

Povzetek

Metilacija citozina je ključna epigenetska modifikacija, ki je bila predmet številnih študij zaradi svoje pomembne vloge pri regulaciji izražanja genov. Kljub temu pa vpliv metilacije citozina na tvorbo in stabilnost nekanoničnih terciarnih G-kvadrupleksnih struktur ostaja v veliki meri nepojasnen. V tej študiji smo se osredotočili na vpliv uvedbe metiliranega citozinskega ostanka v G-bogato zaporedje ter podrobno ovrednotili termodinamske in kinetične vidike njegovega zvijanja. Preučevano oligonukleotidno zaporedje bcl2Mid 5'-d(GGG CGC GGG AAGGATT GGG C GGG) se nahaja znotraj GC-bogatega območju v P1 promotorski regiji gena *BCL2* (B-cell lymphoma 2), ki ima ključno vlogo pri regulaciji njegovega izražanja. Tvorba in strukturni detajli G-kvadrupleksov v bcl2Mid in tudi širši regiji so bili predhodno podrobno raziskani, kar smo uporabili kot izhodišče študije vpliva metilacije citozinskih ostankov. Z uporabo NMR spektroskopije in komplementarnih biofizikalnih metod, kot so UV-Vis spektroskopija, CD spektropolarimetrija in diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC), smo odkrili nov in doslej nepoznan vpliv 5-metilcitozina na strukture G-kvadrupleksov. S ciljno usmerjenimi substitucijami citozina na položaju C6 s C6^m smo dokazali, da 5-metilcitozin upočasni kinetiko (ra)zvijanja ter vpliva na ravnotežje struktur G-kvadrupleksov. Dokazali smo, da C6^m modifikacija destabilizira prevladujočo in poveča delež manj zastopane zvrsti. Slednjo smo strukturno okarakterizirali in dokazali, da gre za G-kvadrupleks, ki vsebuje nenavadno in redko opaženo "snapback" zanko na 5'-koncu. S primerjalno strukturno karakterizacijo smo ugotovili, da gre za enak tip zvitja, kot ga ima doslej še neraziskana manj zastopana struktura, ki jo tvori nemodificirana DNK. Odkritje, da lahko že en sam 5-metilcitozinski ostanek bistveno spremeni delež G-kvadrupleksnih struktur v ravnotežju, smo postavili v kontekst bioloških procesov in ugotovili, da se motiv cinkovega prsta 3, ki je del DNK-vezavne domene transkripcijskega faktorja Sp1, specifično veže na manj zastopano G-kvadrupleksno strukturo nemodificirane DNK, medtem ko podobnih interakcij s prevladujočo strukturo nismo zaznali. Rezultati naših študij so osvetlili pomen epigenetskih sprememb v kontekstu polimorfizma G-kvadrupleksov in pripomogli k razumevanju, da lahko navidezno majhne in lokalne strukturne spremembe DNK vplivajo na vezavo transkripcijskih faktorjev ter nadalje regulacijo izražanja genov.