tikslams:

1. Genų raiškos nustatymui: vyksta/nevyksta tiriamų genų raiška;
2. Genų raiškos kiekybiniam įvertinimui: kaip kinta genų raiška veikiant įvairiems veiksniams, kaip skiriasi įvairių genų raiška tarpusavyje;
3. DNR kopijų skaičiaus nustatymui: esant mikrobiologiniam užterštumui, diagnostikoje –virusinės DNR ar RNR kiekio nustatymui;
4. Mutacijų nustatymui;
5. Vieno nukleotido skirtumų nustatymui (Higuchi et. al., 1993, Kubista et.al., 2006).
   1. **Pagrindiniai radioaktivumo matavimo principai**

Radioaktyvi spinduliuotė gali sužadinti tam tikrus fluoroforus. Fluoroforai spinduliuoja šviesos fotonus, kurie yra nustatomi fotodaugintuvų pagalba. Šis fluorescencijos reiškinys vadinamas scintiliacija, o radioaktyvumo nustatymo metodas – scintiliacinis skaičiavimas. Fotodaugintuvu nustatomo elektrinio signalo dydis priklauso nuo radioaktyvios spinduliuotės energijos.

Radioaktyvias medžiagas patalpinus į skystą scintiliatorių, spinduliuojamos dalelės sąveikauja su tirpiklio molekulėmis. Kuo didesnė spinduliuotės energija, tuo daugiau tirpiklio molekulių sužadina dalelė. Tirpiklis fluorescuoja labai trumpų bangos ilgių šviesą, kurios fotodaugintuvas nenustato. Pirminiu fluoroforu naudojamas 2,5–difeniloksazolas (PPO), kurio fluorescencija taip pat nėra efektyviai nustatoma. Antrinio fluoroforo - 1,4-bis(5-feniloksazol–2-il) –benzeno (POPOP) pagalba radioaktyvaus skilimo energijos inicijuotas fluorescencijos energijos perdavimas baigiasi ~ 470 nm bangos ilgio šviesos emisija, kuri nustatoma fotodaugintuvo pagalba.

Radioaktyvumo skaičiuotuvas suskaičiuoja scintiliacinio mišinio spinduliuojamą šviesą, kuri yra proporcinga kiuvetėje esančiam radioaktyvumui. Kuo didesnė radioaktyvios spinduliuotės energija, tuo didesnis šviesos intensyvumas yra išmatuojamas.

Scintiliacinis skaičiuoklis skaičiuoja impulsus per minutę: imp./min, arba cpm. Jei skaičiavimo efektyvumas būtų 100%, tai 60 cpm atitiktų 1Bq – 1 skilimą per sekundę, kas atitinka 60 skilimų per minutę (Wilson. et. al. 2000).

**2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI**

**2.1. Aparatūra ir darbo priemonės**

Žymėtų oligonukleotidų elektroforezei: vertikali elektroforezės sistema Universal Mutation Detection System (BioRad), elektros srovės šaltiniai: E835 (Consort), E865 (Consort).

Rezultatų vizualizavimui: gelių džiovinimas GEL DRYER (VWR), eksponavimo ekranas Storage Phosphor Screen (GE Healthcare), videografavimo sistema Typhoon TRIO (GE Healthcare).

Radioaktyvumo nustatymui: scintiliacinis skaičiuoklis, LS6500 (BECKMAN), vienkartinės kiuvetės radioaktyvumo matavimui (Roth), apsauginiai ekranai (Roth).

kPGR mėginių ruošimui: vertikalaus vienkrypčio srauto švaraus oro spinta “Kojair” (HERASAFE KS).

kPGR metodo vykdymui: kPGR termocikleris Step One Plus (Applied Biosystems),

Centrifugavimui: centrifugos “Beckman J2-21”, “Combi-spin”, “Fuge-Vortex”, stalo centrifuga MiniSpin (Eppendorf).

# Programos ir duomenų bazės: Vector NTI AdvanceTM 10, StepOne PlusTM Software v2.1, TotalLab TL100 v2006b, TotalLabQuant, BLAST ncbi (Basic Local Alignment Search Tool), REBASE (The Restriction Enzyme Database), Ensembl genome browser.

Kita įranga: „Zeba Spin Desalting“ kolonėlės (7K MWCO), termostatai “GrantY22”, “Binder”, maišyklės (ABE Scientifica) ir AGE (pbi international), svarstyklės “Kern 770” ir “Kern GJ”, purtyklė “Bioblock Scientific Top Mix 94323”, automatinės pipetės „Pipetman“ (Gilson), stiklai geliams (BioRad), reguliuojamo tūrio automatinių pipečių antgaliai (Roth), matavimo cilindrai, šaldantys stoveliai, mėgintuvėliai (SARSTEDT).

**2.2. Medžiagos**

**2.2.1. Reagentai**

Darbo metu naudoti reagentai nurodomi 8 lentelėje:

**8 lentelė**. Reagentai ir jų gamintojai

|  |  |
| --- | --- |
| **Gamintojas** | **Reagentai** |
| Thermo Fisher Scientific | Vanduo be nukleazių, Milli Q vanduo, 0.5M EDTA, Acrylamide 40% Solution, Agarozė TopVision™, DNR pavyzdžių dažas 2X RNA loading Day, DNR ilgio standartas GeneRuler Express DNR Ladder, dNTP mix (10 mM), Žmogaus genominė DNR, 1,4-dithio-DL-threitol (DTT), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), metilinta žmogaus genominė DNR |

**8 lentelė.** Reagentai ir jų gamintojai (tęsinys)

|  |  |
| --- | --- |
| **Gamintojas** | **Reagentai** |
| Roth | Rotiszint® eco plus scintiliacinis mišinys |
| Sigma | UREA (karbamidas) |
| PerkinElmer | Adenosine 5‘ - Triphosphate [γ-33P] - ATP |
| AppliChem | N,N,N,N - Tetramethylethylenediamine (TEMED) |
| Amresco | Ammonium persulfate (APS), Ethidium bromide (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide) |

**2.2.2. Buferiniai tirpalai**

Tyrimometu naudoti buferiniai tirpalai (Thermo Fisher Scientific, Vilniaus padalinys):

* DNR fosforilinimo (žymėjimo) reakcijai: 10x reaction buffer A for T4 Polynucleotide Kinase
* Elektroforezei: 50x TAE, 10x TBE
* DNR skiedimui: TE, pH 7,6
* Restrikcijos endonukleazių reakcijos buferiniai tirpalai: 10x FastDigest Buffer, 10x Buffer Tango, 10x Buffer B, 10x Buffer G, 10x Buffer O, 10x Buffer R

**2.2.3. Rinkiniai**

kPGR atlikti naudotas Luminaris Color HiGreen Hi ROX qPGR Master Mix rinkinys (rinkinio komponentai: 2X Luminaris Master Mix, Yellow DNA Sample Buffer, Water, nuclease-free) (Thermo Fisher Scientific, Vilniaus padalinys).

**2.2.4. Fermentai**

Moksliniame tyrime naudoti šie fermentai (Thermo Fisher Scientific, Vilniaus padalinys): T4 Polynucleotide Kinase, restrikcijos endonukleazės: MspI, AjiI, Bsh1285I, Bsp68I, Cfr10I, Cfr42I, CpoI, CseI, Esp3I, Eco52I, FspAI, Hin1I, MauBI, MreI, PauI, PdiI, SfaAI, SgrDI, SgsI, SsiI, SspDI, TauI.

**2.2.5. Oligonukleotidai ir pradmenys**

**9 lentelė**. Atsižvelgiant į restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekas ir dominančio metilinto citozino vietą jose, buvo parinkti oligonukleotidai (Metabion) (CG=5mC)

|  |  |
| --- | --- |
| **Oligonukleotido pavadinimas** | **Oligonukleotido seka su metilinimo pozicija**  **(5‘ 3‘)** |
| JS\_1Amet | TTCCGCGGCGCGCCTCGTCGACGTTCGCGACGCGTCTT |
| JS\_1Bmet | AAGGCGCCGCGCGGAGCAGCTGCAAGCGCTGCGCAGAA |
| JS\_2Amet | TTGGCGCCGGCGTACGTCTCGGCCGCGTCGCGCGCGTT |
| JS\_2Bmet | AACCGCGGCCGCATGCAGAGCCGGCGCAGCGCGCGCAA |
| JS\_3Amet | TTCGCGCGCGATCGCCGGCGGACCGTGGCGCCTT |
| JS\_3Bmet | AAGCGCGCGCTAGCGGCCGCCTGGCACCGCGGAA |
| JS\_4Amet | TTGCGATCGCGTGTGCGCACGTCACGTCGACGTT |
| JS\_4Bmet | AACGCTAGCGCACACGCGTGCAGTGCAGCTGCAA |
| JS\_5Amet | TGACGCGTTCCGCGTTCACGTCG |
| JS\_5Bmet | ACTGCGCAAGGCGCAAGTGCAG |

Kontrolenei reakcijai atlikti buvo naudoti atitinkami oligonukleotidai tik be modifikacijų (JS\_1Anonmet, JS\_1Bnonmet, JS\_2Anonmet, JS\_2Bnonmet, JS\_3Anonmet, JS\_3Bnonmet JS\_4Anonmet, JS\_4Bnonmet, JS\_5Anonmet, JS\_1Bnonmet).

**10 lentelė.** **.** Pradmenys, naudoti kPGR reakcijai 109 bp fragmento padauginimui (Metabion)

|  |  |
| --- | --- |
| **Pradmens pavadinimas** | **Seka** |
| *DAPK*\_F | GAAACTTGGCTTCGGGGAGAA |
| *DAPK*\_R | AGCAGTTCGCTCCAGATCCTC |

**2.3. Tyrimo metodai**

**2.3.1. Oligonukleotidų paruošimas**

Liofilizuoti oligonukleotidai tirpinami ½ nurodyto tūrio vandeniu be nukleazių ir brinkinami kambario temperatūroje 2 valandas, supurtant kas 15–20 minučių. Tuomet įpilamas likęs reikalingas vandens be nukleazių kiekis iki galutinės 100 μM oligonukleotido koncentracijos ir gerai išmaišoma.

**2.3.2. 5‘– galo viengrandžio oligonukleoido fosforilinimas ir radioaktyvumo nustatymas**

Oligonukleotidų 5‘–galo žymėjimas vyksta T4 polinukleotidkinazei (T4 PNK) katalizuojant γ-fosfato pernešimą nuo ATP ant oligonukleotido 5'-OH grupės. Reakcijos mišinio sudėtis nurodyta 11 lentelėje. Reakcija, atliekama 30 min. 37°C temperatūroje. Į reakcijos mišinį pridėjus 1 μl 0.5 M EDTA ir pakaitinus 10 min. 75°C temperatūroje, T4 PNK denatūruojama ir fermentinė reakcija sustabdoma. Žymėti fragmentai gelfiltruojami „Zeba Spin Desalting“ kolonėlėmis (7K MWCO), kurios pašalina nesureagavusį žymėtą [γ-33P] – ATP iš reakcijos mišinio.

**11 lentelė**. Oligonukleotido žymėjimo reakcijos mišinio sudėtis

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr.** | **Komponentai** | **Pradinė koncentracija** | **Galutinė koncentracija** | **40 μl reikia:** |
| 1. | T4 PNK buferis A | 10x | 1x | 4 μl |
| 2. | oligonukleotidas | 100 μM | 2,5 μM | 1 μl |
| 3. | T4 PNK | 10 v/μl | 0,5 v/μl | 2 μl |
| 4. | γ-33P-ATP | 370 MBq/ml | 37 MBq/m | 4 μl |
| 5. | vanduo | - | - | 29 μl |

**2.3.3. Radioaktyvumo matavimas**

Viengrandžių žymėtų oligonukleotidų radioaktyvumas nustatomas taip: į vienkartines kiuvetes supilamas scintiliacinis mišinys, sumaišomas su 1 μl žymėto fragmento. Radioaktyvumas nustatomas įstačius kiuvetes su paruoštu analizuojamu mišiniu į scintiliacinį skaičiuoklį.

**2.3.4. Oligonukleotidų sulydymo reakcijos**

Žymėti oligonukleotidai sulydomi su komplementariomis grandinėmis santykiu 1:1,5. 10 minučių inkubuojama 95°C temperatūroje ir paliekama lėtai atvėsti kambario temperatūroje.

**2.3.4. Oligonukleotidų hidrolizė**

Visi žymėti oligonukleotidai veikiami atitinkama REaze. Oligonukleotidai, veikiami Conventional sistemos fermentais inkubuoti 16 valandų, veikiami su FastDigest – 10 min. 37 ºC temperatūroje. 12 lentelėje nurodomi hidrolizės reakcijų komponentai ir jų kiekiai.

**12 lentelė.** Fragmentavimo reakcijai reikalingi komponentai ir kiekiai

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nr.** | **Komponentai** | **Pradinė koncentracija** | **Galutinė koncentracija** | **30 μl reikia:** |
| 1. | Oligonukleotidas | 100µM | 1.67 µM | 0,5 μl |
| 2. | Buferinis tirpalas | 10 x | 1x | 3 μl |
| 3. | REazė | 5-10 v/μl | 0.167-0.33 v/μl | 1 μl |
| 5. | vanduo | - | - | 25,5 μl |

**2.3.5. Mėginių paruošimas vertikaliai DNR elektroforezei**

Pasibaigus fermentinei karpymo restrikcijos endonukleazių fermentais reakcijai, mėginiai sumaišomi su 2x Loading Day RNR dažu ir kaitinami 5 minučių 95oC temperatūroje.

**2.3.6. 15% akrilamido su bisakrilamidu ir karbamidu tirpalo paruošimas**

420 g karbamido suberiama į 500 ml 40% akrilamido/bisakrilamido tirpalą, įpilama 100 ml 10x TBE buferio, šildant ištirpinama ir pripilama miliQ vandens iki 1000 ml.

**2.3.7. 15% PAA (poliakrilamidinio) gelio paruošimas**

Į 30 ml paruoštą 15% AA//BAA tirpalą įpilama 200 μl 10% amonio persulfato tirpalo, 20μl TEMED reagento ir gerai išmaišoma. Tirpalas supilamas į gelio formavimo vietą tarp specialiai paruoštų stiklų. Įstatomos duobučių formavimo „šukos“. Gelis paliekamas stingti ̴40 min (iki pilnos gelio polimerizacijos).

**2.3.8. Vertikali DNR elektroforezė**

Sustingęs 0,75 mm gelis su stiklais perkeliamas į elektroforezės aparatą „Dcode“ (Bio-Rad), užpildytą 1x TBE buferiu. Ištraukiamos šukos ir gerai praplaunami šulinėliai. Vykdoma parengiamoji elektroforezė 600V, kol aparate esančių buferinių tirpalų temperatūra pasiekia 50°C (~ 45 min.). Dar kartą kruopščiai praplovus šulinėlius, į gelį įpilama po 5 μl paruošto mėginio. Elektroforezė vykdoma ~ 4 valandas, esant 300 V įtampai.

**2.3.9. Rezultatų vizualizavimas**

Po elektroforezės gelis 10 min. fiksuojamas 10% acto rūgštyje, tuomet 5 minučių plaunamas tekančiu vandeniu ir džiovinamas apie 1 valandą gelių džiovintuvu esant 80°C temperatūrai. Išdžiovintas gelis uždengiamas fosforescentiniu ekranu „Imaging Plate“ (FujiFilm) ir laikomas 10–16 val. Eksponuotas ekranas nuskaitomas „Typhoon TRIO“ (GE Healthcare) skaitytuvu. Duomenys analizuojami *TotalLabQuant* programine įranga.

**2.3.10. Žmogaus genominės DNR restrikcija**

gDNR ir metilinta gDNR veikiami SfaAI (10 v/μl,) ir MspI fermentais. Reakcija paliekama inkubuotis 16 valandų 37 ºC temperatūroje..

**13 lentelė** Restrikcijos reakcijos komponentai ir tūriai.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Reakcijos mišinio Komponentai** | **Metilintos gDNR reakcijos mišinys** | **gDNR reakcijos mišinys** |
| **metilinta gDNR (0,1 mg/ml)** | 10 μl | - |
| **gDNR (0,1 μg/ μl)** | --- | 5 μl |
| **10x Tango buferinis tirpalas** | 2 μl | 2 μl |
| **SfaAI (10 v/μl, Conventional)** | 1 μl | 1 μl |
| **Vanduo be nukleazių** | 7 μl | 12 μl |

**2.3.11. kPGR sistemos parinkimas**

Tikslinio geno dalies padauginimui suformuoti pradmenys skirti padauginti SfaAI fermento atpažinimo seką, esančią *DAPK* geno DNR sekoje. Pradmenų parinkimas vykdomas šiais etapais:

* *DAPK* geno sekos įvedimas i Vector NTI programą;
* SfaAI fermento atpažinimo sekos paieška;
* Pradmenų parinkimas BLAST programa;
* Pradmenų tinkamumo analizavimas Vector NTI programą.

**2.3.12. Mėginių paruošimas kalibracinės tiesės gavimui**

Kalibracinės tiesės gavimui naudota metilinta žmogaus gDNR (0.1 mg/ml), kuri skiedžiama TE buferiniu tirpalu (pH 7.6) 50x, 500x, 5000x ir 50000 kartų iki galutinių 2 ng/μl, 0,2 ng/μl, 0,02 ng/μl, 0,002 ng/μl, 0,0002 ng/μl koncentracijų. Į skirtingus mišinius (RM1, RM2, RM3, RM4) įpilama po 5 µl kiekvieno skiedimo DNR. Reakcijos mišinių sudėtis nurodyta 14 lentelėje.

**14 lentelė**. Reakcijos mišinių paruošimas

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Komponentai** | **RM1, komponentų tūris 1 mėginiui, μl** | **RM 2, komponentų tūris 1 mėginiui, μl** | **RM 3, komponentų tūris 1 mėginiui, μl** | **RM 4, komponentų tūris 1 mėginiui, μl** | **Galutinė koncentracija** |
| Luminaris Master Mix (2x) | 10 | 10 | 10 | 10 | 1x |
| 10 μM *DAPK*\_F pradmuo | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,3 μM |
| 10 μM *DAPK*\_R pradmuo | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,3 μM |
| metilinta gDNR 2 ng/μl | 5 | --- | --- | --- | 0,5 ng/µl |
| metilinta gDNR 0,2 ng/μl | --- | 5 | -- | -- | 0,05 ng/µl |
| metilinta gDNR 0.02 ng/μl | --- | -- | 5 | -- | 0,005 ng/µl |
| metilinta gDNR 0,002 ng/μl | -- | -- | -- | 5 | 0,0005 ng/µl |
| Vanduo be nukleazių | 3,8 | 3,8 | 3,8 | 3,8 | --- |

**2.3.13. Tikslinio geno dalies padauginimas kPGR metodu**

Tikslinis fragmentas padauginamas nuo gDNR ir metilintos gDNR kiekybiniu PGR metodu. Reakcijos mišinių RM 5 (reakcijos mišinys su gDNR), RM 6 (reakcijos mišinys su metilinta gDNR) komponentai nurodyti 15 lentelėje.

**15 lentelė.** Komponentai, ir tūriai, reikalingi kPGR.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Komponentai** | **RM5 Komponentų tūris 1 mėginiui, μl** | **RM 6 Komponentų tūris 1 mėginiui, μl** | **Galutinė koncentracija** |
| Luminaris Master Mix (2x) | 10 | 10 | 1x |
| 10 μM *DAPK*\_F pradmuo | 0,6 | 0,6 | 0,3 μM |
| 10 μM *DAPK*\_R pradmuo | 0,6 | 0,6 | 0,3 μM |
| metilinta gDNR (0,2 ng/ μl po sukarpymo) | --- | 5 | 0,05 ng/µl |
| gDNR (0.2 ng/ μl po sukarpymo ir skiedimo\*) | 5 | --- | 0,05 ng/µl |
| Vanduo be nukleazių | 3,8 | 3,8 | --- |

\*DNR skiesta su TE buferiniu tirpalu

Tikslinio produkto padauginimui surenkama termociklerio programa:

|  |  |
| --- | --- |
| 50 ˚C – 2 min.  95 ˚C – 10 min.  95 ˚C – 15 sek.  72 ˚C – 7 min. | 40 ciklų |

**3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS**

**3.1.Kontrolinė sistema restrikciniam įvertinimui**

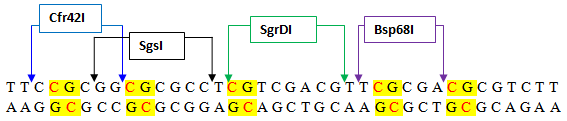
Remiantis duomenų analize buvo pasirinktos 21 restrikcijos endonukleazės su nežinomu jautrumu DNR metilinimui. Jautrumui nustatyti buvo parinkti sintetiniai modifikuoti ir nemodifikuoti (kontroliniai) oligonukleotidai.

kPGR sistemai suformuoti parinktas *DAPK* genas. Šis genas yra geriausiai ištyrinėtas ir svarbus onkogenetiniuose procesuose. Yra žinoma, kad šis genas gali būti metilinamas iki 100 %

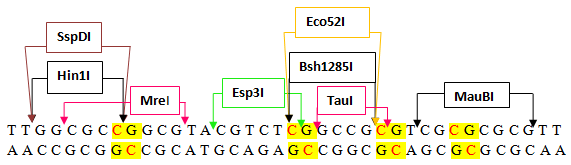
**3.1.1. Kontrolinių oligonukleotidų formavimas**

Pasirinktų restrikcijos endonukleazių jautrumo tyrimui buvo suformuoti dvigrandžiai (po sulydymo su komplementaria seka) oligonukleotidai (CG=5mC):

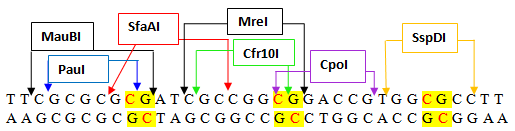
* Oligonukleotidas JS\_1met (JS\_1Amet + JS\_1Bmet):



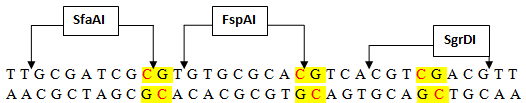
* Oligonukleotidas JS\_2met (JS\_2Amet + JS\_2Bmet):



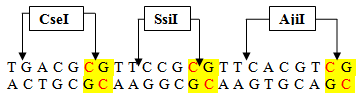
* Oligonukleotidas JS\_3met (JS\_3Amet + JS\_3Bmet)



* Oligonukleotidas JS\_4met (JS\_4Amet + JS\_4Bmet):



* Oligonukleotidas JS\_5met (JS\_5Amet + JS\_5Bmet):



Kontrolei buvo naudoti analogiški oligonukleotidai, be modifikacijų (JS\_1unmet, JS\_2unmet, JS\_3unmet, JS\_4unmet, JS\_5unmet).

**3.1.2. Restrikcijos endonukleazių jautrumo metilinimui nustatymas**

Restrikcijos endonukleazių jautrumas metilinimui nustatomas naudojant radioaktyviu fosforu žymėtus sintetinius oligonukleotidus su žinoma metilinto citozino pozicija sekoje. Rezultatų vizualizavimas buvo atliekamas 15% poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis. Oligonukleotidų didžių kontrolė – oligonukleotidas, nepaveiktas REaze.

JS\_1met ir JS\_1unmet oligonukleotidai buvo veikiami šiomis REazėmis: Cfr42I, PauI, SgsI, SgrI,Bsp68I (8 pav.).

|  |  |
| --- | --- |
| **1 2 3 4 5 6 7 8 9 10**  pp.png |  |

**8 pav.** JS\_1met ir JS\_1unmet oligonukleotidu po restrikcijos elektroforetinis vaizdas.

Mėginių įnešimo į gelį tvarka:

1. JS\_1met (kontrolė)
2. JS\_1unmet (kontrolė)
3. JS\_1met + Cfr42I
4. JS\_1unm + Cfr42I
5. JS\_1met + SgsI
6. JS\_1unmet + SgsI
7. JS\_1met + SgrDI
8. JS\_1 unmet + SgrDI
9. JS\_1met + Bsp68I
10. JS\_1unmet + Bsp68I

Iš gautų rezultatų yra vertinamas REazių jautrumas metilinimui: Cfr42I fermentas yra jautrus metilinimui. Paveikus metilintą oligonukleotidą šiuo fermentu, hidrolizė nevyksta tuo tarpu, nemetilintas oligonukleotidas yra hidrolizuojamas. SgsI, SgrDI ir Bsp68I fermentai metilinimui dalinai jautrūs. Metilintas oligonukleotidas nepilnai suskaldytas – stebima dalinė hidrolizė.

JS\_2met ir JS\_2unmet oligonukleotidai buvo veikiami šiomis REazėmis: SspDI, Hin1I, MreI (Con, FD sistemose), Esp3I, Eco52I, Bsh1285I, TauI, MauBI (Con, FD sistemose) (9 pav.).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22**  222222.png |  | |
| **9 pav.** JS\_2met ir JS\_2unmet oligonukleotidu po restrikcijos elektroforetinis vaizdas. | |

Mėginių įnešimo į gelį tvarka:

|  |  |
| --- | --- |
| 1. JS\_2met (kontrolė) 2. JS\_2met + SspDI 3. JS\_2unmet + SspDI 4. JS\_2met + Hin1I 5. JS\_2unmet + Hin1I 6. JS\_2met + MreI 7. JS\_2unmet + MreI 8. JS\_2met + MreI (FD sistemoje) 9. JS\_2unmet + MreI (FD sistemoje) 10. JS\_2met + Esp3I 11. JS\_2unmet + Esp3I | 1. JS\_2met + Eco52I 2. JS\_2unmet + Eco52I 3. JS\_2met + Bsh1285I 4. JS\_2unmet + Bsh1285I 5. JS\_2met +TauI 6. JS\_2unmet +TauI 7. JS\_2met +MauBI 8. JS\_2unmet + MauBI 9. JS\_2met +MauBI (FD sistemoje) 10. JS\_2unmet + MauBI (FD sistemoje) 11. JS\_2unmet (kontrolė) |

Iš gautų rezultatų yra vertinamas REazių jautrumas metilinimui: SspDI ir TauI fermentai metilinimui nejautrūs – hidrolizė įvyko kaip su metilintu, taip ir su nemetilintu oligonukleotidu. Hin1I, MreI, Eco52I ir MauBI Reazės metilinto oligonukleotido nefragmentuoja – metilinimui jautrūs fermentai. Fermentai Esp3I ir Bsh1285I pasižymi nepilnu jautrumu metilinimui.

JS\_2met ir JS\_2unmet oligonukleotidai buvo veikiami šiomis REazėmis: MauBI, PauI, SfaAI, PdiI, MreI, Cfr10I, CpoI ir SSpDI (10 pav.).

|  |  |
| --- | --- |
| **1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18**  2013_02_28_3oligas_gimp1.gel.jpeg  **10 pav.** JS\_3met ir JS\_3unmet oligonukleotidu po restrikcijos elektroforetinis vaizdas. |  |

Mėginių įnešimo į gelį tvarka:

|  |  |
| --- | --- |
| 1. JS\_3met (kontrolė) 2. JS\_3unmet (kontrolė) 3. JS\_3met + MauBI 4. JS\_3unmet + MauBI 5. JS\_3met + PauI 6. JS\_3unmet + PauI 7. JS\_3met + SfaAI 8. JS\_3unmet + SfaAI 9. JS\_3met + PdiI | 1. JS\_3unmet + PdiI 2. JS\_3met + MreI 3. JS\_3unmet + Mre 4. JS\_3met + Cfr10I 5. JS\_3unmet + Cfr10I 6. JS\_3met +CpoI 7. JS\_3unmet +CpoI 8. JS\_3met +SspDI 9. JS\_3unmet + SspDI |

Iš gautų rezultatų yra vertinamas REazių jautrumas metilinimui: MauBI, PauI, SfaAI, MreI ir SspDI Reazės metilinto oligonukleotido nefragmentuoja – metilinimui jautrūs fermentai. PdiI fermentas metilinimui nejautrus – metilintas ir nemetilintas oligonukleotidai buvo sufragmentuoti. Nepilnu jautrumu metilinimui pasižymi CpoI REazė.

JS\_4met ir JS\_4unmet oligonukleotidai buvo veikiami šiomis REazėmis: SfaAI, FspAI, ir SgrDI (11 pav.).

|  |  |
| --- | --- |
| **1 2 3 4 5 6 7 8 9 10**  **2013_02_19_2.gel.jpeg** |  |

**11 pav.** JS\_4met ir JS\_4unmet oligonukleotidu po restrikcijos elektroforetinis vaizdas.

Mėginių įnešimo į gelį tvarka:

1. JS\_4met (kontrolė)
2. JS\_4unmet (kontrolė)
3. JS\_4met + SfaAI
4. JS\_4unmet + SfaAI
5. JS\_4met + FspAI
6. JS\_4unmet + FspAI
7. JS\_4met + FspAI (FD sistemoje)
8. JS\_4unmet + FspAI (FD sistemoje)
9. JS\_4met + SgrDI
10. JS\_4unmet + SgrDI

Iš gautų rezultatų yra vertinamas REazių jautrumas metilinimui: SfaAI ir FspAI fermentai metilinimui nejautrūs – metilintas ir nemetilintas oligonukleotidai buvo sufragmentuoti. SgrDI restriktazė pasižymi nepilnu jautrumu metilinimui.

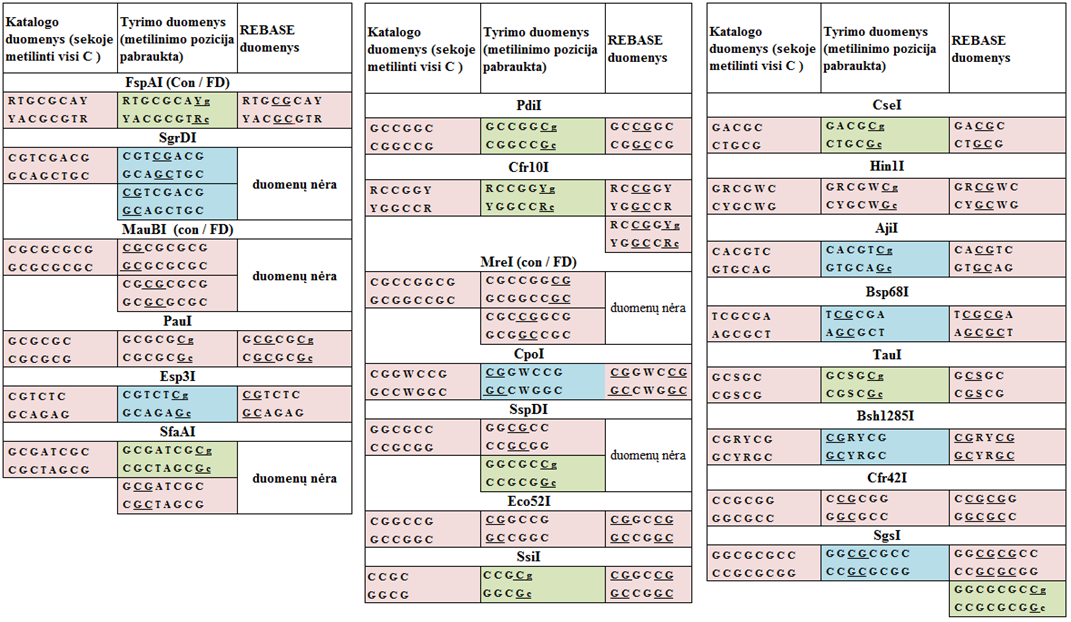
JS\_5met ir JS\_5unmet oligonukleotidai buvo veikiami šiomis REazėmis: CseI, SsiI ir AjiI (12 pav.).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **1 2 3 4 5 6 7 8**  **5oligas_II.tiff** |  | |
| **12 pav.** JS\_5met ir JS\_5unmet oligonukleotidu po restrikcijos elektroforetinis vaizdas. | |  |

Mėginių įnešimo į gelį tvarka:

1. JS\_5met (kontrolė)
2. JS\_5unmet (kontrolė)
3. JS\_5met + CseI
4. JS\_5unmet + CseI
5. JS\_5met + SsiI
6. JS\_5unmet + SsiI
7. JS\_5met + AjiI
8. JS\_5unmet + AjiI

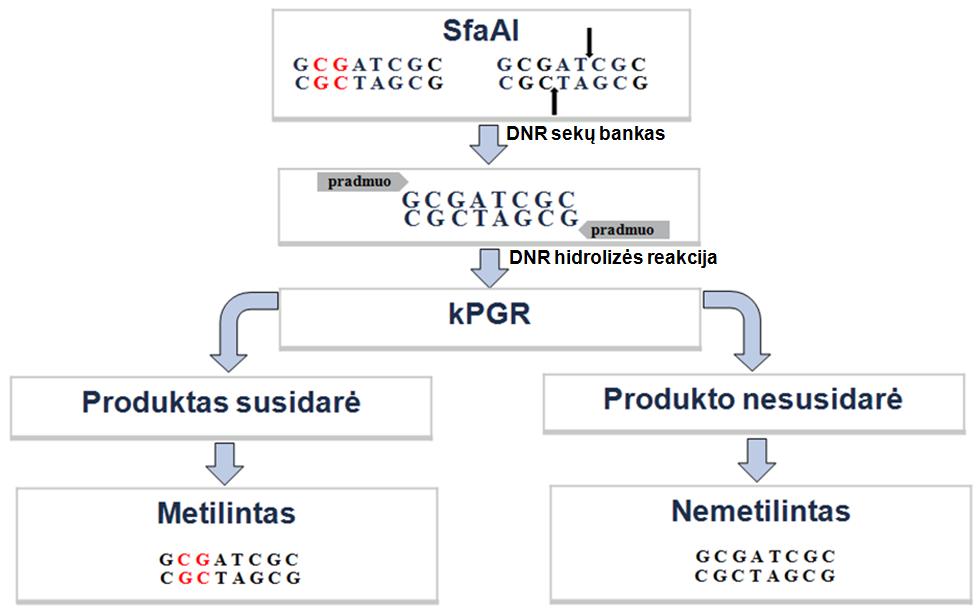
Iš gautų rezultatų yra vertinamas REazių jautrumas metilinimui: CseI ir SsiI fermentai metilinimui nejautrūs – metilintas ir nemetilintas oligonukleotidai buvo sufragmentuoti. AjiI restrikcijos endonukleazė pasižymi nepilnu jautrumu metilinimui.



**13 pav.** Restrikcijų endonukleazių jautrumo metilinimui tyrimų duomenys. Raudona spalva pažymėtos REazės, kurios metilintam citozinui yra jautrios, mėlyna – REazės, kurios pasižymi nepilnu jautrumu metilinimui, žalia – REazės, kurios metilinimui yra nejautrios.

**3.2. Modelinės sistemos, DNR metilinimui įvertinti, kūrimas**

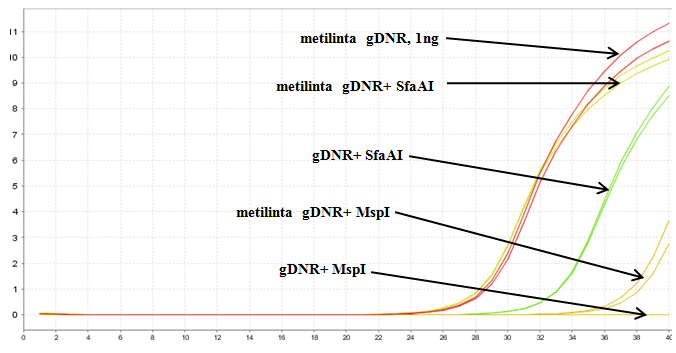
DNR metilinimo lygio įvertinimui buvo parinkta modelinė sistema (14 pav.). Remiantis literatūros duomenimis ir bioinformatine analize buvo pasirinkta *DAPK* genoseka. Pagal pasirinktą geno seką ir SfaAI restrikcijos endonukleazės atpažinimo seką suformuoti pradmenys, tikslinės geno dalies padauginimui kPGR būdu.



**14 pav**. Modelinės sistemos schema.

**3.2.1. Tikslinės žmogaus gDNR srities tyrimas kPGR metodu**

*DAPK* geno metilinimo lygis įvertintas kiekybiniu kPGR metodu. metilinta gDNR ir gDNR buvo hidrolizuojamos SfaAI ir MspI REazėmis ir atliekamas tikslinio geno srities gausinimas StepOne Plus prietaisu.

****

**15 pav.** Paveikto REazėmis*DAPK* geno metilinimo lygio tyrimas.

Metilintos gDNR+SfaAI amplifikacijos profilis sutampa su kontrole (su nepaveikta REaze metilinta gDNR), tai reiškia, kad metilinimas inhibuoja fermento SfaAI veikimą. MspI REazė nejautri metilinimui, tai atsispindi kPGR rezultatuose: gDNR+MspI reakcijoje susidarė nykstamai mažas produkto kiekis. gDNR+MspI amplifikacijos profilis rodo, kad produkto nesusidarė – gDNR buvo pilnai sufragmentuota. gDNR+SfaAI kPGR rezultatai rodo, kad 6% gDNR turi CpG metilinimą tiriamojoje pozicijoje. 16 lentelėje pateikiami REazėmis paveikto *DAPK* geno metilinimo lygo analizės duomenys.

**16 lentelė.** *DAPK* geno pasirinktos srities metilinimo lygio įvertinimas (paskaičiuota StepOne Plus programa).

|  |  |
| --- | --- |
| **Tiriamas mėginys** | **Nesufragmentuotos DNR kiekis , %** |
| Metilinta gDNR + MspI | 0 |
| gDNR + MspI | 0 |
| Metilinta gDNR + SfaAI | 100 |
| gDNR + SfaAI | 6 |

**IŠVADOS**

# Pasirinktos 21 restrikcijos endonukleazės su nežinomu jautrumu pavieniam CpG metilinimui;

# Atsižvelgiant į restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekas bei metilinto citozino poziciją jose, parinkta kontrolinė sistema leidžianti įvertinti REazių jautrumą 5mCpG;

# Nustatytas restrikcijos endonukleazių jautrumas pavienių CpG metilinimui: SspDI, SfaAI, Eco52I, Cfr42I, MauBI, MreI restrikcijos endonukleazės jautrios 5mC metilinimui atpažinimo sekose; FspAI, SfaAI, PdiI, Cfr10I, SspDI, SsiI, CseI, TauI restrikcijos endonukleazės 5mC metilinimui nejautrios, kai CG dinukleotidų metilinimo pozicija yra atpažinimo sekos riboje; SgrDI, CpoI, Bsp68I, Bsh1285I, SgsI restrikcijos endonukleazės pasižymi daliniu jautrumu 5mC metilinimui atpažinimo sekose; Esp3I ir AjiI restrikcijos endonukleazės pasižymi daliniu jautrumu 5mC metilinimui, kai CG dinukleotidų metilinimo pozicija yra atpažinimo sekos riboje;

# Modelinėje sistemoje gauti rezultatai, pritaikiti analizuoti DNR sričių metilinimo lygius pavieniams CpG dinukleotidams kPGR metodu.

**PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju Ninai Urbelienei ir dr.Arūnui Lagunavičiui už nuoseklų vadovavimą ir pagalbą rašant magistrinį darbą, už pasiūlymus, pastabas ir kantrybę, Thermofisher Scientific Vilniaus padalinui už suteiktą praktikos vietą. Dėkoju dr. Jolantai Vitkutei, Vitaliui Tikniui, epigenetikos laboratorijos kolektyvui, Renatai Kapcevičiūtei už taiklius pastebėjimus, bendradarbiavimą ir malonų bendravimą.

**LITERATŪROS SĄRAŠAS**

# Ammerpohl O., Martín-Subero J.I., Richter J., Vater I., Siebert R. Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation. Biochimica et Biophysica Acta. 2009; 1790: 847–862.

# Baylin S.B., Herman J.G., Graff J.R., Vertino P.M., Issa J.-P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. 1998; Adv. Cancer Res. 72: 141-96.

# Barros S.P., Offenbacher S. Epigenetics: Connecting Environment and Genotype to Phenotype and Disease. 2009; J Dent Res 88(5): 400-408.

# Bartolomei MS, Tilghman SM. Genomic imprinting in mammals. Annual Review of Genetics. 1997; 31: 493-525

# Bath, A.J., Milsom, S.E., Gormley, N.A., Halford S.E. Many type IIs restriction endonucleases interact with tow recognition sites before cleaving DNA. J. Biol. Chem. 2002; 277: 4024-4033.

# Begin before birth, 2013. <http://www.beginbeforebirth.org/the-science/epigenetics> (žiūrėta 2013).

# Bickle T.A., Kruger D.H. Biology of DNA restriction. Microbiol. Rev. 1993; 57(2): 434-450.

# Basic Local Alignment Search Tool. http://www. ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blas; 2013

# Brown KD, Robertson KD. DNMT1 knockout delivers a strong blow to genome stability and cell viability. Nat Genet. 2007; 39(3): 289-90.

# Brueckner Bodo et. al., Epigenetic Reactivation of Tumor Suppressor Genes by a Novel Small-Molecule Inhibitor of Human DNA Methyltransferases. Cancer Res 2005; 65: (14).

# Callinan P.A., Feinberg A.P. The emerging science of epigenomics. Human Molecular Genetics. 2006; 15(1): R95–R101.

# Chmuzh E.V., Kashirina J.G., Tomilova J.E., Mezentseva N.V., Dedkov V.S., Gonchar D.A., Abdurashitov M.A., Degtyarev S.Kh. A novel restriction endonuclease BisI from Bacillus subtilis T30, recognizes a methylated DNA sequence 5'-G(5mC)^NGC-3'. Biotekhnologia (Moscow). 2005; 3: 22-26.

# Cui Hengmi, Isabele Ciu, Xi Yang. Antisense RNRs and Modulation of Tumor-soppressorGenes. In: Non-coding RNAs and EpigeneticRegulation of Gene expression. Ed. By Kevin Morris. Caister Academic Press 2010. UK. 162 p.

# Deaton A.M., Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. Genes Dev. 2011; 25: 1010-1022.

# Deibert, M., Gražulis, S., Sasnauskas, G., Šikšnys, V., Huber, R. Structure of the tetrameric restriction endonuclease NgoMIV in complex with cleaved DNA. Nature Struct. Biol. 2000; 7: 792-799.

# **Dryden** D.T.F., Murray N.E., Rao D.N. Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. Nucleic Acids Res. 2001; 29(18): 3728-3741.

# Duenas-Gonzalez, A., Lizano, M., Candelaria, M., Cetina, L., Arce, C., Cervera, E. 2005. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. Molecular Cancer. 4: 38.

# Ehab Atallah and Guillermo Garcia-Manero. Epigenetic Drugs: DNA Demethylating Agents. In. Epigenetics in BIOLOGY and MEDICINE Edited by Manel Esteller. Taylor. Boca Raton London New York 2009. 6-27p.

# Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes and Development 2001, 15, 188-200.

# Fatemi M., Pao M.M., Jeong S, Gal-Yam E.N., Egger G., Weisenberger D.J., Jones P.A. Vectors and delivery systems in gene therapy. 2005; Medical Science Monitor 33 (20): 176.

# [Fischle](http://genesdev.cshlp.org/search?author1=Wolfgang+Fischle&sortspec=date&submit=Submit) W. Talk is cheap—cross-talk in establishment, maintenance, and readout of chromatin modifications. Genes & Dev. 2008; 22: 3375-3382.

# Heard E, Clerc P, Avner P. X-chromosome inactivation in mammals. Annual Review of Genetics. 1997; 31: 571-610

# Heitman J. On the origins structures and functions of restrictions modification enzymes. In: Setlow J.K., editor. Genetic Engineering, New York: Plenum Press; 1993. p. 58-106.

# Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger ir R. Watson. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. Nat Biotech 1993; 11(9): 1026-1030.

# Huai, Q., Colandene, J.D., Topal, M.D., Ke, H. Structure of NaeI – DNA complex reveals dual – model DNA recognition and complete dimer rearrangement. [Nature Struct. Biol.](javascript:AL_get(this,%20'jour',%20'Nat%20Struct%20Biol.');) 2001; 8(8): 665-9.

# Huang Y., Pastor W.A., Shen Y., Tahiliani M., Liu D.R., Rao A. Behaviour of 5-Hydroxymethylcytosine in Bisulfite Sequencing. PLoS ONE. 2010; 5(1): e8888.

# Illingworth R, Kerr A, Desousa D, Jørgensen H, Ellis P, Stalker J, Jackson D, Clee C, Plumb R, Rogers J, Humphray S, Cox T, Langford C, Bird A. A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. PLoS Biol. 2008; 6(1): e22.

# Kriaucionis S., Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. Science, 2009; 324 (5929): 929-930.

# Kruger T., Wild C., Noyer-Weidner M. McrB: a prokaryotic protein specifically recognizing DNA containing modified cytosine residues. The EMBO Journal. 1995; 14(11): 2661-2669.

# Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömbom, A. Ståhlberg ir N. Zoric (2006). The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine 27(2–3): 95-125.

# [Lacks](http://rebase.neb.com/cgi-bin/authget?Lacks) S., [Greenberg](http://rebase.neb.com/cgi-bin/authget?Greenberg) B. A deoxyribonuclease of Diplococcus pneumoniae specific for methylated DNA. J. Biol. Chem. 1975; 250: 4060-4066.

# Lee T., Zhai J., Meyers B.C. Conservation and divergence in eukaryotic DNA methylation. PNAS. 2010; 107(20): 9027–9028.

# Lengauer C., Kinzler KW., and Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. Nature 1998; 396: 643-649.

# Mahadevan L.C, Willis A.C, and Barratt M. 1991. Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. Cell 65: 775-783.

# Matouk Charles C, Paul J Turgeon, Philip A Marsden. Epigenetics and stroke risk – beyond the static DNA code. Advances in Genomics and Genetics 2012:2 67–84.

# [McCabe](http://clincancerres.aacrjournals.org/search?author1=Michael+T.+McCabe&sortspec=date&submit=Submit) M.T., Brandes J.C., Vertino P.M. Cancer DNA Methylation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. Clin Cancer Res. 2009; 15(12): 3927-3937.

# McClelland M., Nelson M., Raschke E. Efect of site – specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. [Nucleic Acids Res.](javascript:AL_get(this,%20'jour',%20'Nucleic%20Acids%20Res.');) 1994; 22(17): 3640-3659.

# Merck Index, ed. 12, Merck&Co., Inc, New York 1996. 155, 2864, 6128*.*

# Morris [Kevin V](http://www.sciencemag.org/search?author1=Kevin+V.+Morris&sortspec=date&submit=Submit)., [Simon W.-L. Chan](http://www.sciencemag.org/search?author1=Simon+W.-L.+Chan&sortspec=date&submit=Submit), [Steven E. Jacobsen](http://www.sciencemag.org/search?author1=Steven+E.+Jacobsen&sortspec=date&submit=Submit), [David J. Looney](http://www.sciencemag.org/search?author1=David+J.+Looney&sortspec=date&submit=Submit). Small Interfering RNA-Induced Transcriptional Gene Silencing in Human Cells. Science. 2004; 305(5688): 530-541.

# Murray N.E. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertany and Weigle). Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000; 64(2): 412-434.

# Murrell A., Rakyan V.K., Beck S. From genome to epigenome. Human Molecular Genetics. 2005; 14(1): R3–R10.

# Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell. 1999; 99(3): 247-57.

# Panne D., Müller S.A., Wirtz S., Engel A., Bickle T.A. The McrBC restriction endonuclease assembles into a ring structure in the presence of G nucleotides. EMBO J. 2001; 20: 3210 - 3217.

# Panne D., Raleigh E.A., Bickle T.A. McrBs, a modulator peptide for McrBC activity. EMBO J. 1998; 17: 5477-5483.

# Pavlopoulou A., Kossida S. Plant cytosine-5 DNA methyltransferases: Structure, function, and molecular evolution. Genomics. 2007; 90: 530–541.

# Pingoud A., Jeltsch A. Structure and function of type II restriction endonucleases. Nucleic Acids Res. 2001; 29: 3705-3727.

# Raleigh E. A., Wilson G. Escherichia coli K-12 restricts DNA containing 5-methylcytosine. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1986; 83(23): 9070–9074.

# Raulinaitis V. Epigenetika, epigenetinis paveldimumas ir jo svarba. [Biologinė psichiatrija ir psichofarmakologija. 2007;](http://www.pri.kmu.lt/Biologine%20psichiatrija(zurnalas)/2007_9/2007_9_19_21.pdf) 9(1): 19-21.

# Reik Wolf and Wendy Dean. Mammalian Epigenomic: Reprogramming the Genome for Development and Therapy. In: The Epigenome. Ed. By S. Beck and A. Olek. WILEY-VCH, GmbH & Co. 2003. p. 69.

# Roberts R.J. The restriction enzyme database, New England BioLabs Inc. REBASE. [http://rebase.neb.com](http://rebase.neb.com/) (žiūrėta 2013.04.).

# Roberts R.J., Belfort M., Bestor T., Bhagwat A.S. et al. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, Homing endonucleases and their genes. Nucleic Acids Res. 2003; 31(7): 1805-1812.

# Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. REBASE – a database for DNA restriction and modification:enzymes genes and genomes. Nucleic Acids Res. 2010; 38: D234-D236.

# Robertson A.B., Dahl J.A., Va C.B., Tripathi P., Krokan H.E., Klungland A. A novel method for the efficient and selective identification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. Nucleic Acids Research. 2011; 39(8): e55.

# Sasnauskas Kęstutis. Molekulinė biologija. Vilnius 1996. 30 - 43

# Sayle R.A., Milner–White E.J. RASMOL:Biomolecular graphic for all. [Trends in Biochemical Sciences](http://www.sciencedirect.com/science/journal/09680004). 1995; [20(9](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=PublicationURL&_tockey=%23TOC%235180%231995%23999799990%23204964%23FLP%23&_cdi=5180&_pubType=J&view=c&_auth=y&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=3e10d021627e07b634363efc857e949e)): 374-376.

# Shu-Ching Yan Matthew, Charles C. Matouk, and Philip A. Marsden. Epigenetics in Health and Disease. J Appl Physiol. 2010.109: 916–926.

# Smith H.O., Nathans D. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. J. Mol. Biol. 1973; 81: 419-423.

# Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. J Biol Chem. 2004; 279(26): 27816-23.

# Sutherland E., Coe L., Raleigh E.A. McrBC: a multisubunital CTP – dependent restriction endonuclease. J. Mol. Biol. 1992; 225(2):327-48.

# Tahiliani M., Koh K.P., Shen Y., Pastor W.A., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer L.M., Liu D.R., Aravind L., Rao A. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1.Science. 2009; 324(5929): 930–935.

# Tarasova G.V., Nayakshina T.N., Degtyarev S.K.H. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease GlaI. BMC Mol. Biol. 2008; 9: 7.

# Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. Curr Opin Genet Dev. 1993; 3(2): 226-31.

# Thermo Scientific. http://com.fermentas.lt/en/home

# Waalwijk, C., Flavell, R.A. MspI, an isochizomer of HpaII which cleaves both unmethylated and methylated HpaII sites, Nucleic Acids Res.1978; 5: 3231-3236.

# Walsh C.P., Bestor Т.Н. Cytosine methylation and mammalian development. Genes Dev, 1999; 13: 26-34.

# Weinhold B. Epigenetics: the science of change. Environ Health Perspect. 2006; 114(3): A160–A167.

# Wilson, K., Walker, J. Principles an techniques of practical biochemistry, fifth edition, Cambridge university press, 2000; 687-728.

# Zeng Y, Cullen BR. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. RNA 2002, 8, 855-860.

# Zhang X. The Epigenetic Landscape of Plants. Science. 2008; 320: 489.

# Zheng Y., Cohen-Karni D., Xu D., Chin H.G., Wilson G., Pradhan S., Roberts R.J. A unique family of Mrr-like modification-dependent restriction endonucleases. Nucleic Acids Res. 2010; 38(16): 5527-5534.

# Zhu Z., Samuelson J.C., Zhou. J., Dore A., Xu S.Y. Engineering stand – specific DNA nicking enzymes from the type IIS restriction endonucleases BsaI, BsmBI and BsmAI. J. Mol. Biol. 2004; 337: 573–583.