

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.261>

<https://orcid.org/0000-0002-8304-7992>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Milda
MICKUTĖ

Viengrandines mažasias RNR
modifikuojančių gyvūnų Hen1
metiltransferazių taikymas RNR
žymėjimui ir sekoskaitai

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2021

Disertacija rengta 2013– 2017 metais Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre, Biotechnologijos institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas – prof. dr. Giedrius Vilkaitis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Rolandas Meškys (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Nariai:

dr. Julija Armalytė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004);

dr. Georgij Kostiuk (Max Planck Biofizikinės chemijos institutas, gamtos mokslai, biochemija, N 004);

dr. Arūnas Lagunavičius (Thermo Fisher Scientific Baltics, gamtos mokslai, biochemija, N 004);

prof. dr. Jaunius Urbonavičius (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2021 m. gruodžio mėn. 10 d. 10 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R-401 auditorijoje. Adresas: (Saulėtekio alėja 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva), tel. +37062379436; el. paštas milda.mickute@bti.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Milda
MICKUTĖ

The application of animal Hen1 methyltransferases for labelling and sequencing of single-stranded RNA

DOCTORAL DISSERTATION

Nature sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2021

This dissertation was prepared between 2013 and 2017, at Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biotechnology.

The research was supported by Research Council of Lithuania.

The dissertation is defended on an external basis.

Academic consultant – Prof. Dr. Giedrius Vilkaitis (Vilnius University, Nature sciences, Biochemistry, N 004).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Rolandas Meškys (Vilnius University, Nature sciences, Biochemistry, N 004).

Members:

Dr. Julija Armalytė (Vilnius University, Nature sciences, Biochemistry, N 004);

Dr. Georgij Kostiuk (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Nature sciences, Biochemistry, N 004);

Dr. Arūnas Lagunavičius (Thermo Fisher Scientific Baltics, Nature sciences, Biochemistry, N 004);

Prof. Dr. Jaunius Urbonavičius (Vilnius Gediminas Technical University, Nature sciences, Biochemistry, N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 10 a.m. on 10th December 2021 in auditorium R-401 of the Vilnius University Life Sciences Center. Address: Saulėtekio Ave.7, Vilnius, Lithuania. Tel. +37062379436; milda.mickute@bti.vu.lt.

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	8
ĮVADAS.....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1 Mažosios reguliacinės RNR.....	15
1.1.1 Eukariotinės mažosios nekoduojančios RNR.....	15
1.1.2 Bakterinės mažosios reguliacinės RNR	21
1.2 Hen1 RNR metiltransferazės.....	26
1.2.1 Pirma pošeimė – didžiosios augalų HEN1 metiltransferazės	27
1.2.2 Antra pošeimė – gyvūnų Hen1 baltymai.....	28
1.2.3 Trečia pošeimė – bakterinės Hen1 metiltransferazės	31
1.2.4 Katalizinės Hen1 metiltransferazių savybės.....	32
1.3 RNR metiltransferazių pritaikymas RNR žymėjimui.....	36
1.3.1 Informacinės RNR kepurę modifikuojančios RNR metiltransferazės.....	38
1.3.2 Vidinės RNR metiltransferazės	39
1.3.3 3'-galus modifikuojančios RNR metiltransferazės	42
1.4 RNR sekoskaita.....	43
1.4.1 Mažųjų reguliacinių RNR paruošimas – ribosominių RNR pašalinamas ir selektyvus tiriamų RNR praturtinimas	44
1.4.2 Kopijinės DNR bibliotekos paruošimas – netolygus adapterių prisiuvimas	48
1.4.3 Adapterių prisiuvimo reakcijos tolygumo didinimas	50
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	54
2.1 Medžiagos.....	54
2.1.1 Reagentai.....	54
2.1.2 Kofaktoriai	54
2.1.3 Pradmenys, vektoriai ir molekulinės masės žymenys	55
2.1.4 Baltymai ir fermentai	56
2.1.5 Rinkiniai	57
2.1.6 Bakterijų kamienai ir ląstelių linijos	57
2.1.7 Tirpalai ir terpės	57
2.2 Metodai.....	59
2.2.1 Hen1 metiltransferazių gryninimas	59
2.2.2 RNR substratų paruošimas	61
2.2.3 Hen1 metiltransferazių fermentinio aktyvumo tyrimas.....	63

2.2.4. Hen1 metiltransferazių pritaikymas RNR žymėjimui.....	65
2.2.5. DmHen1ΔC baltymo pritaikymas RNR sekoskaitai	68
3. REZULTATAI	72
3.1 Hen1 metiltransferazių fermentinio aktyvumo tyrimas.....	72
3.1.1 RNR metilinimo reakcijos priklausomybė nuo metalo kofaktoriaus.....	72
3.1.2 Skirtingus 3'-galinius nukleotidus turinčių RNR modifikavimas.....	75
3.1.3 Skirtingo ilgio RNR substratų modifikavimas	77
3.1.4 Aktyvuotų grupių pernaša nuo sintetinių S-adenozil-L- metionino analogų.....	78
3.1.5 Aktyvuotų grupių pernaša ant įvairaus ilgio ir sekos RNR substratų	80
3.1.6 RNR alkilinimas kofaktorių mišinyje	82
3.2 DmHen1 pritaikymas RNR žymėjimui.....	83
3.2.1 Dviejų žingsnių žymėjimas	84
3.2.2 Vieno žingsnio žymėjimas	84
3.3 DmHen1ΔC pritaikymas RNR žymėjimui.....	88
3.3.1 DmHen1ΔC fermentinio aktyvumo tyrimas	89
3.3.2 DmHen1ΔC pritaikymas RNR nustatymui FRET metodu.....	90
3.4 DmHen1ΔC pritaikymas RNR sekoskaitai.....	94
3.4.1 mDOT-seq metodo sukūrimas	95
3.4.2 mDOT-seq metodo įvertinimas - miRXplore RNR sekoskaita	98
3.4.3 mDOT-seq pritaikymas <i>Lactobacillus casei</i> BL23 sRNR sekoskaitai	104
4. APTARIMAS	111
4.1 DmHen1 ir HsHen1 – <i>in vitro</i> nuo kobalto priklausomos RNR metiltransferazės.....	111
4.2 Gyvūnų Hen1 metiltransferazės pasižymi plačiu substratinio specifiškumu.....	113
4.3 DmHen1 pritaikymas RNR žymėjimui mTAG metodu.....	114
4.4 Naujas kopijinės DNR bibliotekos paruošimo metodas – mDOT-seq	116
4.5 <i>Lactobacillus casei</i> BL23 sRNR sekoskaita mDOT-seq metodu.....	119
IŠVADOS	120
SANTRAUKA	121

LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	123
PRIEDAI.....	142
SUMMARY OF DOCTORAL DISERTATION.....	154
CURRICULUM VITAE.....	184
DALYVAVIMAS MOKSLINIULOSE PROJEKTULOSE.....	186
PEDAGOGINĖ IR MOKSLO POPULIARINIMO VEIKLA.....	187
DISERTACIJOS TEMA PARENGTI MOKSLINIAI DARBAI.....	186
PADĖKA.....	192
UŽRAŠAMS.....	193

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- (d)PAG(E) – (denatūruojantis) poliakrilamidinis gelis (elektroforezė)
AA-bisAA – akrilamidas-bisakrilamidas
AdoHcy – *S*-adenozilhomocisteinas
AdoMet – *S*-adenozil-L-metioninas
Ago – Argonautų baltymų šeima
alil-SeHCys - *Se*-alil-L-selenohomocisteinas
APS – amonio persulfatas
ar. – aminorūgštis
ASR – atviro skaitymo rėmelis
AT – atvirkštinė transkripcija/atvirkštinė transkriptazė
AT-kPGR – atvirkštinė transkripcija-kiekybinė PGR
BSA –
cis-sRNR – *cis*-veikianti sRNR
CPM – nuskaitymų kiekis milijonui (angl. *Counts Per Million*)
crRNR – CRISPR RNR
CTD – C-galinis domenas (angl. *C-Terminal Domain*)
CuAAC – Cu (I) jonų katalizuojama azidų-alkinų ciklo prijungimo reakcija
DMSO – dimetilsulfoksidas
dgRNR – dvigrandinė RNR
dsRBD – dgRNR surišantis domenas (angl. *double stranded RNA Binding Domain*)
DTT – ditionitritolis
EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis
egzo-siRNR – egzogeninė siRNR
EMSA – RNR elektroforetinio judrumo gelyje poslinkio eksperimentas (angl. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*)
endo-siRNR – endogeninė siRNR
EtBr – etidžio bromidas
FRET – Försterio rezonansinės energijos pernaša (angl. *Förster Resonance Energy Transfer*)
GSH – redukuotas glutationas
GST – glutationo *S*-transferazė
hc-siRNR – heterochromatininė siRNR
HDV – hepatito D virusas
HPLC-MS – didelio našumo skysčių chromatografija-masių spektrometrija (angl. *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

iEDDA – invertuoto elektronų poreikio Diels-Alder reakcija (angl. *inverse Electron-Demand Diels-Alder*)

IPTG - izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas

kDNR – kopijinė DNR

kPGR – kiekybinė PGR

LAB – pienarūgštės bakterijos (angl. *Lactic Acid Bacteria, LAB*)

LB – Luria-Bertani

LCD – La motyvą turintis domenas (angl. *La-motif Containing Domain*)

LCG – *Lactobacillus casei* grupė

MAT – metionino adenziltransferazė

mDOT-seq – Hen1 metiltransferazės geba pažymėti vgRNR parentas kDNR bibliotekos paruošimo metodas (angl. *methyltransferase Directed Orthogonal Tagging and RNA sequencing*)

miRNR – mikroRNR; kreipiančioji miRNR/miRNR* duplekso grandinė

miRNR*– lydinčioji miRNR/miRNR* duplekso grandinė

mTAG – metiltransferazių katalizuojama aktyvuotų grupių pernaša nuo sintetinių kofaktoriaus analogų (angl. *methyltransferase-directed Transfer of Activated Groups*)

MTazė – metiltransferazė

MTazinis – metiltransferazinis domenas

nat-siRNR – iš natyvių priešprasminių transkriptų susidaranti siRNR

NDS – natrio dodecilsulfatas

NTD – N-galinis domenas (angl. *N-Terminal Domain*)

PAA – polikarilamidas

PEG – polietilenglikolis

piRNR – su PIWI baltymais sąveikaujanti RNR (angl. *PIWI interacting*)

PLD – į peptidilprolino izomerazę, PPIazę, panašus domenas (angl. *PPIase Like Domain*)

PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas

prie-miRNR – miRNR pirmtakas (angl. *precursor*)

pri-miRNR – pirminis miRNR transkriptas (angl. *primary*)

propinil-SeHCys – Se-propinil-L-selenohomocisteinas

RdRP – nuo RNR priklausoma RNR polimerazė (angl. *RNA dependent RNA Polymerase*)

RISC – RNR indukuotas nutildymo kompleksas (angl. *RNA Induced Silencing Complex*)

RNazė – ribonukleazė

RNR Pol – RNR polimerazė

scnRNR – mažoji skenuojančioji RNR (angl. *scan*)

SD sritis – Šaino-Dalgarno (angl. *Shine-Dalgarno*) sritis
siRNR – mažoji interferuojančioji RNR (angl. *small interfering*), kreipiančioji
siRNR/siRNR* duplekso grandinė
siRNR* – lydinčioji siRNR/siRNR* duplekso grandinė
snoRNR – mažoji branduolėlio RNR (angl. *small nucleolar*)
SPAAC – vario (I) jonų nekatalizuojama įtempto žiedo AAC reakcija (angl.
Strain-Promoted AAC)
sRNR – mažoji reguliacinė RNR (angl., *small*)
T4 Rnl – T4 RNR ligazė
T4 trRnl2 – sutrumpintas ir modifikuotas T4 RNR ligazės 2 variantas (angl.
truncated form of T4 RNA ligase 2)
TBTA – tris[(1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]aminas
TEMED - tetrametiletildiaminas
tmRNR – transportinė-informacinė RNR (angl. *transfer-messenger*)
TSS – transkripcijos pradžios sritis (angl. *Transcription Start Site*)
trans-sRNR – *trans*-veikianti sRNR
UMI – unikalus molekulinis identifikatorius
UTR – netransliuojamas iRNR regionas (angl. *UnTranslated Region*)
vgRNR – viengrandinė RNR

ĮVADAS

Šiuo metu žinoma apie 170 cheminių RNR modifikacijų, užtikrinančių funkcionalios tretinės RNR struktūros susidarymą, stabilizuojančių ir nukreipiančių RNR jų funkcijų atlikimui (1). Viena plačiausiai paplitusių RNR ribozės modifikacijų – tai RNR 2'-O-metilimas, būdingas visiems gyvybės domenams ir aptinkamas rRNR, tRNR, iRNR, mažosiose branduolio ir branduolėlio RNR bei mažosiose nekoduojančiose RNR. Dažniausiai RNR metilimą katalizuoja nuo *S*-adenozil-L-metionino (AdoMet) priklausomos metiltransferazės (2). Joms priskiriami ir Hen1 šeimos baltymai, pernešantys metilo grupę nuo AdoMet ant modifikuojamos RNR 3'-galinio nukleotido 2'-O-ribozės (3). Skirtingus RNR substratus modifikuojančių Hen1 metiltransferazių šeima pagal domeninę struktūrą išskiriama į keturias pošeimes: (i) iš N-galinio metiltransferazinio (MTazinio) domeno ir variabelaus ilgio C-galinės srities sudarytas gyvūnų, (ii) daugiadomenes, C-gale MTazinį domeną turinčias augalų, (iii) iš N-galinio ligazę aktyvuojančio ir C-galinio MTazinio domeno sudarytas bakterijų bei (iv) tik MTazinį domeną turinčias bakterijų Hen1 metiltransferazes (4–8). Gyvūnų Hen1 metiltransferazės modifikuoja viengrandines 21-30 nt ilgio, su PIWI baltymais sąveikaujančias ir aktyvių transpozonų kiekį reguliuojančias piRNR (angl. *PIWI interacting*) ir mažąsias interferuojančias, organizmą nuo endogeninės ir egzogeninės RNR apsaugančios, siRNR (angl. *small interfering*) (5–7). Parodyta, jog metilimas blokuoja šių RNR uridilinimą (nuo matricos nepriklausomą uridino 5'-monofosfatų prijungimą RNR 3'-gale) ir degradaciją, o Hen1 metiltransferazės trūkumas vaisinėse muselėse yra susijęs su smegenų pažaidomis, pelėse – patinų sterilumu, zebražuvėse – sutrikusiu oocitų vystymusi (9–11). Vis dėlto, kokiomis fermentinėmis savybėmis pasižymi šie, gyvūnams itin svarbūs baltymai, kol kas nėra detalčiai ištirta. Trūksta informacijos ir apie tai, kokią įtaką gyvūnų Hen1 metiltransferaziniam aktyvumui turi mažesniu konservatyvumu už MTazinį domeną pasižyminti C-galinė baltymo sritis (5–7).

Metiltransferazės, galinčios panaudoti sintetinius AdoMet analogus, t. y. pernešti ne tik metilo, bet ir ilgesnes šonines grupes, yra pritaikomos kovalentiniam chemofermentiniam RNR žymėjimui (12). RNR žymėjimas įgalina moksliniams ir praktiniams medicininiams tyrimams svarbų RNR molekulių vizualizavimą, praturtinimą, charakterizavimą ar net kiekybinį įvertinimą (13). Lyginant su nekovalentiniais metodais, pavyzdžiui hibridizacija su komplementariais oligonukleotidais, kovalentinis chemofermentinis RNR žymėjimas išsiskiria stabilumu, biosuderinamumu,

selektyvumu ir efektyvumu – savybėmis, įgalinančiomis RNR modifikavimą ne tik *in vitro*, bet ir pačiose ląstelėse (14). Chemofermentinis RNR žymėjimas gali būti vykdomas vieno ar dviejų žingsnių metu. Pirmuoju atveju prie RNR yra tiesiogiai prijungiama reporterinė molekulė, antruoju – ant RNR pirmiausia yra pernešama funkcinė grupė, prie kurios sekančiame žingsnyje, dažnai *click* reakcijos metu, prijungiamas pasirinktas žymuo (15). Šiuo metu RNR žymėjimui yra pritaikytos trys RNR metiltransferazių grupės: iRNR kepurės struktūroje, RNR sekos viduje ir dvigrandinę RNR 3'-gale modifikuojantys fermentai. Šių baltymų aktyvumas priklauso nuo konkrečios RNR modifikacijos, sekos konteksto, specifinės antrinės RNR struktūros ar papildomų nukreipiančių ir modifikuojamai RNR komplementarių oligonukleotidų (16–21). Tačiau iki šiol nė viena RNR metiltransferazė nebuvo pritaikyta nuo papildomų faktorių nepriklausomam, gausiausios RNR grupės – viengrandinių RNR – 3'-galo žymėjimui. Būtent šiam tikslui galėtų būti pritaikytos gyvūnų Hen1 metiltransferazės, jų pagrindu sukuriant RNR vizualizavimui ir praturtinimui skirtus metodus.

Be to, chemofermentinis, gyvūnų Hen1 metiltransferazių kataliziniu aktyvumu paremtas viengrandinės RNR žymėjimas 3'-gale potencialiai galėtų būti pritaikytas ir mažųjų RNR sekoskaitai. Šiuo metu, ruošiant mažųjų RNR kopijinės DNR (kDNR) biblioteką, 3'-adapteris prie RNR 3'-galo yra prisiuvas naudojant sutrumpintą ir modifikuotą T4 RNR ligazės 2 variantą, T4 trRnl2 K227Q (angl. *truncated form of T4 RNA ligase 2*) (22). Detalūs pastarosios reakcijos tyrimai parodė, jog ji priklauso nuo RNR ir 3'-adapterio sekos, jų vidinės ir tarpusavyje sudaromos struktūros. Dėl išvardintų T4 trRnl2 K227Q šališkumų netolygiai nuskaitomos skirtingos sekos ir struktūros RNR, o po sekoskaitos gaunamų nuskaitymų kiekis neatspindi tikrojo RNR raiškos lygio (23–29). Nuo RNR sekos ir struktūros nepriklausomas dalinai gyvūnų Hen1 metiltransferazės katalizuojamas 3'-adapterio prisiuvas galėtų būti vienas iš sprendimų, užtikrinančių tolygesnį RNR įtraukimą į ruošiamą kDNR biblioteką.

Siekiant užpildyti žinių apie gyvūnų Hen1 metiltransferazės ir jų panaudojimo galimybes trūkumą, iškeltas TIKSLAS – charakterizuoti *Drosophila melanogaster* DmHen1 ir *Homo sapiens* HsHen1 metiltransferazių katalizuojamas fermentines reakcijas, ir pritaikyti gyvūnų Hen1 baltymą viengrandinių RNR žymėjimui reporterinėmis grupėmis ir sekoskaitai.

UŽDAVINIAI:

1. Ištirti DmHen1 ir HsHen1 metiltransferazių substratinį ir kofaktoriaus specifiškumą, bei šių fermentų katalizuojamos reakcijos priklausomybę nuo divalenčių metalo jonų.
2. Pritaikyti DmHen1 metiltransferazę RNR vizualizavimui ir praturtinimui, panaudojant vieno ir dviejų žingsnių žymėjimo reakcijas.
3. Nustatyti C-galinės DmHen1 dalies įtaką baltymo katalizuojamai reakcijai, ir įvertinti atitinkamos srities neturinčios DmHen1ΔC metiltransferazės pritaikymo RNR žymėjimui galimybę.
4. Sukurti DmHen1ΔC paremtą, viengrandinės RNR sekoskaitai skirtą kDNR bibliotekos paruošimo metodą, ir pritaikyti jį mažųjų reguliacinių RNR tyrimui.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Pateikiamame darbe pirmą kartą buvo išsamiai charakterizuotos gyvūnų Hen1 metiltransferazių vykdomos fermentinės reakcijos: (i) atrasta, jog *Drosophila melanogaster* DmHen1 ir *Homo sapiens* HsHen1 metiltransferazės pasižymi nuo Co^{2+} ir Co^{3+} jonų priklausomu fermentiniu aktyvumu; (ii) parodyta, jog DmHen1 vykdomos reakcijos greitis ir efektyvumas tik nežymiai priklauso nuo konkretaus modifikuojamo nukleotido, o HsHen1 atveju išsidėsto $A \approx C > U > G$ eile; (iii) nustatyta, jog *in vitro* sąlygomis tiriami baltymai modifikuoja ne tik gamtinius 22-28 nt, bet ir ilgesnius RNR substratus; (iv) atrasta, jog ir HsHen1, ir DmHen1 gali pernešti už metilo grupę didesnes šonines grandines su reporterinėmis ar funkcinėmis grupėmis nuo sintetinių kofaktoriaus analogų ant modifikuojamų RNR substratų. Taigi, gali būti pritaikyti vieno ir dviejų žingsnių RNR žymėjimo reakcijoms; (v) parodyta, jog DmHen1 C-galinė sritis nėra būtina ir net slopina fermentinį baltymo aktyvumą. C-galinės srities neturintis metiltransferazės variantas, DmHen1ΔC, neišskiria RNR substratų pagal 3'-galinį nukleotidą ir gali būti pritaikytas tolygiam RNR molekulių žymėjimui.

Atliktų tyrimų metu DmHen1 ir DmHen1ΔC pirmą kartą buvo pritaikyti viengrandinės RNR 3'-galo žymėjimui vieno ir dviejų žingsnių metodu. Fluoroforais modifikuotos RNR buvo vizualizuotos nustatant jų fluorescenciją ar Försterio rezonansinės energijos pernašos, FRET (angl. *Förster Resonance Energy Transfer*), signalą. Biotilintos RNR – išgrynintos iš reakcijos mišinio pasitelkus biotino-streptavidino sąveiką. Prie azido grupę turinčios RNR prijungus oligonukleotidą, susintetinta kopijinė DNR (kDNR).

Remiantis pastarąja reakcija buvo sukurtas mDOT-seq (angl. *methyltransferase-Directed Orthogonal Tagging and RNA sequencing*) – viengrandinės RNR sekoskaitai skirtas kDNR paruošimo metodas. Parodyta, jog mDOT-seq gali būti pasitelktas mažųjų RNR, pavyzdžiui 21-24 nt ilgio mikroRNR (miRNR) sekoskaitai. Pritaikius mDOT-seq pirmą kartą detaliai charakterizuotos ir ilgesnės, 50-500 nt, probiotinės *Lactobacillus casei* BL23 bakterijos mažosios reguliacinės RNR, sRNR (angl. *small*).

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. *In vitro Drosophila melanogaster* DmHen1 ir *Homo sapiens* HsHen1 metiltransferazės modifikuoja viengrandinius 22-80 nt ilgio RNR substratus metilo bei didesnėmis pernešamomis grupėmis, reakciją katalizuojant Co^{2+} ir Co^{3+} jonams.
2. DmHen1 metiltransferazė gali būti pritaikyta viengrandinės RNR žymėjimui fluoroforais ir biotinu, kuriuos galima panaudoti RNR vizualizavimui ir praturtinimui.
3. Didesniu skirtingų RNR substratų modifikavimo efektyvumu pasižyminti, C-galinės dalies neturinti DmHen1 Δ C metiltransferazė gali būti pritaikyta RNR nustatymui FRET metodu ir sintetinio oligonukleotido prijungimui prie modifikuotos RNR.
4. Sukurtas DmHen1 Δ C geba modifikuoti bet kokios sekos viengrandinę RNR parentas, sekoskaitai skirtos kDNR bibliotekos paruošimo metodas mDOT-seq (angl. *methyltransferase-Directed Orthogonal Tagging and RNA sequencing*).
5. mDOT-seq gali būti pritaikytas eukariotinių mikroRNR, miRNR, ir bakterinių 50-500 nt mažųjų reguliacinių RNR, sRNR, sekoskaitai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Mažosios reguliacinės RNR

Funkciškai itin įvairios RNR ne tik koduoja informaciją, bet ir ją perduoda, katalizuoja chemines reakcijas bei reguliuoja biologinių molekulių – DNR, kitų RNR ar baltymų – funkcijas. Minėtą reguliaciją eukariotuose užtikrina trims pagrindinėms klasėms priskiriamos 21-30 nt ilgio mažosios nekoduojančios RNR (30,31), bakterijose – 50-500 nt ilgio mažosios reguliacinės RNR, sRNR (angl., *small RNA*) (32). Eukariotuose mažosios nekoduojančios RNR transkripciniu ir potranskripciniu lygmeniu reguliuodamos genų raišką, palaiko tinkamą organizmo vystymąsi, apsaugo nuo virusų ir transpozonų (30,31). Bakterijų sRNR, genų raišką moduliuojančios dažniausiai potranskripciniame lygmenyje, yra ypač svarbios mikroorganizmams prisitaikant prie besikeičiančių aplinkos sąlygų (33).

1.1.1 Eukariotinės mažosios nekoduojančios RNR

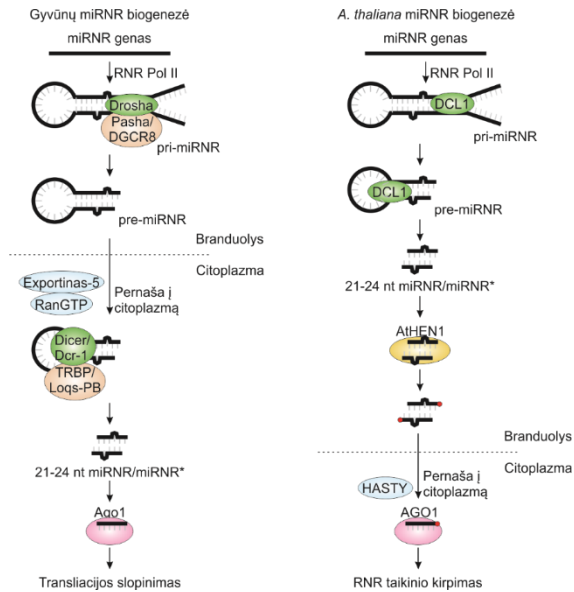
Eukariotinės mažosios nekoduojančios RNR pagal biogenezės kelią, sąveiką su Argonautų (Ago) šeimos baltymais ir atliekamas funkcijas yra išskiriamos į tris grupes (Lentelė 1.1). 21-24 nt ilgio mikroRNR (miRNR) ir mažosios interferuojančios RNR (siRNR, angl. *small interfering RNA*) susidaro iš dvigrandinių pirmtakų veikiant II tipo RNazei Dicer bei funkcionuoja kartu su Ago šeimos AGO pošeimio baltymais (31,34). Tik gyvūnuose (dažniausiai jų lytinėse liaukose ir ankstyvose vystymosi stadijose) sutinkamos 24-30 nt ilgio su Ago šeimos PIWI pošeimio baltymais sąveikaujančios piRNR (angl. *PIWI interacting RNA*) kyla iš viengrandinių transkriptų nuo RNazės Dicer nepriklausomu keliu (31). Ago baltymų surištos mažosios nekoduojančios RNR sudaro RNR indukuotą nutildymo kompleksą (RISC, angl. *RNA Induced Silencing Complex*) ir funkcionuoja sąveikaudamos su komplementariais RNR taikiniais, taip inicijuodamos jų degradaciją, slopindamos transliaciją ar indukuodamos chromatinio pokyčius (31,34,35).

Lentelė 1.1. Eukariotinės mažosios nekoduojančios RNR ir pagrindiniai jų skirtumai.

<i>Savybė</i>	<i>miRNR</i>	<i>siRNR</i>	<i>piRNR</i>
<i>Ilgis, nt</i>	21-24	21-24	23-30
<i>Pirmtakas</i>	plaukų segtuko struktūrą sudaranti viengrandinė RNR (vgRNR)	dgRNR	vgRNR
<i>Dicer</i>	reikalingas	reikalingas	nerikalingas
<i>Ago šeimė</i>	AGO	AGO	PIWI
<i>Veikimo mechanizmas</i>	<ul style="list-style-type: none"> ● gyvūnuose – translacijos slopinimas ● augaluose – iRNR kirpimas 	<ul style="list-style-type: none"> ● gyvūnuose – RNR kirpimas ● augaluose – RNR kirpimas, transkripcinis kartotinių genomo elementų raiškos slopinimas 	<ul style="list-style-type: none"> transkripcinis ir potranskripcinis transpozonų raiškos slopinimas
<i>Funkcija</i>	baltymus koduojančių genų raiškos reguliacija	<ul style="list-style-type: none"> ● baltymus koduojančių genų ir transpozonų raiškos reguliacija ● apsauga nuo virusų 	transpozonų raiškos slopinimas
<i>Organizmas</i>	gyvūnai ir augalai	gyvūnai ir augalai	gyvūnai

1.1.1.1 miRNR

Pirminiai miRNR transkriptai, vadinami pri-miRNR (angl. *primary*), yra nuskaitomi nuo savų promotorių veikiant RNR polimerazei II (RNR Pol II) (Pav. 1.1) (36). Viengrandinio, iki 1 kb ilgio pri-miRNR suformuotą stiebo-kilpos struktūrą gyvūnuose atpažįsta mikroprocesoriaus kompleksas, kurį sudaro trečio tipo RNazė Drosha ir pagalbiniai dvigrandinę RNR (dgRNR) surišantys baltymai – žmogaus ląstelėse – Pasha, vaisinėje muselėje *Drosophila melanogaster* – jo homologas DGCR8 (37–39). Šis kompleksas iš pri-miRNR iškerpa 60-70 nt ilgio stiebo-kilpos struktūros pre-miRNR (angl. *precursor*), kurią iš branduolio į citoplazmą perneša Exportino-5/RanGTP baltymų kompleksas (40). Citoplazmoje, veikiant Dicer ir TRBP ar PACT (*D. melanogaster* – Dicer homologui Dcr-1 ir Loqs-PB) baltymams, iš pre-miRNR yra iškerpamas dvigrandinis 5'-monofosfatą ir dviejų nt iškyšas 3'-gale turintis miRNR/miRNR* dupleksas (41–43). Dupleksui sąveikaujant su kataliziniu aktyvumu nepasižyminčiu Ago1 baltymu, viena iš grandinių, vadinama kreipiančiąja (miRNR), sudaro miRISC kompleksą, kita – lydincioji (miRNR*) – yra pašalinama dupleksą išvyniojant (44).



Pav. 1.1. miRNR biogenezė gyvūnuose (žmoguje ir *D. melanogaster*) ir augaluose (*A. thaliana*). Tik augalų miRNR yra modifikuojamos dalyvaujant HEN1 metiltransferazei. Modifikuota pagal (45).

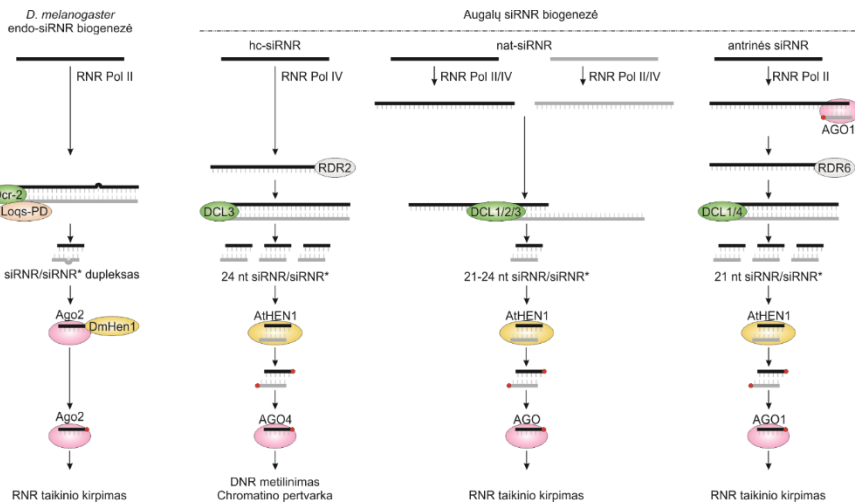
Augaluose, pavyzdžiui detaliam iširtame *A. thaliana*, dvigrandinis miRNR dupleksas susidaro dar branduolyje, specifiniuose jo kūneliuose (angl. *Dicing bodies*), dalyvaujant DICER-LIKE 1 (DCL1) nukleazei, HYL1, SE ir papildomiems baltymams (Pav. 1.1). DCL1 iškerpa miRNR dupleksą dviem žingsniais – pirmiausia pašalindama viengrandinius galus, vėliau – kitoje duplekso pusėje esančią kilpos struktūrą (46–48). Tik augaluose susidariusio miRNR duplekso 3'-galinės ribozės 2'-O-grupės yra papildomai modifikuojamos metilo grupe veikiant **HEN1 metiltransferazei** (49–52). Dalyvaujant HASTY baltymui metilintas miRNR dupleksas iš branduolio yra pernešamas į citoplazmą (53), kur, sąveikaujant su vienu iš dešimties *A. thaliana* identifiкуotų AGO baltymų AGO1, yra sudaromas kreipiančiąją miRNR grandinę turintis miRISC kompleksas (54).

Gyvūnuose miRNR dažniausiai sąveikauja su iRNR taikiniai 2-8 nukleotidais – vadinama grūdo (angl. *seed*) seka. Dėl trumpos sąveikos srities jos dažnai reguliuoja net kelių iRNR raišką (55). miRISC kompleksui prisijungus prie 3'-netransliuojamų iRNR regionų (UTR, angl. *UnTranslated Region*), yra slopinama iRNR transliacija, skatinamas jos deadenilinimas, kepurės pašalinimas ir degradacija (56). iRNR taikiniams beveik idealiai komplementarios ir paprastai su vieninteliu RNR taikiniu sąveikaujančios augalų miRNR tiesiogiai inicijuoja AGO1 katalizuojamą iRNR hidrolizę tarp

10-11 miRNR nukleotido (57). Ir augaluose, ir gyvūnuose miRNR dažnai yra konservatyvios ir kritiškai svarbios jų vystymuisi, o pakitusi miRNR raiška žmoguje pasitelkiama kaip konkrečiai patologijai, jos eigai ir prognozei specifinis žymuo (56–58).

1.1.1.2 siRNR

Pagal savo kilmę gyvūnuose siRNR yra išskiriamos į endogenines, nuo paties organizmo geno, pavyzdžiui transpozonų sekų, nuskaitomas, bei ilgas dvigrandines struktūras sudarančias, ir egzogenines, sintetines ar virusinės kilmės, siRNR, endo- ir egzo-siRNR, atitinkamai (59,60). Priešingai nei miRNR, gyvūnų siRNR yra subrandinamos išskirtinai ląstelės citoplazmoje. *D. melanogaster* atveju dalyvaujant Dicer endonukleazei Dcr-2 ir Loqs-PD baltymui iš RNR Pol II susintetintų siRNR pirmtakų ar svetimos dgRNR yra iškerpamas dviejų nukleotidų iškyšas 3'-gale turintis siRNR dupleksas (Pav. 1.2) (59,61). siRNR/siRNR* sąveikaujant su Ago2 baltymu, lydinčioji grandinė yra degraduojama (62), o komplekse likusią kreipiančiąją siRNR grandinę modifikuoja **DmHen1 metiltransferazė** (5,7).



Pav. 1.2. endo-siRNR biogeneze *D. melanogaster* ir *A. thaliana*. Raudonu apskritimu pažymėta metilo grupė. Modifikuota pagal (30,31).

Kataliziškai aktyvus siRISC kompleksas funkcionuoja hidrolizuodamas siRNR komplementarius iRNR taikinius tarp 10-11 siRNR nukleotido (63), taip apsaugodamas organizmą nuo mobilių geno elementų, transpozonų ir svetimų nukleorūgščių, pavyzdžiui, virusų (31). Kitaip, nei vaisinės muselės, žinduoliai neturi specializuoto siRNR brendime dalyvaujančios Dicer baltymo. Ir nors žinduoliuose taip pat susidaro siRNR, pagrindines jų

funkcijas atlieka transpozonų raišką slopinantis DNR metilinimas ar dvigrandinių RNR inicijuojamas interferonų atsakas (64).

Augaluose išskiriamos trys pagrindinės endo-siRNR klasės: heterochromatininės hc-siRNR, iš natyvių priešprasminių transkriptų susidaranti nat-siRNR ir antrinės siRNR (30). Kaip ir augalų miRNR, visų tipų siRNR dupleksai prieš sudarydami sąveikas su AGO baltymais yra modifikuojami dalyvaujant **HEN1 metiltransferazei** (Pav. 1.2) (50,52,65).

hc-siRNR susidaro RNR Pol IV nuskaitant heterochromatininius, kartotinius, transpozonus koduojančius genomo regionus (Pav. 1.2) (66). Pirminis transkriptas funkcionuoja kaip matrica nuo RNR priklausomai RNR polimerazei (RdRP, angl. *RNA dependent RNA Polymerase*) RDR2, vgrNR paverčiančiai dvigrandiniu transkriptu, kurį vienas iš augalų Dicer baltymų, DCL3, hidrolizuoja iki 24 nt ilgio siRNR duplesų (67). Komplekse su lydinčiąją grandinę hidrolizuojančiais AGO4 grupės baltymais, kreipiančioji hc-siRNR grandinė inicijuoja DNR metilinimą ir chromatinio modifikacijas, taip užtikrindama ją koduojančių genomo sričių raiškos slopinimą (68).

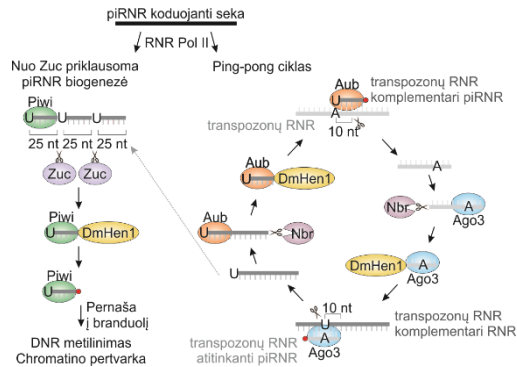
Nuo RNR Pol II ar IV priklausomi nat-siRNR pirmtakai susidaro hibridizuojantis dviem nepriklausomai nuskaitomoms RNR, kurių vienos raiška yra indukuojama augalui susiduriant su stresinėmis sąlygomis (Pav. 1.2) (69–71). nat-siRNR pirmtakus hidrolizuojant DCL1 ir DCL2 ar DCL3 nukleazėms, iš susidariusių 21-24 nt ilgio RNR duplesų, AGO baltymą turinčiame komplekse įsitvirtinusi kreipiančioji grandinė inicijuoja taikinio RNR kirpimą, taip reguliuodama atsako į stresą genų raišką (69,71,72).

Antrinės siRNR susidaro po miRNR ar kitų siRNR inicijuoto RNR taikinio kirpimo RdRP (dažniausiai RDR6) susintetinus taikiniui komplementarią RNR grandinę, ir gautą dgRNR sukarpant DCL1 ar DCL4 nukleazei į keletą vienas po kito sekančių 21 nt RNR duplesų (Pav. 1.2) (69,73,74). Kreipiančiosios antrinių siRNR grandinės sudaro kompleksus su AGO1 baltymu, inicijuojančiu komplementarios iRNR hidrolizę, taip reguliuodamos augalo vystymąsi (75). Antrinių RNR sintezė yra inicijuojama ir po DCL2/3/4 katalizuojamos egzogeninės RNR hidrolizės, taip reguliuojant, pavyzdžiui, virusinės RNR kiekį (76).

1.1.1.3 piRNR

piRNR pirmtakai – viengrandiniai RNR transkriptai – dalyvaujant RNR Pol II yra sintetinami nuo transpozonus koduojančių genomo fragmentų, vadinamų piRNR klasteriais, susidaro iš pavienių transpozonų, ilgų nekoduojančių RNR ar iRNR 3'-galų (77). Detaliai ištirtoje *D. melanogaster* piRNR yra brandinamos citoplazmoje, dalyvaujant PIWI pošeimio Piwi, Aub

ir Ago3 baltymams (78). Somatinėse kiaušidžių ląstelėse Piwi baltymui sąveikaujant su piRNR pirmtakais, Zucchini (Zuc) nukleazė juos hidrolizuoja susidarant vienas po kito einančioms, 25 nt ilgio, 5'-U-nukleotidą turinčioms piRNR (79). Gauti piRISC kompleksai yra pernešami į branduolį (80), kur, piRNR sąveikaujant su komplementariais transpozonų transkriptais, yra inicijuojamas heterochromatino susidarymas (81). Lytinėse ląstelėse piRNR susidaro trimis skirtingais keliais – *de novo*, ping-pong ciklo metu ir jau aprašytu būdu dalyvaujant Zuc nukleazei (78).



Pav. 1.3. Du *D. melanogaster* piRNR biogenezės keliai. Modifikuota pagal (77).

Nors tikslus piRNR susidarymo *de novo* keliu mechanizmas šiuo metu nėra detaliai suprastas, būtent šiuo būdu subrandintos, Aub baltymo surištos, transpozonų RNR komplementarios, U-nukleotidu prasidedančios piRNR inicijuoja ping-pong ciklą specifinėse lytinių ląstelių granulėse. Šios piRNR nukreipia Aub transpozonų iRNR nutildymui, inicijuodamos jų kirpimą tarp 10 ir 11 kreipiančiosios piRNR nukleotido, taip suformuojant naujos, dešimtoje pozicijoje A nukleotidą turinčios bei pirmais dešimčia nukleotidų su Aub sąveikavusiai piRNR komplementarios naujos piRNR 5'-galą. Šis kirpimo produktas yra surišamas Ago3 baltymo (82), o piRNR galutinai subrandinama jos 3'-galą hidrolizuojant 3'-5' egzokleazę Nibbler (Nbr) (83). Ago3 katalizuojamas piRNR lokuso transkripto kirpimas sukuria naujos, originaliai piRNR tapачios sekos 5'-galą, kuri toliau yra surišama Aub baltymo ir galutinai subrandinama veikiant jau minėtai Nbr (82,83). Taip ping-pong ciklo metu vykdomas potranskripcinis genų raiškos slopinimas, tuo pačiu metu piRNR reguliuojamus transkriptus panaudojant papildomų piRNR gamybai (77). Ago3/piRNR kompleksai ne tik dalyvauja ping-pong cikle, bet ir inicijuoja nuo Zuc priklausomą piRNR biogenezę (84). Visų piRNR po Zuc kirpimo ar Nbr hidrolizės susidarę 3'-galai yra modifikuojami dalyvaujant **DmHen1 metiltransferazei** (5,7).

Pastarąjį dešimtmetį parodyta, jog piRNR yra būtinos ne tik lytinių ląstelių vystymuisi, bet turi ir papildomų funkcijų, žmogaus atveju susijusių su neuronų augimu, metaboline homeostaze, kamieninių ląstelių atsinaujinimu, vėžiu ir neurodegeneracinėmis ligomis (85,86).

1.1.2 Bakterinės mažosios reguliacinės RNR

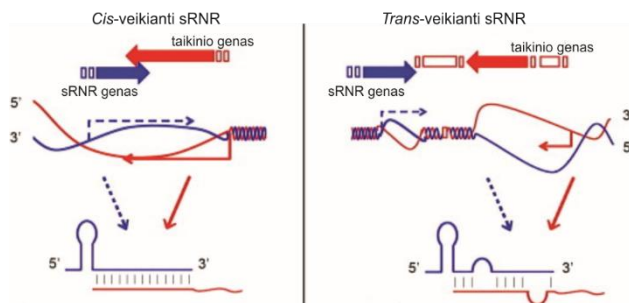
Bakterinės mažosios reguliacinės RNR, sRNR, – tai 50-500 nt ilgio RNR molekulės, sudarančios vieną didžiausių potranskripcinių reguliatorių grupių (32). Nors kol kas detalios ištytos yra tik kelių, daugiausia *Gram* neigiamų bakterijų, sRNR, manoma, kad vidutiniame bakterijos genome yra apie 100-300 mažųjų reguliacinių RNR (87). Kai kurios sRNR yra ekspresuojamos nuolat ir atlieka „namų ūkio“ funkcijas. Prie tokių sRNR priskiriamos tRNR brendime dalyvaujančio ribonukleoproteininio RNazės P komplekso RNR ar su sustojusiomis ribosomomis sąveikaujanti tmRNR (angl. *transfer-messenger*), pasižyminti transportinės ir informacinės RNR savybėmis (88). Tačiau didžioji dalis sRNR funkcionuoja tik tam tikromis sąlygomis ir tampa itin svarbios bakterijoms prisitaikant prie stresinių ar pasikeitusių mitybinių aplinkybių, užtikrina kvorumo pojūtį, moduliuoja biofilmų susidarymą, reguliuoja judrumo ir patogenezės mechanizmus (33).

1.1.2.1 sRNR veikimo mechanizmai

sRNR funkcionuoja sąveikaudamos su baltymais ar, dažniau, iRNR taikiniai. Viena sRNR gali reguliuoti net 1-2% visų iRNR transkriptų, ir atvirkščiai – su viena iRNR gali sąveikauti kelios mažosios reguliacinės RNR (89).

Šiuo metu žinomos vos kelios baltymus surišančios ir taip juos „nutitruojančios“ – nuo pagrindinių funkcijų atitraukiančios – sRNR, pavyzdžiui konservatyvios *Escherichia coli* 6S RNR ar CsrB ir CsrC sRNR. Ląstelėms pereinant į stacionarią augimo fazę, 6S RNR suriša σ^{70} -RNR polimerazės kompleksą, taip blokuodama jo sąveiką su nuo šio sigma faktoriaus priklausančiais promotoriais, taigi ir atitinkamų genų transkripciją (90). CsrB ir CsrC sRNR suriša iki keliolikos translacijos regulatoriaus CsrA homodimerų. Kadangi CsrA sąveikauja su GGA motyvą turinčiomis RNR, parodyta, jog ir kitos šią seką turinčios, tačiau paprastai iRNR taikinius surišančios sRNR, McaS ir GadY, taip pat gali sudaryti sąveikas su CsrA. Susidarant minėtiems kompleksams yra blokuojama CsrA sąveika su reguliuojamomis iRNR, o sRNR sąveikos su CsrA sritims persidengiant su taikinių iRNR molekulėms komplementariais regionais – slopinamas sRNR/iRNR dupleksų susidarymas (91).

Su iRNR taikiniais sąveikaujančios sRNR pagal jas koduojančio geno padėtį taikinio atžvilgiu yra išskiriamos į dvi grupes: *cis*-veikiančias (priešprasmines) ir *trans*-veikiančias sRNR (dar vadinamas *cis*- ir *trans*-koduojamomis sRNR; Pav. 1.4, 1.5) (92). *Cis*-veikiančios sRNR yra nuskaitomos nuo taikiniui komplementarios DNR grandinės, todėl bent dalimi sekos yra idealiai komplementarios taikinio iRNR. *Cis*-sRNR/iRNR sąveika gali sukelti iRNR degradaciją, blokuoti jos translaciją ar inicijuoti transkripcijos terminaciją. Parodyta, jog šios sRNR slopina transpozazių raišką, palaiko pastovų plazmidžių kopijų skaičių, funkcionuoja kaip I tipo toksino-antitoksino sistemos dalis ar, sąveikaudamos su policistroniniais transkriptais, selektyviai reguliuoja dalies jų genų raišką (93).

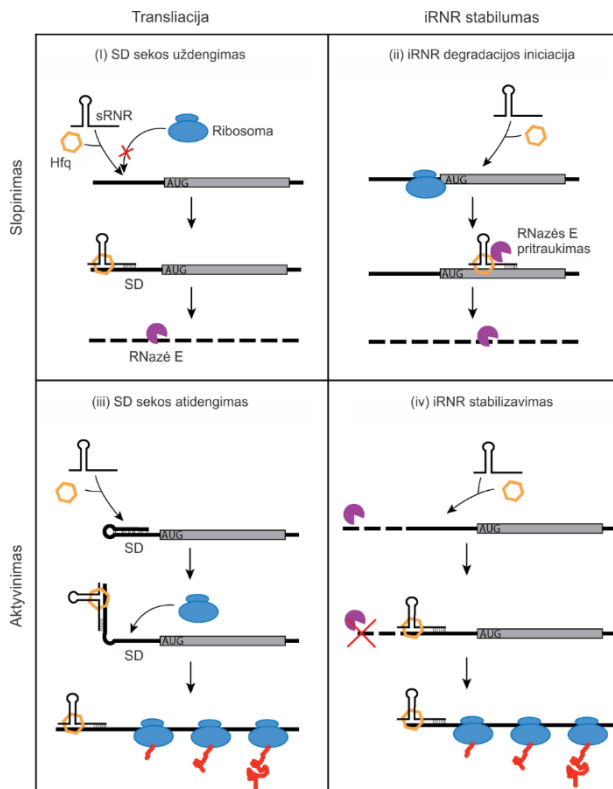


Pav. 1.4. *Cis*- ir *trans*-veikiančių sRNR genų padėtis taikinio geno atžvilgiu bei sąveika su jo iRNR. Modifikuota pagal (92).

Su iRNR taikiniu nesusijusioje genomo vietoje koduojamos *trans*-veikiančios sRNR yra tik dalinai komplementarios taikiniui ir sąveikauja su juo 7-12 nt apimančia sritimi, dažniausiai išsidėsčiusia nestruktūrizuotoje, lengvai pasiekiamoje sRNR dalyje (92) (Pav. 1.4). Būtent sąveikos su iRNR sritys išsiskiria didžiausiu konservatyvumu paprastai ne itin konservatyviose sRNR sekose. Dažniausiai sRNR sąveikauja su 5'-netransliuojama iRNR sritimi, tačiau gali jungtis ir prie koduojančios jos sekos ar 3'-UTR regiono (94). Priešingai nei taikiniui idealiai komplementarios priešprasminės RNR, *trans*-veikiančios sRNR neretai funkcionuoja kartu homoheksameriniu Hfq šaperonu. Hfq stabilizuoja mažąsias RNR bei, kartu prisijungdamas ir iRNR, katalizuoja sąveikos tarp šių molekulių susidarymą (95).

Išskiriami keturi pagrindiniai *trans*-veikiančių sRNR potranskripcinės iRNR reguliacijos mechanizmai: taikinių genų raiškos slopinimas arba aktyvinimas, reguliuojant iRNR stabilumą ar translaciją (Pav. 1.5). (i) iRNR translacijos iniciacija slopinama sRNR sąveikaujant su Šaino-Dalgarno (SD, angl. *Shine-Dalgarno*) sritimi ir blokuojant 30S ribosomos subvieneto prisijungimą. Neretai aktyvios translacijos neapsaugota iRNR yra

degraduojama. Degraduojant iRNR kartu degraduojamos ir kai kurios nekataliziškai funkcionuojančios sRNR. (ii) Tiesiogiai iRNR degradacija inicijuojama prie su iRNR sąveikaujančio sRNR/Hfq kompleksu prisijungus RNazei E. (iii) iRNR transliacija aktyvuojama sRNR sąveikaujant su SD seka blokuojančiomis iRNR sritimis. (iv) Taikinio iRNR yra stabilizuojama sRNR/Hfq kompleksui blokuojant RNazių vykdomą degradaciją, kartu paskatinant ir iRNR translacią (96,97). Tai, koks bus sRNR-iRNR sąveikos rezultatas, priklauso nuo abiejų RNR molekulių, jų tarpusavio sąveikos sričių ir pačios sąveikos stiprumo (98).



Pav. 1.5. *Trans*-veikiančių sRNR vykdomos potranskripcinės genų raiškos reguliacijos mechanizmai. Modifikuota pagal (96).

Šiuo metu parodyta, jog *trans*-sRNR gali funkcionuoti ir transkripciniame lygmenyje. Sąveikaudamos su sintetinama iRNR ir blokuodamos SD seką, sRNR gali paskatinti terminacijos faktoriaus Rho prisijungimą, taigi ir pačią transkripcijos terminaciją. Arba priešingai – aktyviai slopinti terminaciją, blokuodamos Rho sąveikos su iRNR sritį (99). Papildomai sRNR gali sudaryti sąveikas ne tik su iRNR, bet ir su kitomis sRNR, taip blokuodamos šių sRNR

sąveiką su jų taikiniais ir/ar skatindamos jų degradaciją (100). Nors sRNR paprastai laikomos nekoduojančiomis, pastaruoju metu identifikuojama vis daugiau ir su iRNR sąveikaujančių ir mažus reguliacinius baltymus koduojančių sRNR (87,101).

1.1.2.2 sRNR pasiskirstymas pagal jas koduojančių genų padėtį genome

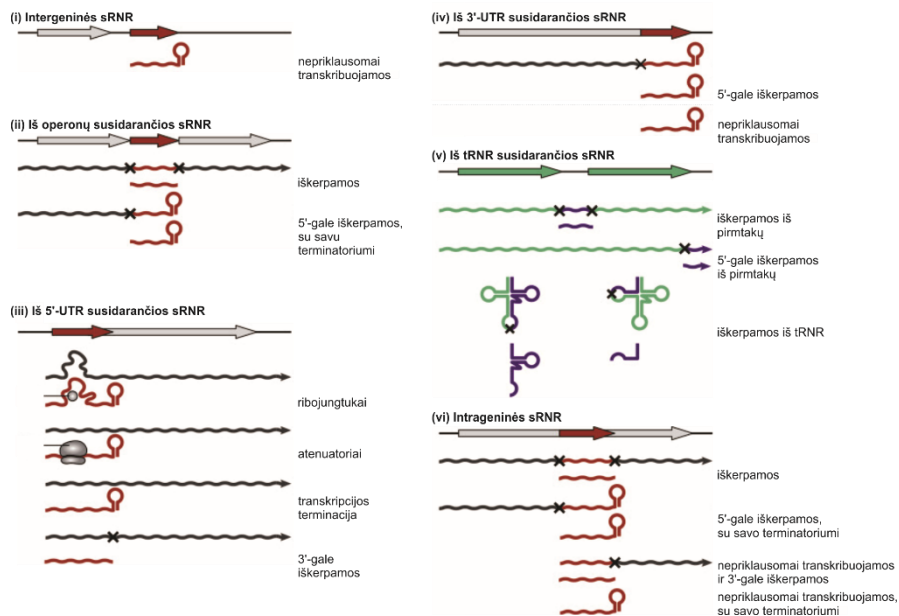
Trans-veikiančios sRNR pagal koduojamo geno padėtį genome skirstomos į 6 grupes: (i) intergenines, (ii) susidarančias iš operonų, (iii) 5'-UTR, (iv) 3'-UTR ar (v) tRNR ir (vi) intragenines sRNR (Pav. 1.6).

(i) Didžiausią dalį funkciškai charakterizuotų mažųjų reguliacinių RNR sudaro intergeninės sRNR. Jos yra nuskaitomos nuo savų promotorių ir dažnai turi nuo Rho nepriklausomus terminatorius. Šių sRNR transkripcija paprastai yra griežtai reguliuojama transkripcijos faktorių ar dviejų komponentų sistemų priklausomai nuo aplinkos signalų (102). Intergeninės *Caulobacter crescentus* ChvR sRNR raiška yra indukuojama ChvI-ChvR dviejų komponentų sistemos, kaip atsakas į DNR pažaidas, žemą pH ar minimalią augimo terpę, ir slopina išorinės membranos baltymo *chvT* iRNR raišką (103).

(ii) Iš policistroninių transkriptų iškerpamos intergeninės sRNR vadinamos iš operonų susidarančiomis mažosiomis reguliacinėmis RNR. Šių sRNR 5'-galas visada yra iškerpamas iš pradinio transkripto, o 3'-galas gali arba turėti savo transkripcijos terminatorių, arba taip pat būti iškerpamas RNazių pagalba. Pavyzdžiui, *Salmonella* SroC sRNR susidaro iš glutamato/aspartato ABC pernašos sistemą koduojančios *gltIJKL* iRNR jos 5'-galą iškerpant RNazei E ir operono transkripcijai sustojus prieš *gltJ* geną. SroC sRNR sąveikaudama su GcvB sRNR inicijuoja pastarosios degradaciją, taip paskatindama GcvB slopinamą aminorūgščių pernašos baltymų raišką (100).

(iii) Iš 5'-UTR susidarančios sRNR susidaro transkripcijos pradžioje įvykus nuo Rho priklausomai ar nepriklausomai terminacijai, arba yra iškerpamos iš iRNR transkriptų veikiant RNazėms. 5'-UTR srityse dažnai sutinkami *cis*-reguliaciniai elementai – ribojungtukai, RNR termometrai ar atenuatoriai, priklausomai nuo sąlygų generuojantys trumpus ir dažnai stabilus 5'-UTR apimančius transkriptus, taip blokuodami už jų koduojamų genų transkripciją. Parodyta, jog dalis tokių transkriptų funkcionuoja ir kaip savarankiškos *trans*-veikiančios sRNR. *Lysteria monocitogenes* AdoMet ribojungtukas, ląstelėje esant mažai AdoMet koncentracijai, sudaro antiterminatoriaus kilpą, įgalinančią už ribojungtuko esančio aminorūgščių ABC pernašos sistemos transkripciją. Tačiau, išaugus AdoMet koncentracijai, jis sąveikauja su ribojungtuku pakeisdamas šio konformaciją.

Antiterminatorinė kilpa yra destabilizuojama ir susidaro terminatoriaus struktūra, stabdanti transkripciją ir kartu slopinanti už ribojungtuko esančių genų raišką. Susidaręs ribojungtuką apimantis 229 nt ilgio transkriptas, vadinamas SreA, funkcionuoja kaip mažoji, *trans*-veikianti sRNR, ir slopina bakterijų virulentiškumo faktoriaus *prfA* iRNR stabilumą ir translacią (104). Dalis iš 5'-UTR susidaranti sRNR nėra susijusios nei su ribojungtukais, nei su antiterminatoriais. Pavyzdžiui, neseniai atrasta iš *chiP* iRNR 5'-UTR susidaranti ChiZ sRNR. ChiZ sąveikauja su kita mažąja ChiX sRNR, taip skatindama jos degradaciją. Savo ruožtu ChiX sRNR suriša *chiP*, inicijuodama šios iRNR degradaciją, taip susidarant abipusio reguliavimo kilpai (105).



Pav. 1.6. Pagrindiniai sRNR šaltiniai. Modifikuota pagal (102).

(iv) Iš 3'-UTR susidaranti sRNR gali būti nuskaitomos nuo savų promotorių ar iškerpamos iš pirminių transkriptų. Neretai šių sRNR ir jas koduojančių genų funkcijos būna susijusios. 58 nt ilgio CpxQ sRNR yra iškerpama iš *cpxP* iRNR. CpxP baltymas palaiko vidinės *Salmonella enterica* membranos homeostazę, netinkamą tretinę struktūrą įgijusius baltymus nukreipdamas degradacijai. RNazei E hidrolizuojant *cpxP* iRNR iš karto už Stop kodono, susidaro stabilus CpxQ transkriptas, slopinantis vidinės membranos stresą sukeliančių baltymų raišką (106). Iš 3'-UTR iškerpamos RNR neigiamu grįžtamuju ryšiu gali reguliuoti jas koduojančių iRNR

transkripciją. Iš *Vibrio cholerae* oligopeptidų pernašą reguliuojančius baltymus koduojančio oppABCDF-oppZ policistroninio transkripto 3'-UTR iškerpama OppZ sRNR sąveikauja su tarp *oppA* ir *oppB* esančia iRNR sritimi, taip blokuodama kotranskripciškai vykstančią oppB transliaciją ir inicijuodama nuo Rho priklausančią transkripcijos terminaciją (107).

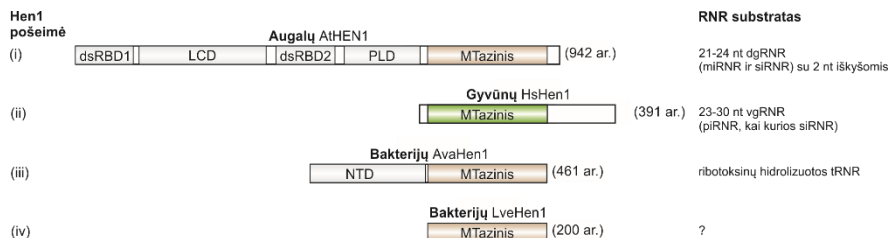
(v) Neseniai buvo atrasta ir nauja bakterijų mažųjų reguliacinių RNR klasė – tai iš pre-tRNR ir tRNR transkriptų susidaranti 15-60 nt ilgio sRNR (32). Pirmosios iš tRNR susidaranti sRNR funkcija buvo aprašyta tik 2015 metais nustačius, jog bręstant policistroninei glyW-cysT-leuZ pre-tRNR jos 3'-galinė dalis, vadinama 3'-ETS^{leuZ} yra iškerpama ir funkcionuoja kaip sRNR kempinė surišdama RyhB ir RybB sRNR, taip reguliuodama šių RNR koncentraciją (108). Kai kurios iš tRNR susidaranti sRNR, dar vadinamos tRNR fragmentais, tRF, susidaro hidrolizavus pačias tRNR. Parodyta, jog *Pseudomonas aeruginosa* metionino tRNR fragmentas tRF^{Met} 1-24 išorinės membranos pūslelėse yra pernešamas į žmogaus kvėpavimo takų ląsteles, kur reguliuoja interleukino-8 raišką (109).

(vi) RNR transkripcijos pradžios sričių (TSS, angl. *Transcription Start Sites*) ir 3'-galų sekoskaitos duomenys rodo, jog net trečdalis RNR transkriptų galėtų prasidėti ir baigtis koduojančių sekų viduje (105,110). Nepaisant didelio kiekio potencialių reguliacinių intrageninių RNR, šiuo metu yra nustatytos tik vienos jų *E. coli* FtsO sRNR funkcijos. Ši sRNR yra koduojama su ląstelės dalijimusi susijusio vidinės membranos baltymo *ftsI* atviro skaitymo rėmelyje. FtsO sąveikauja su ląstelės membranos streso indukuojama RybB sRNR, taip slopindama RybB inicijuojamą išorinės membranos porino *ompC* iRNR degradaciją. Tikėtina, jog reguliuodama RybB, FtsO funkcionuoja kaip mediatorius tarp ląstelės dalijimosi ir atsako į stresą moduliavimo (105).

1.2 Hen1 RNR metiltransferazės

Hen1 metiltransferazių šeima pasižymi konservatyviu metiltransferaziniu (MTaziniu) domenu, tačiau turi skirtingus papildomus domenus, pagal kuriuos yra išskiriamos į keturias pošeimes (Pav. 1.7) (3). (i) Pirmai pošeimei priskiriami dideli (810-970 ar.), iš kelių domenų sudaryti augalų baltymai su C-gale išsidėsčiusiu metiltransferaziniu domenu (4). (ii) Antrą pošeimę sudaro mažesnės gyvūnų Hen1 metiltransferazės (apie 400 ar.). Jų MTazinis domenas yra N-gale, o C-gale nustatoma mažiau konservatyvi, variabilus ilgio sritis (5–7). (iii) Trečiai pošeimei priskiriami Pnkp/Hen1 RNR reparacijos sistemą sudarantys bakteriniai Hen1 baltymai (460-500 ar.). Jų MTazinis domenas yra C-gale, o N-gale išsidėsto ligazę aktyvuojantis domenas (8). (iv) Ketvirtai, kol

kas detaliau netirtai Hen1 baltymų grupei, priskiriamos bakterinės Hen1 metiltransferazės, sudarytos tik iš MTazinio domeno. Manoma, jog skirtingoms pošeimėms priskiriami Hen1 baltymai galėjo atsirasti evoliucijos eigoje metiltransferaziniam domeniui susiliejančiam su papildomais, specifines funkcijas užtikrinančiais domenais (3).

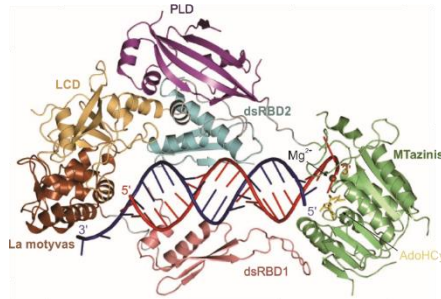


Pav. 1.7. Keturios Hen1 baltymų pošeimės ir jų modifikuojami RNR substratai. At – *Arabidopsis thaliana*, Hs – *Homo sapiens*, Ava – *Anabaena variabilis*, Lve – *Loktanelia vestfoldensis*; dsRBD1 ir dsRBD2 – pirmasis ir antrasis dvigrandinę RNR surišantys domenai (angl. double stranded RNA Binding Domain), LCD – La motyvą turintis domenas (angl. La-motif Containing Domain), PLD – į peptidilproolino izomerazę, PPIazę, panašus domenas (angl. PPIase-Like Domain), NTD – N-galinis domenas (angl. N-Terminal Domain), MTazinis – metiltransferazinis domenas. Modifikuota pagal (3).

1.2.1 Pirma pošeimė – didžiosios augalų HEN1 metiltransferazės

Pirmoji aprašyta ir detaliesiai ištirta buvo pirmai pošeimėi priskiriama baltažiedžio vairo *Arabidopsis thaliana* HEN1 metiltransferazė, AtHEN1. AtHEN1 modifikuoja 21-24 nt ilgio miRNR ir siRNR dupleksus (65). Šis RNR metilinimas nepriklauso nuo konkretaus galinio nukleotido (52) ir vyksta prieš vienai iš duplekso grandinių sudarant RISC kompleksą su Ago šeimos baltymais (Pav. 1.1, 1.2) (34). Fermentinis AtHEN1 specifiskumas yra nulemiamas RNR surišimo žingsnyje (52) N-gale išsidėsčiusių dgRNR surišančių dsRBD1, dsRBD2 (angl. double stranded RNA Binding Domain), LCD (angl. La-motif Containing Domain) ir paties metiltransferazinio domeno (Pav. 1.8) (4,50). Metilinimas apsaugo mažąsias RNR nuo HESO1 galinės nukleotidiltransferazės katalizuojamo uridilinio ir degradacijos, o kartu ir išaugusio miRNR ar siRNR slopinamų taikinių kiekio (111). Visuose augalo organuose ekspresuojamas AtHEN1 yra būtinas normaliam baltažiedžio vairo brendimui – baltymo raiškos nevykdantys augalai pasižymi pleotropiniais vystymosi sutrikimais – žemu ūgiu, mažesniais lapais ir žiedais, pakitusia skrotelės lapų forma, vėlyvu žydėjimu, sumažėjusiu

moteriškų ir vyriškų augalų vaisingumu dėl sutrikusių kuokelių ir piestelių funkcijų (112).



Pav. 1.8. AtHEN1 komplekso su dgRNR struktūra. Modifikuota pagal (4).

HEN1 homologai bei jų modifikuojamos mažosios RNR yra nustatytos ir pirmuonyse (konkrečiai žaliadumbliuose) bei kituose augaluose, pavyzdžiui, kukurūzuose ar azijiniuose ryžiuose *Oryza sativa* (111,113,114). Čia HEN1 homologas WAF1 metilina miRNR ir siRNR dupleksus, taip apsaugodamas juos nuo degradacijos. Sutrikus šio baltymo raiškai miRNR ir siRNR pailgėja, tikėtina yra uridilinamos, sumažėja bendras jų kiekis, sutrinka iRNR taikinių reguliacija. Kadangi, kaip ir AtHEN1, WAF1 yra ekspresuojamas visuose augalo organuose, baltymo trūkumas sukelia daugybinius – daigų, šaknų, lapų, žiedyno – vystymosi sutrikimus (9).

1.2.2 Antra pošeimė – gyvūnų Hen1 baltymai

Gyvūnų Hen1 metiltransferazės modifikuoja viengrandines mažąsias RNR – dažniausiai su Ago šeimos PIWI pošeimio baltymais sąveikaujančias 23-30 nt piRNR (5–7). Tikėtina, jog būtent Hen1-PIWI baltymų sąveika užtikrina substratinį, RNR surišančių domenų neturinčių, gyvūnų metiltransferazių specifiškumą (5,115).

Vaisinės muselės *D. melanogaster* DmHen1 metiltransferazė sąveikauja su PIWI baltymais ir *in vivo* metilina būtent jų surištas viengrandines piRNR (Pav. 1.3) (5) ir išskirtinai su AGO pošeimio Ago2 baltymu kompleksus sudarančias kreipiančiąsias siRNR (Pav. 1.2) ir miRNR grandines (7). Tai, jog būtų modifikuojamos subrandintos, funkcionalaus ilgio piRNR, su Ago3 ir Aub baltymais sąveikaujančių RNR atveju užtikrinama ląstelėje palaikant balansą tarp DmHen1 metiltransferazės ir RNR hidrolizuojančios Nibbler 3'-5' egzozuklezės veiklos (116). Parodyta, jog DmHen1 mutante sumažėja bendras modifikuojamų RNR kiekis, jos tampa trumpesnės, sutrinka piRNR taikinių slopinimas. Sėklidėse ir kiaušidėse ekspresuojamos DmHen1

trūkumas neturi įtakos *D. melanogaster* vaisingumui (5,7,116), tačiau tokios, aktyvaus baltymo nesintetinančios muselės trumpiau gyvena, yra pažeidžiamos jų smegenys (9).

Žmogaus HsHen1 metiltransferazės raiška vyksta ne tik lytinėse liaukose (sėklidėse), bet ir dar bent devyniuose skirtinguose audiniuose, ir priklauso nuo jų patologijos. Pavyzdžiui, nesmulkių ląstelių plaučių karcinomos ląstelėse HsHen1 raiška yra reikšmingai didesnė nei sveikuose plaučiuose (117). Taip plačiai ekspresuojama HsHen1 modifikuoja ne tik piRNR, bet ir dalį somatinių ląstelių miRNR, kurių metilinimo lygis skiriasi priklausomai nuo audinio tipo. Pavyzdžiui, miR-26a-5p yra modifikuojama sveikose, o vėžio progresavimą skatinanti miR-21-5p – nesmulkių ląstelių plaučių karcinomos ląstelėse. HsHen1 vykdomas metilinimas padidina miRNR afiniškumą Ago2 baltymui, apsaugo miRNR nuo 3'-5' egz nukleazės PNPT1 bei užtikrina miRNR reguliuojamų taikinių raiškos slopinimą (117).

Pelės mHen1 (angl. mouse) metiltransferazės yra ekspresuojamos sėklidėse ir modifikuoja čia aptinkamas tradicines bei iš ribosomų, mažųjų branduolio RNR ar tRNR susidarancias piRNR bei piRNR nepriskiriamus 31-33 nt ilgio tRNR fragmentus (6,10). mHen1 raiškos nevykdančiose ląstelėse piRNR sutrumpėja vidutiniškai vienu nukleotidu ir dvigubai išauga piRNR su papildomais nukleotidais (dažniausiai vienu U arba A) dalis, sumažėja bendras piRNR kiekis, sutrinka iRNR, transpozonų slopinimas, meiotinėse ląstelėse vykstant ankstyvai transkripcijai išauga DNR pažaidų kiekis, dėl sutrikusio spermatozoidų vystymosi bei mažesnio jų kiekio patinai tampa sterilūs (10,118,119). Naujausi tyrimai rodo, jog mHen1 raiška gali vykti ne tik sėklidėse, bet ir pelių plaučiuose, kuriuose baltymas modifikuoja bent vieną miRNR (117).

Zebražuvių Hen1 metiltransferazė yra ekspresuojama sėklidėse ir kiaušidėse, kur dėka C-galinės srities lokalizuojasi lytinių ląstelių granulėse. Šis baltymas yra būtinas oocitų, bet ne vyriškų lytinių ląstelių vystymuisi. Zebražuvių Hen1 vykdomas metilinimas apsaugo piRNR nuo uridilimo, degradacijos ir susilpnėjusio transpozonų slopinimo (11).

Kaip ir kitų gyvūnų Hen1 metiltransferazių atveju, apvaliosiose kirmelėse *Caenorhabditis elegans* HENN-1 metilina tik su konkrečiais AGO šeimos baltymais kompleksus sudarancias mažasias RNR. HENN-1 modifikuoja embrioninėse, bet ne suaugusių organizmų vyriškose ir moteriškose lytinėse ląstelėse esancias, su PIWI baltymu PRG-1 sąveikaujančias piRNR (jos *C. elegans* yra 21 nt ilgio ir prasideda U nukleotidu, todėl dar vadinamos 21U RNR), išskirtinai moteriškose lytinėse ląstelėse ir embrionuose sutinkamas 26G (26 nt ilgio, G nukleotidu prasidedančias) PIWI baltymo ERGO-1

surišamas endogenines siRNR ir su RDE-1 kompleksus sudarančias somatines egzogenines siRNR, bei tik šio baltymo surišamų miRNR ir endogeninių siRNR subpopuliacijas (120–122). Nors didesni HENN-1 kiekiai nustatomi embrionuose, metiltransferazė yra ekspresuojama visų amžių *C. elegans* individuose, hermafrodituose ir vyriškuose organizmuose, jų lytinėse ir somatinėse ląstelėse (120). Baltymas yra būtinas piRNR inicijuojamam su RDE-1 sąveikaujančių 22G RNR susidarymui viso apvaliosios kirmėlės gyvenimo ciklo metu (122), tačiau pačių piRNR stabilumas nuo HENN-1 suaugusiuose *C. elegans* individuose nebeprisiklauso (121,122). HENN-1 mutantuose sumažėja modifikuojamų mažųjų RNR kiekis, jos sutrumpėja, sutrinka iRNR taikinių reguliacija, palaiptiui mažėja individų lytinės ląstelės, jų vaisingumas, ~30 kartoje HENN-1 baltymo nesintetinančios *C. elegans* tampa visiškai sterilios (120–122).

Aktinijos *Nematostella vectensis* Hen1 homologas modifikuoja ne tik viengrandines piRNR, bet ir miRNR molekules, kurios šiuose duobagyviuose su iRNR taikiniiais dažnai sudaro beveik visiškai komplementarias sąveikas (123). HEN1 yra ekspresuojamas visame aktinijos kūne (124) ir modifikuoja piRNR bei miRNR viso *N. vectensis* gyvenimo ciklo metu. Trūkstant HEN1 sumažėja bendras mažųjų RNR kiekis, jos sutrumpėja, aktinijos vystymasis sustoja planulės stadijoje (123).

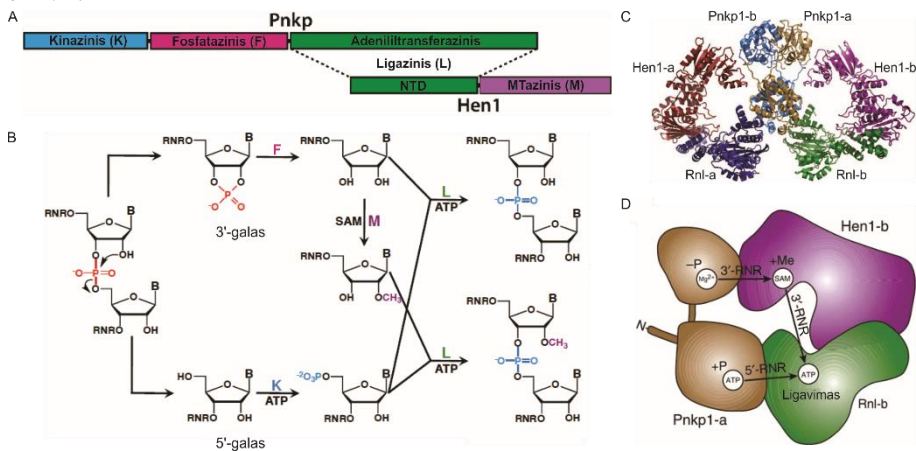
Antrajai Hen1 metiltransferazių pošeimei priskiriami ir pirmuonių *Trypanosoma brucei* bei *Tetrahymena thermophila* Hen1 baltymai. *T. brucei* Hen1 metiltransferazė modifikuoja siRNR (125), *T. thermophila* – lytinio dauginimosi (konjugacijos) metu ekspresuojamas ~28-29 nt ilgio mažas skenuojančias RNR – scnRNR (angl. *scan*). Vykstant konjugacijai *T. thermophila* mikrobranduoliai suformuoja naujus mikro ir makro branduolius. Formuojantis naujam makrobranduoliui pašalinama didelė dalis vidinių DNR sekų. Šiame gyvybingų palikuonių susidarymui būtiname procese ir dalyvauja scnRNR. ScnRNR sąveikauja su makrobranduolyje aptinkamu PIWI baltymu Twi1p. Būtent makrobranduolyje kaupiasi tik konjugacijos metu ekspresuojamas HEN1 homologas Hen1p. Hen1p sąveikauja su Twi1p ir po lydinčiosios grandinės pašalinimo metilina su Twi1p susijungusią kreipiančiąją scnRNR grandinę. Hen1p metilinimas palaiko stabilų scnRNR kiekį ir ilgį, užtikrina DNR pašalinimą, lytinių palikuonių susidarymą (115).

Kodėl augaluose metilinamos visos mažosios RNR, o gyvūnuose tik kai kurios jų grupės? Pirmiausia, svarbu pastebėti, jog visais atvejais modifikuojamos yra reguliuojamoms iRNR itin komplementarios mažosios nekoduojančios RNR. Pasak vienos teorijos, su visiškai komplementariu taikiniu sąveikaudama mažoji RNR ištraukia savo 3'-galą iš jį surišančio Ago

baltymo PAZ domeno ir, jei nėra metilinta, tampa neapsaugota nuo nukleotidiltransferazių ir egz nukleazių veiklos. Idealaus komplementarumo nebuvimas tarp gyvūnų miRNR ir jų iRNR taikinių nereikalauja pirmųjų metilinimo (119,126). Kita, taip pat įrodymais pagrįsta teorija, taikiniams komplementarių mažųjų RNR metilinimą ir jo suteikiamą apsaugą aiškina šių RNR sąveika su silpniau 3'-galą surišančiais Ago šeimos baltymais. Tokiuose, net ir su iRNR taikiniams nesąveikaujančiuose, mažųjų RNR/Ago baltymų kompleksuose tik metilintas mažųjų RNR 3'-galas yra apsaugotas nuo lengvai jį pasiekiančių bei degradaciją skatinančių baltymų poveikio (127).

1.2.3 Trečia pošeimė – bakterinės Hen1 metiltransferazės

Tarp bakterinių Hen1 metiltransferazių šiuo metu detaliausiai ištirti yra *Clostridium thermocellum* ir *Anabaena variabilis* baltymai – CthHen1 ir AvaHen1 – atitinkamai (3). Kaip ir didžioji dalis, maždaug 250-yje bakterijų rūšių aptinkamų Hen1 fermentų, jie yra koduojami tame pačiame operone su polinukleotidkinaze-fosfataze, Pnkp (Pav. 1.9 A) (128). Sąveikaudami abu baltymai sudaro Hen1/Pnkp kompleksą, gebantį susiūti ribotoksinų kirptą tRNR.



Pav. 1.9. Bakterinių Hen1 metiltransferazių sudaromi kompleksai ir jų funkcijos. A. *A. variabilis* Pnkp/Hen1 RNR reparacijos komplekso schema. NTD – N-galinis domenas (angl. *N-Terminal Domain*) B. Ribotoksinų hidrolizuotos RNR reparacijos schema. C. *C. gingivalis* Pnkp1-Rnl-Hen1 komplekso struktūra. D. Keturių aktyviųjų centrų, dalyvaujančių RNR reparacijoje, schema. A ir b žymi skirtingų monomerų baltymus. Modifikuota pagal (128).

Ribotoksinams hidrolizuojant tRNR, gaunami du RNR fragmentai su 3'-ciklofosfatu ir 5'-OH grupe trūkio galuose (Pav. 1.9 B). Prieš susiuvant šiuos RNR fragmentus Pnkp kinazinis domenas fosforilina 5'-galinį nukleotidą, o fosfatazinis pašalina 3'-ciklofosfatą palikdamas laisvą *cis*-diolį. Vis dėlto

trečiojo, adeniltransferaziniu aktyvumu pasižyminčio Pnkp domeno neužtenka dviejų RNR grandinių susiuvimui (8). Tam būtinas Hen1 N-galinis domenas kartu su Pnkp C-galiniu adenililtransferaziniu domenu sudarantis ligazės kišenę, talpinančią po du dviejų RNR grandinių nukleotidus ir AMP jos gale. Įprastą RNR susiuvimo reakciją sudaro trys žingsniai: (i) ligazės sąveika su ATP susidarant tarpiniam ligazės-AMP junginiui, (ii) AMP pernaša ant RNR 5'-fosfato ir (iii) ligazės katalizuojama 3'-OH grupės nukleofilinė ataka į 5'-fosfatą susidarant fosfodiesteriniam ryšiui. N-galinis Hen1 domenas yra būtinas trečiam susiuvimo reakcijos etapui bei padidina antro žingsnio efektyvumą (8,129). Privalomas Hen1 metiltransferazės dalyvavimas tRNR susiuvimo procese užtikrina, jog defosforilintas RNR 3'-galas prieš susiuvimą būtų papildomai metilinamas Hen1 metiltransferaziniame domene, taip apsaugant tRNR nuo pakartotinos ribotoksinų hidrolizės ankstesnio trūkio vietoje (8).

Dešimtyje bakterijų rūšių, tarp jų ir *Capnocytophaga gingivalis*, sutinkama kiek kitokia sistema, susidedanti iš trijų baltymų – Pnkp1, pasižyminčios kinaziniu ir fosfataziniu aktyvumu, ligazinį domeną turinčios Rnl ir Hen1 metiltransferazės (Pav. 1.9 C, D). Pnkp1 ir Rnl baltymai yra koduojami viename operone, o Hen1 išsidėsto kitoje, nutolusioje genomo vietoje. Sąveikaudami tarpusavyje trys baltymai sudaro heterotrimerą su rombo formos centrine anga, turinčia keturis aktyviuosius centrus. Pnkp dimerizuojantis susidaro heteroheksamerinis kompleksas. Kiekvienas Rnl monomeras šiame komplekse sąveikauja su vienu Pnkp1 monomeru, o kiekvienas Hen1 monomeras sudaro sąveikas su abiem Pnkp1 monomerais. Būtent heteroheksamerinėje struktūroje palankiausia orientacija išsidėsto vieno heterotrimerio kinazinis ir fosfatazinis bei kito metiltransferazinis ir ligazinis aktyvieji centrai. Toks aktyviųjų centrų išsidėstymas, kuomet metiltransferazinis domenas įsiterpia tarp fosfatazinio ir ligazinio, bei santykinai nedidelė vidinė žiedo erdvė, kurioje daugeliu atveju turėtų pritrūkti vietos RNR 3'-galo judėjimui nuo fosfatazinio tiesiai prie ligazinio domeno, papildomai užtikrina susiuvamos RNR 3'-galo metilinimą (128).

1.2.4 Katalizinės Hen1 metiltransferazių savybės

Kaip katalizuojama Hen1 vykdoma reakcija buvo nustatyta išsprendus pirmoms trimis pošeimėms priklausančių Hen1 metiltransferazių ar tik jų katalizinių domenų struktūras ir patvirtinus konkrečių aminorūgščių svarbą biocheminiais eksperimentais. Pagrindinės įžvalgos buvo gautos nustačius pilno ilgio AtHen1 (kartu su kofaktoriaus AdoMet hidrolizės produktu S-adenozilhomocisteinu, AdoHcy, ir dgRNR) struktūrą, kurią papildė MTazinių

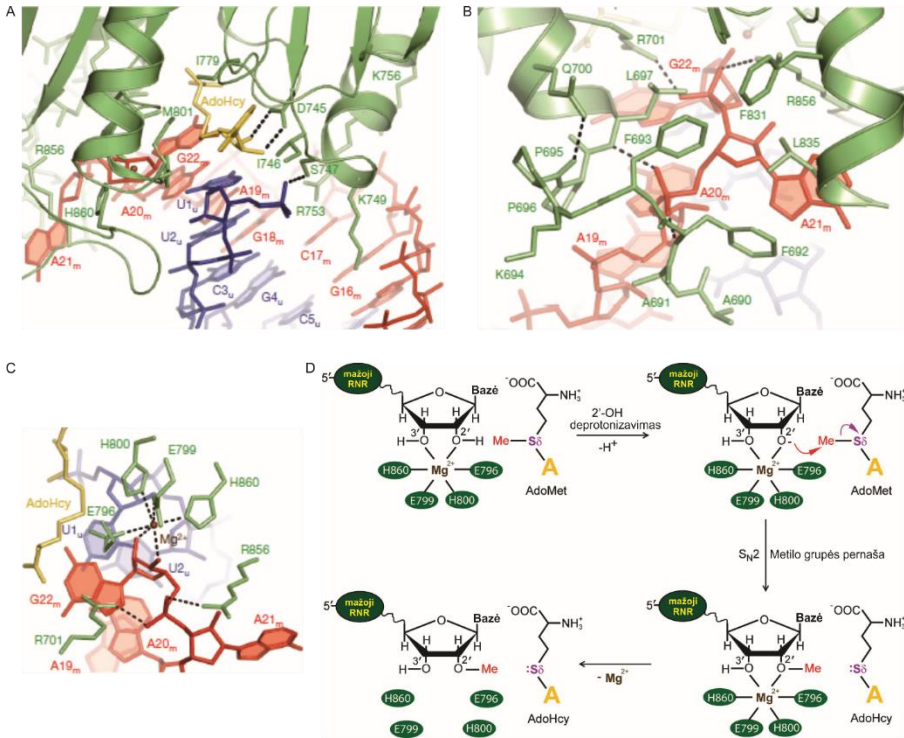
HsHen1, CthHen1 ir AvaHen1 domenų (iškristalintų su AdoHcy) analizė. Remiantis šiais struktūriniais tyrimais, buvo nustatyta, kad pirmos klasės nuo AdoMet priklausančių metiltransferazių šeimai priskiriamą Hen1 metiltransferazės MTazinį domeną sudaro 7-8-ios β -klostės, apsuptos 5-10 α -spiralių (4,10,130). Parodyta, jog itin dideliu konservatyvumu pasižymi ne tik Hen1 šeimos fermentų MTazinio domeno pirminė aminorūgščių seka, bet ir tretinė struktūra – palyginus AtHEN1 ir AvaHen1 bei AtHEN1 ir HsHen1 MTazinių domenų C α atomų išsidėstymą erdvėje, buvo nustatyta, jog abiem atvejais vidutinis kvadratinis nuokrypis tarp šių domenų porų tesiekia 1.4 Å (3,10).

Su hidrolizuotu AdoMet kofaktoriumi Hen1 MTazinis domenas sąveikauja sudarydamas vandenilinius ryšius su AdoHcy karboksigrupe, riboze bei adeninu, ir hidrofobines sąveikas su indolo žiedu (Pav. 1.10 A) (10). sgRNR surišančio AtHEN1 struktūroje AdoHcy ribozė išsidėsto tiesiai virš pirmojo nemodifikuojamos grandinės nukleotido tarp jų susidarant stekingo sąveikai (4). Pakeitus AdoHcy surišime dalyvaujančias konservatyvias aminorūgštis, pavyzdžiui, CthHen1 vandenilinius ryšius su ribozės OH grupėmis sudarantį D316 (D745 AtHen1 baltyme, atitinkamai) prarandamas MTazinis baltymo aktyvumas (131).

Nemodifikuojamos miRNR grandinės 5'-fosfato grupė AtHEN1 sudaro vandenilinius ryšius su S747 šonine grandine (Pav. 1.10 A). Šią sąveiką sustiprina su dgRNR substrato didžiuoju grioviu sąveikaujančios konservatyvių K749, R753 ir K756 šoninės grandinės. Visos keturios paminėtos aminorūgštys yra konservatyvios tik augalų HEN1 baltymuose, kas rodo, jog tik šios metiltransferazės yra prisitaikiusios atpažinti dgRNR substratus (4). Tai, jog ne tik papildomi dgRNR surišantys domenai nulemia AtHEN1 substratinį specifiškumą, patvirtina modifikavimo eksperimentai atlikti su tik iš MTazinio AtHEN1 domeno sudarytu baltymo. Kaip ir pilno ilgio AtHEN1, tik iš MTazinio domeno sudarytas fermentas praktiškai nemodifikuoja vgRNR (51).

F692-Q700 aminorūgštis apimanti MTazinio domeno sritis įtvirtina du paskutinius modifikuojamos grandinės nukleotidus, sudarydama vandenilinius ryšius su fosfodiesteriniu karkasu (Pav. 1.10 B). Didžioji dalis šių ar. yra konservatyvios visuose Hen1 homologuose, tad, tikėtina, užtikrina ir kitų Hen1 baltymų sąveiką su RNR substratu (4). Iš tiesų, HsHen1 1-30 ar. delecija, atitinkanti AtHEN1 692-697 pozicijose esančias aminorūgštis, drastiškai sumažina baltymo aktyvumą (10). Iki 4% nukrenta ir CthHen1 MTazinis aktyvumas aptariamose srityje esantį leuciną (L697 AtHEN1) pakeitus alaninino aminorūgštimi (130). Priešpaskutinis modifikuojamos

grandinės nukleotidas yra išsukamas ir sudaro stekingą sąveiką su pora konservatyvių ar., R856 ir L835, o paskutinis yra įsukamas atgal ir AtHEN1 atveju išsidėsto virš paskutinės dgRNR bazių poros (Pav. 1.10 B) (4).



Pav. 1.10. AtHEN1 MTazinio domeno sąveika su RNR ir jos metilinimas. A. MTazinio domeno sąveika su AdoHcy ir nemodifikuojama RNR grandine. Modifikuojamos RNR grandinės nukleotidai pažymėti „m“, nemodifikuojamos – „u“ raide. B. MTazinio domeno sąveikos, sudaromos su paskutiniais modifikuojamais grandinės nukleotidais. C. Mg²⁺ koordinacinės sąveikos aktyviajame MTazinio domeno centre. D. Siūlomas nuo Mg²⁺ jonų priklausomo AtHEN1 vykdomo 2'-O-ribozės metilinimo mechanizmas. Modifikuota pagal (4).

Tai, jog tarp paskutinių modifikuojamos RNR grandinės bazių ir MTazinio domeno nėra vandenilinių ryšių, patvirtina nuo sekos nepriklausomą AtHEN1 aktyvumą (52). Vis dėlto šiuo metu ištirtų antros ir trečios pošeimės Hen1 metiltransferazių efektyvumas nuo modifikuojamo substrato 3'-galinio nukleotido – CthHen1 fermento aktyvumas 3'-galinio nukleotido atžvilgiu išsidėsto tokia eile G >> U > A ≈ C (132), o pelės mHen1 – A > C > U > G (6). Paskutinio nukleotido fosfodiesterinio karkaso fosfatas, dėka dviejų arginino liekanų, R856 ir R701, taip pat įtvirtinamas metiltransferaziniame domene (Pav. 1.10 B). Šios, visuose HEN1 homologuose aptinkamos argininių poros mutacijos slopina AtHEN1

aktyvumą. Atitinkamų arginino mutacija CthHen1 – visiškai inaktyvuoja metiltransferazę (130,132).

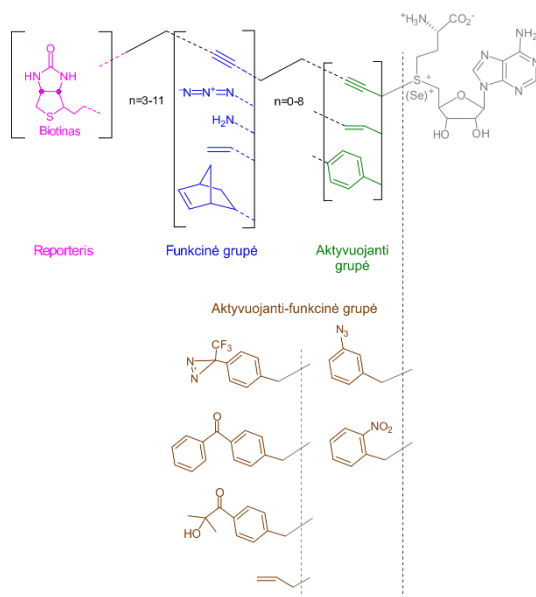
Metiltransferazės aktyviajame centre modifikuojamos RNR grandinės 3'-galinio nukleotido 2'-OH ir 3'-OH grupių pagalba yra koordinuojamas fermento vykdomai reakcijai būtinas metalo jonas (Pav. 1.10 C). Metalo jono poreikis išskiria Hen1 fermentus iš kitų šiuo metu aprašytų RNR 2'-O-metiltransferazių. Vis dėlto, koks metalo jonas užtikrina Hen1 vykdomą katalizę, atrodo, priklauso nuo konkrečios pošeimės ar net konkretaus baltymo – AtHEN1 kataliziniui aktyvumui būtini Mg^{2+} jonai (4). Žmogaus metiltransferazės efektyviau modifikuoja RNR substratą mišinyje esant Mn^{2+} , o ne Mg^{2+} jonams (10). Mn^{2+} užtikrina ir bakterinės Hen1 katalizinį aktyvumą, o, reakcijos mišinyje esant Mg^{2+} jonų, fermentas tampa visiškai neaktyvus (131). Metalo joną koordinuojančios dvi glutamato (E796, E799) bei dvi histidino liekanos (H800, H860) yra konservatyvios visose metiltransferazių pošeimėse. Tikėtina, jog H860 galėtų būti bendrąja baze RNR metilinimo reakcijoje ir deprotonizuoti 2'-OH grupę, taip inicijuodamas S_N2 tipo nukleotiflinio pakeitimo reakciją 2'-OH grupės deguoniui atakuojant metilo grupę (Pav. 1.10 D). Metalo joną koordinuojančių aminorūgščių mutacijos visiškai panaikina MTazinį AtHEN1 (4) ir CthHen1 (130,132) bei sumažina HsHen1 aktyvumą (10). Hen1 struktūrose be RNR substrato nėra ir metalo jono, kurio koordinacijai, kaip minėta, būtinos RNR 2'-OH ir 3'-OH grupės. Būtent šių grupių poveikis ir apsprendžia Hen1 metiltransferazių substratinį specifiškumą – modifikuojami yra tik 3'-galiniai RNR nukleotidai (3).

Nors išvardinti struktūriniai faktoriai, atrodytų, gana griežtai apibrėžia Hen1 substratinį specifiškumą, *in vitro* sąlygomis metiltransferazės gali modifikuoti kur kas platesnį RNR substratų spektrą. Pavyzdžiui, pradiniai biocheminiai eksperimentai ir struktūrinės analizės metu nustatytos baltymo-RNR sąveikos patvirtino *in vivo* stebimą AtHEN1 polinkį efektyviausiai modifikuoti 21-24 nt ilgio dviejų nukleotidų iškyšas turinčius RNR substratus (4,65). Vis dėlto tikėtina, jog ląstelėje būtent šių RNR modifikacija yra užtikrinama kitų su mažosiomis RNR sąveikaujančių baltymų, mat parodyta, jog *in vitro* AtHEN1 gali modifikuoti ir iškyšų neturinčius RNR/RNR ar net RNR/DNR dupleksus (19). Į CthHen1 aktyvųjų centrą, remiantis modeliavimo duomenimis, patenka du viengrandinės RNR nukleotidai (130). Tačiau šis fermentas modifikuoja ne tik viengrandines 12-24 nt RNR, bet ir dvigrandines struktūras sudarančias, išsikišusį, buką ar net įtrauktą 3'-galą turinčias RNR (132,133). Tai, jog gyvūnų ir pirmuonių Hen1 metiltransferazės ląstelėje modifikuoja konkretaus ilgio RNR, tikėtina taip pat užtikrina jų sąveika su papildomais baltymais. Parodyta, jog *in vitro* šie fermentai gali modifikuoti

už natūralius substratus trumpesnes ir ilgesnes 16-40 nt, tačiau išskirtinai viengrandines RNR molekules (5–7,115,116,134–136).

1.3 RNR metiltransferazių pritaikymas RNR žymėjimui

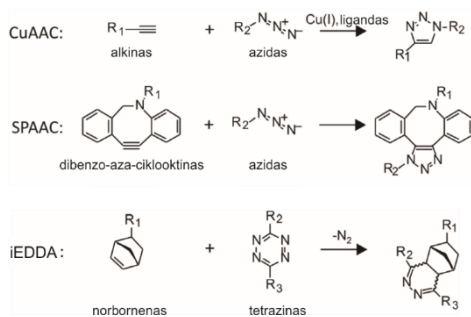
Metiltransferazės, galinčios panaudoti sintetinius AdoMet analogus, t. y. pernešti ne tik metilo, bet ir ilgesnes šonines grupes, yra pritaikomos chemofermentiniam biomolekulių žymėjimui (Pav. 1.11). Kai kuriais atvejais tokiam pritaikymui prireikia aktyviojo centro mutagenezės, įgalinančios efektyvesnę šoninės grupės pernašą, ar net padidinančios metiltransferazės selektyvumą sintetinio kofaktoriaus atžvilgiu (16). Savo ruožtu, efektyvią RNR modifikaciją užtikrinantys AdoMet analogai turi vadinamą „aktyvuotą“ pernešamą grupę su nesočiuoju ryšiu šalia reaktyviojo anglies atomo, kuris stabilizuoja tarpinę reakcijos būseną, taip paskatindamas galutinio produkto susidarymą (137). Dalyje kofaktorių sieros atomas yra pakeičiamas selenu, stabilizuojančiu patį kofaktorių ir, kai kuriais atvejais, padidinančiu reakcijos efektyvumą dėka silpnesnio seleno-reaktyviosios anglies ryšio (138).



Pav. 1.11. RNR žymėjimui naudojamų AdoMet analogų įvairovė. Modifikuota pagal (139).

Chemofermentinis RNR žymėjimas veikiant metiltransferazei paprastai susideda iš dviejų žingsnių. Pirmojo metu metiltransferazės pagalba nuo AdoMet analogo ant RNR yra pernešama bioortogonali funkcinė grupė, prie kurios sekančiame žingsnyje, dažnai *click* reakcijų pagalba, yra prijungiama reporterinė molekulė (12). *Click* reakcijos – tai stereoselektyvios, greitos,

švelniomis sąlygomis (kambario temperatūroje) vykstančios cheminės reakcijos, pasižyminčios didelėmis išeigomis vandeniniuose tirpaluose. RNR žymėjimui naudojamos bioortogonaliai – su biologiniais procesais neinterferuojančios – ir, pageidautina, biosuderinamos (netoksiškos) *click* reakcijos. Pačios populiariausios yra trys šių reakcijų grupės (Pav. 1.12): vario (I) jonų katalizuojamos azidų-alkinų ciklo prijungimo reakcijos (CuAAC), vykstančios tarp galinių azidų ir galinių alkynų, vario (I) jonų nekatalizuojamos įtempto žiedo AAC reakcijos (SPAAC, angl. *Strain-Promoted AAC*), vykstančios tarp galinių azidų ir įtempto ciklooktano žiede esančio alkino, ir invertuoto elektronų poreikio Dielso-Alderio reakcijos (iEDDA, angl. *inverse Electron-Demand Diels-Alder*), vykstančios tarp tetrazino ir įtempto alkeno (13). Dviejų žingsnių RNR žymėjimo reakcijomis apjungiamas aukštas fermentinis specifiskumas ir platus cheminių grupių pasirinkimas. Didelis kai kurių RNR metiltransferazių substratinis labilumas įgalina ir greitesnes, vieno žingsnio reakcijas, RNR molekules iš karto pažymint norima reporterine grupe. Neturint fermentinių apribojimų pagrindinis pastarosios prieigos minusas – mažesnis reporterinių grupių pasirinkimas, lyginant su dviejų žingsnių reakcijomis (12).



Pav. 1.12. Dažniausiai RNR žymėjimui naudojamos *click* reakcijos. Modifikuota pagal (140).

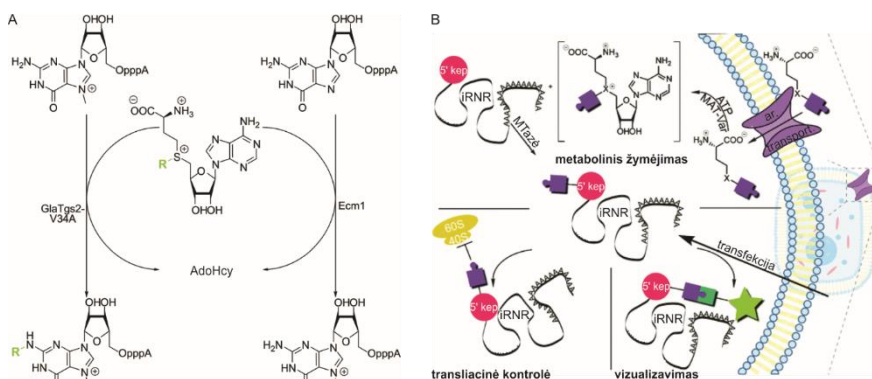
RNR žymėjimas metiltransferazėmis įgalina jos vizualizavimą, praturtinimą, charakterizavimą ar net kiekybinį įvertinimą, genų raiškos reguliavimą, viduląstelinės lokalizacijos nustatymą, sąveikų su baltymais identifikavimą, padeda nustatyti ir tirti RNR modifikacijas. Plačias perspektyvas atveria potranskripcinis metabolinis žymėjimas pasiekiamas ląsteles auginant terpėje su metionino analogais, iš kurių veikiant metionino adenziltransferazei (MAT) yra susintetinami AdoMet analogai. Analizuojant RNR gyvoje ląstelėje, metabolinis žymėjimas išsprendžia žemo membranų laidumo AdoMet analogams ir mažo jų stabilumo (šiuo atveju susintetinti AdoMet analogai yra iš karto sunaudojami) problemas (141).

1.3.1 Informacinės RNR kepurę modifikuojančios RNR metiltransferazės

5'-5'-trifosfatinis ryšius prie eukariotinių iRNR 5'-galo prijungta m⁷G modifikacija, dar vadinama iRNR kepure, apsaugo RNR nuo degradacijos, yra būtina tiksliai RNR splaisingui, pernašai iš branduolio į citoplazmą, transliacijos užtikrinimui. Taigi, iRNR kepurės žymėjimas galėtų pasitarnauti minėtų iRNR funkcijų reguliavimui ir nustatymui, iRNR sekimui ir lokalizacijai ląstelėje. Tam šiuo metu bandoma pritaikyti dvi RNR metiltransferazes – *Gardia lambia* trimetilguanozino sintetazės variantą GlaTgs2-V34A, modifikuojantį m⁷G kepurę N2 pozicijoje (20), ir *Encephalitozoon cuniculi* Ecm1 iRNR kepurės guanino N7 metiltransferazę (142) (Pav. 1.13 A). Didžiąją dalį su šiais fermentais atliktų eksperimentų šiuo metu sudaro jų pritaikomumo *in vitro* demonstracijos su plačiu spektru skirtingų funkcinių grupių turinčių AdoMet analogų. Pavyzdžiui, parodyta, jog *in vitro* ląstelių lizatuose GlaTgs2-V34A ir Ecm1 modifikuoja kepurės analogus – m⁷GpppA ir GpppA dinukleotidus – bei m⁷G ir G kepurės turinčias RNR, atitinkamai, alkeno, alkino, azido funkcinės grupės turinčiomis pernešamomis grandinėmis, prie kurių sekančiame etape pasitelkiant CuAAC, SPAAC ar iEDDA reakcijas gali būti prijungiamas biotinas ar pasirinktas fluoroforas (20,142–148). Tik iš G nukleotido sudaryta kepurė gali būti modifikuojama ir abiem fermentais – pirmiausia Ecm1, tada GlaTgs2-V34A (šis baltymas toleruoja ne tik metilo, bet ir didesnes grupes guanino N7 pozicijoje) susidarant N2, N7-dialilmodifikuotam produktui. Pastaroji reakcija gali būti atliekama viename mėgintuvėlyje su žmogaus metionino adenziltransferazės variantu (MAT-Var) tuo pat metu sintetinančiu AdoMet analogą iš atitinkamų metionino pirmtakų (Pav. 1.13 B, metabolinis žymėjimas). Dviem vienodomis funkcinėmis grupėmis modifikuota RNR gali būti vizualizuojama ir identifikuojama kur kas didesniu jautrumu. O iRNR kepurę modifikavus skirtingomis grupėmis, ji gali būti sekama Försterio rezonansinės energijos pernašos, FRET (angl. *Förster Resonance Energy Transfer*), pagalba, ar turėti visiškai skirtingas reporterines grupes, pavyzdžiui, – biotiną ir fluoroforą. Dvi skirtingas modifikacijas turintis iRNR kepurės analogas N2-propinil-N7-azido-GpppG yra panaudojamas ir *in vitro* transkripcijos reakcijose (149).

Siekiant pademonstruoti aprašytų modifikacijų pritaikomumą, HeLa ląstelės buvo transfekuotos Ecm1 modifikuota N7-azidobut-2-enil-eGFP iRNA, kuri SPAAC reakcijos metu buvo pažymėta fluorescuojančiu sulforodaminu B, SRB (Pav. 1.13 B, vizualizavimas) (142). Pritaikant Ecm1 iRNR funkcijos tyrimams, buvo parodyta, jog iRNR kepurės modifikavimas

gali būti panaudotas ir iRNR-baltymų sąveikos nustatymui – aril-azidu ar aziridinu modifikuota RNR buvo susiūta su prie kepurės prisijungiančiu translacijos iniciacijos veiksniu eIF4E (147). Siekiant reguliuoti RNR funkcijas ląstelėje, iRNR kepurė, dalyvaujant Ecm1, buvo modifikuota benzeno žiedą turinčiomis šviesai jautriomis grupėmis, pašalinamomis molekules apšvietus 365 nm ilgio banga (Pav. 1.13 B, translacinė kontrolė) (151,152). Buvo parodyta, jog šviesai jautrios grupės pašalinimas ir po jos sekantis kepurės metilinimas, veikiant Ecm1, atstato iRNR sąveiką su translacijos iniciacijos faktoriumi eIF4E ir kepurę nuimančiu baltymu DcpS (152). Siekiant vienu metu reguliuoti keletą iRNR molekulių ir išvengti modifikuotų RNR sintezės, buvo sukurtas ir alternatyvus iRNR raiškos moduliavimo metodas. Ecm1 aktyviojo centro tirozinas buvo pakeistas jo analogu su šviesai jautria orto-nitro-benzilo grupe. Pridėjus tokio baltymo į *in vitro* translacijos mišinį kartu su GpppG-iRNR, baltymo sintezė buvo aktyvuota tik apšvietus 365 nm banga, taip „įjungiant“ Ecm1 metiltransferazę, modifikuojančią kepurės guaniną N7 pozicijoje, būtinoje translacijos iniciacijai (153).



Pav. 1.13. GluTgs-V34A ir Ecm1 metiltransferazių pritaikymas RNR žymėjimui. A. RNR kepurės metiltransferazių vykdomos reakcijos. R – CH₃ ar didesnė pernešama grupė. B. Chemofermentinio RNR žymėjimo ląstelėje galimybės. Parengta pagal (150).

1.3.2 Vidinės RNR metiltransferazės

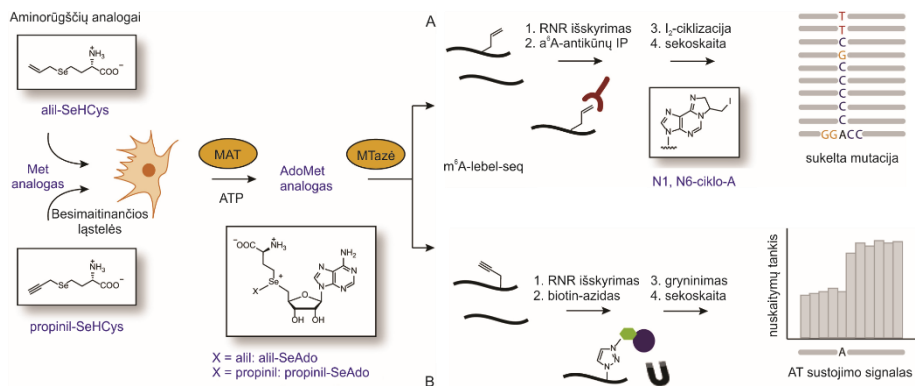
Iš maždaug 170 Modomics duomenų bazėje užregistruotų RNR modifikacijų didžiąją dalį sudaro būtent vidinės RNR modifikacijos (1). Atitinkamai, šias modifikacijas užtikrinančių metiltransferazių pritaikymas galėtų suteikti daugiausiai informacijos apie nuo metilino priklausomus biologinius procesus. Vidinių RNR taikinių analizei ir žymėjimui šiuo metu yra pritaikytos trys fermentų klasės – tai tRNR, mažųjų branduolėlio RNR

(snoRNR, angl. *small nucleolar*) ir N6-metiladenozino m⁶A metiltransferazės (17,18,21).

Pyrococcus furiosus tRNR^{Phe}:m²G26 ir *P. abyssi* tRNR:m²G10 metiltransferazės Trm1 ir Trm11, atitinkamai, pirmosios buvo panaudotos RNR žymėjimui alkiną turinčia funkcinė grupė ir tolimesniam jos vizualizavimui prijungus fluoroforą (17). Potencialiai plačiai pritaikomas programuojamas RNR žymėjimas buvo atliktas pasitelkus *P. abyssi* C/D dėžutės ribonukleoproteininį kompleksą, specifiskai modifikuojantį RNR substratą ribozės 2'-O-pozicijoje. Keičiant kreipiančiosios RNR seką komplekso metiltransferazė buvo nukreipta į skirtingas tRNR ir iRNR pozicijas, kurias RNR mišinyje modifikavo nuo sintetinio kofaktoriaus analogo pernešdama galinį alkiną turinčias šonines grandines. Taip pažymėta RNR vėliau buvo vizualizuota *click* reakcijos pagalba prijungus fluoroforą (18).

Bene daugiausiai naujų RNR žymėjimo bei analizės metodų šiuo metu yra sukurta atliekant m⁶A RNR metiltransferazių ir jų taikinių tyrimus (21,154–157). Žmogaus m⁶A RNR metiltransferazių heterodupleksas METTL3/METTL14 katalizuoja RNR adenino metilinimą N6 pozicijoje susidarant m⁶A. Tai dažniausia eukariotinių iRNR modifikacija, užtikrinanti genų raiškos reguliaciją ir susijusi to tokiais svarbiais biologiniais procesais kaip neuronų vystymasis, ląstelių diferenciacija, cirkadiniai ritmai bei įvairios patologijos, įskaitant ir vėžį (158). Vis dėlto, m⁶A modifikacija yra sunkiai identifikuojama dėl jos cheminio inertiškumo ir mažo poveikio atvirkštinei transkriptazei (kopijinės DNR (kDNR) sintezė nei sustoja ties šia modifikacija, nei jos sekoje yra įvedamos mutacijos). Tačiau tai pasikeičia metilų pakeitus didesnėmis, fermentų veiklą apribojančiomis modifikacijomis. Pavyzdžiui, buvo parodyta, jog METTL3/METTL14 heterodupleksas gali pernešti alilo grupę nuo sintetinio AdoMet analogo ant RNR substrato susidarant N6-aliladenozinui, a⁶A (Pav. 1.14 A). Pastarajam reaguojant su jodu susidaro N1, N6-ciklinis adenozinai, kurio vietoje 7 iš 10 kartų atvirkštinė transkriptazė įterpia ne T, o A/G ar C nukleotidus. Analizuojant sekoskaitos duomenis mutacijas turinčios sritys yra interpretuojamos kaip a⁶A pozicijos – METTL3/METTL14 taikiniai (21). Toks METTL3/METTL14 taikinių nustatymo metodas, pridėjus papildomą a⁶A taikinių praturtinimą antikūnais, pavadintas m⁶A-label-seq, buvo pritaikytas žmogaus HeLa, HEK293T ir pelės H2.35 ląstelių m⁶A sekoskaitai (Pav. 1.8 A). Šias ląsteles auginant terpėje su *Se*-alil-L-selenohomocisteinu (alil-SeHCys), jose susintetintas AdoMet analogas buvo panaudotas RNR žymėjimui alilo grupė bei a⁶A modifikaciją turėjusių RNR ir konkrečių

nukleotidų identifikavimui. Įdomu pastebėti, jog autoriai teigia, kad jų eksperimento metu alilo grupė nebuvo pernešta ant kitų dažnai metilnamų nukleotidų, t. y. AdoMet analogai buvo naudojami tik METTL3/METTL14 heterodimero (154).



Pav. 1.14. Metabolinis RNR žymėjimas ląstelėms mintant metionino analogais. A. Atvirkštinės transkripcijos mutacijos sukeliančio m⁶A-label-seq schema. Alil-SeHCys – Se-alil-L-selenohomocisteinas, propinil-SeHCys – Se-propinil-L-selenohomocisteinas. IP – imunoprecipitacija. B. Atvirkštinę transkripciją (AT) sustabdantis RNR modifikavimas alilgrupe. Modifikuota pagal (12).

Reikšmingų rezultatų buvo pasiekta ir METTL3/METTL14 kompleksui adeniną N6 pozicijoje modifikavus propinilgrupe (Pav. 1.13 B). Prie propinilRNR per *click* reakciją prijungus biotiną ir imobilizavus ant streptavidinu dengtų magnetinių dalelių, 68% atvejų kDNR sintezė sustojo likus 1 ar 2 nt iki modifikuoto nukleozido, taip įgalindama m⁶A identifikavimą dviejų nukleotidų tikslumu (155). Būtent ši prieiga buvo pritaikyta ir metaboliniam RNR žymėjimui gyvoose ląstelėse. Šiuo atveju AdoMet analogas buvo sintetinamas pačiose HeLa ląstelėse jas auginant terpėje su metionino analogu propinil-L-selenohomocisteinu, o išgryninta visuminė RNR pirmiausia prijungta prie biotin-azido, tada streptavidinu dengtų magnetinių dalelių ir nuskaityta. Šio eksperimento metu pavyko patvirtinti dalį žinomų rRNR metilino sričių, vis dėlto, buvo akivaizdu, jog gauti rezultatai atspindi ne tik METTL3/METTL14, bet ir kitų metiltransferazių modifikavimo sritis (155). Metabolinis RNR žymėjimas propinilgrupe buvo pasitelktas ir sukuriant meCLICK-Seq metodą skirtą METTL3/METTL14 ir kitos m⁶A metiltransferazės, METTL16, taikinių identifikavimui. Pagal šį metodą prie m⁶A metiltransferazių perneštų propinilgrupių *click* reakcijos metu yra prijungiamas RNR degradaciją inicijuojantis darinys, vadinamos „*click-degrader*“. Po visuminės RNR sekoskaitos modifikacijos vietos nustatomos pagal sumažėjusį nuskaitymų kiekį konkrečiose pozicijose, o konkrečios

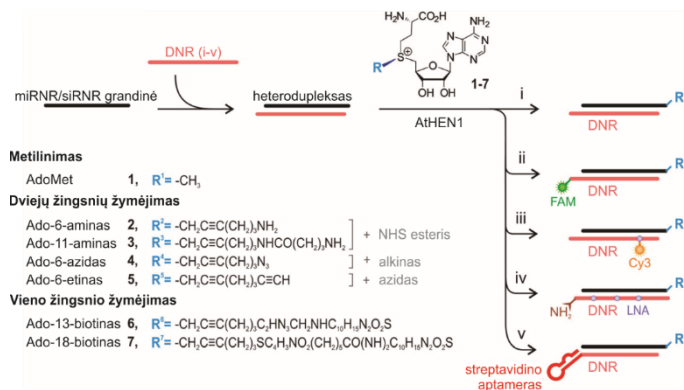
modifikuojančios metiltransferazės identifikuojamos palyginus sekoskaitos rezultatus tarp laukinio tipo ir atitinkamų metiltransferazių raiškos nevykdančių ląstelių (156). Nors pastarasis metodas neleidžia nustatyti konkretaus modifikuojamo adenosino, vis dėlto, jo pagalba buvo ne tik patvirtintas žinomų METTL3/METTL14 ir METTL16 iRNR bei ilgų reguliacinių RNR metilinimas, bet ir parodyta, jog m⁶A metilinimas yra paplitęs ir intronuose bei tarpgeniniuose regionuose. Tai, jog meCLICK-Seq signalas buvo užfiksuotas ir potencialioje m⁷G aplinkoje, rodo, jog šis metodas galėtų būti pritaikytas ir kitų metiltransferazių taikinių nustatymui (156).

Tiriam skirtingų m⁶A metiltransferazių gebą pernešti ilgesnes šonines grupes, buvo parodyta, jog tik METTL3/METTL14, bet ne METTL16 gali modifikuoti RNR vinilbenzilo, *orto*-nitrobenzilo ir 6-nitropiperonilo grupėmis. Prie METTL3/14 propinil-grupe pažymėtos RNR per *click* reakciją gali būti prijungtas fluoroforas ar biotinas, orto-nitrobenzilo ir 6-nitropiperonilo grupės gali būti panaudotos atvirkštinės transkripcijos stabdymui. Be to, abi pastarosios modifikacijos yra jautrios šviesai ir gali būti pašalintos nuo modifikuotos RNR šią apšvietus atitinkamai 365 ir 405 nm ilgio bangomis. Kombinuojant metiltransferazes ir sintetinius AdoMet analogus tiriamas RNR galima pažymėti skirtingomis grupėmis, taip pritaikant skirtingus tyrimo metodus (157).

1.3.3 3'-galus modifikuojančios RNR metiltransferazės

Specifiniam RNR 3'-galų modifikavimui iki šio darbo buvo pritaikyta vienintelė AtHEN1 metiltransferazė. Dviejų žingsnių reakcijose, pasitelkus AtHEN1 ir AdoMet analogus su galinį aminą, alkiną ar azidą turinčia pernešama grupe, buvo modifikuoti skirtingu komplementarumu pasižymintys augalų ir gyvūnų miRNR bei siRNR dupleksai. Sekančiu etapu prijungus fluorescuojančias grupes, RNR dupleksai buvo vizualizuoti, o biotiną – išgryninti iš reakcijos mišinio. Vieno žingsnio žymėjimo reakcijose pirmą kartą buvo pernešta ir didžiulė biotiną turinti grupė nuo Ado-18-biotino kofaktoriaus (19,52). Stebėtinai AtHEN1 pasirodė gebąs modifikuoti ne tik natūralius ar juos primenančius RNR substratus, bet ir RNR molekules RNR/DNR duplekse, sudarytame iš nemodifikuotos ar net papildomas modifikacijas turinčios DNR grandinės, be jokios neigiamos įtakos modifikavimo reakcijos greičiui ar efektyvumui (Pav. 1.15). Taip buvo sukurtas itin jautrus dviem reporterinėmis grupėmis paremtas RNR žymėjimo metodas. Vienoje jo variacijoje streptavidino aptamerą 3'-gale turintis DNR oligonukleotidas, komplementarus vienai mišinio RNR, buvo pasitelktas

adresuotam RNR žymėjimui ir gryninimui. Kitoje – modifikavus RNR duplekse su fluoroforu žymėta DNR, ji buvo vizualizuota reakcijos mišinyje FRET metodu (19).



Pav. 1.15. Selektyvus pasirinktos mažosios RNR žymėjimas RNR/DNR duplekse pasitelkiant AtHEN1 metiltransferazę. Modifikuota pagal (19).

Nors dėl minėto cheminio metilo grupės inertiškumo didžioji dalis metiltransferazių RNR tyrimams pritaikytos pasitelkus sintetinius AdoMet analogus, būtent AtHEN1 buvo panaudota ir visai kitokiai, unikaliai RNR analizei sekoskaitos metodu – mime-seq (angl. *microRNome by methylation-dependent sequencing*). Mime-seq remiasi natūralia AtHEN1 savybe modifikuoti mažąsias RNR įprasta metilo grupe, tik pats baltymas yra ekspresuojamas ne įprastinėse baltažiedžio vairo, o tiriamo organizmo, šiuo atveju apvaliosios kirmėlės ar vaisinės muselės ląstelėse (159). Po AtHEN1 raiškos išskirta visuminė RNR yra paveikiama natrio perjodatu, taip tik modifikuotą 2'-O-grupę turinčią RNR paliekant nehidrolizuotą ir nuskaitant sekančiu etapu. Patvirtinus, jog *C. elegans* ir *D. melanogaster* ekspresuojama AtHEN1 iš tiesų modifikoja jų miRNR, autoriams pavyko vykdyti metiltransferazės raišką konkrečiuose šių gyvūnų audiniuose ir net ląstelėse bei identifikuoti tik joms būdingus miRNR rinkinius (159).

1.4 RNR sekoskaita

Nors pirmoji bakterinė sRNR buvo atrasta dar aštuntajame dešimtmetyje (160), o pirmoji eukariotinė mažoji nekoduojanti RNR – 1993 metais (161), šio šimtmečio pradžioje suklestėjusios naujos kartos sekoskaitos technologijos mažųjų RNR pasaulį praplėtė neatpažįstamai (162,163). Šiuo metu miRNR duomenų bazėje miRBase v22.1 yra užregistruotos 38589 miRNR sekos, priskiriamos 271 organizmui. Iš jų žmoguje nustatyta 1917

miRNR (164). Viename plačiausiai tyrinėjamų prokariotinių organizmų *E. coli* šiuo metu patvirtinta apie 100 funkcionalių sRNR molekulių (88).

Kiekvieną RNR sekoskaitos eksperimentą, tarp jų ir mažųjų RNR sekoskaitą, sudaro keturi pagrindiniai etapai: tikslinių RNR paruošimas, kDNR bibliotekos paruošimas, jos sekoskaita bei gautų duomenų analizė. Būtent nuo RNR ir kDNR bibliotekos paruošimo priklauso, kokie rezultatai bus gauti atlikus sekoskaitos eksperimentą. RNR paruošimo etapas apima RNR išgryninimą iš tiriamo biologinio mėginio ir, neretai, analizuojamos RNR frakcijos praturtinimą: DNR priemaišų, gausių, nepageidaujamų RNR klasių, pavyzdžiui, rRNR, pašalinimą, konkretaus ilgio ar tam tikrai grupei priklausančių RNR išgryninimą. Nors fenoliu paremtas RNR gryninimas ir fermentinis DNR pašalinimas jau yra tapę rutininėmis procedūromis, selektyvaus konkrečių RNR praturtinimo metodai varijuoja ir nuolat pasipildo naujomis technologijomis (165).

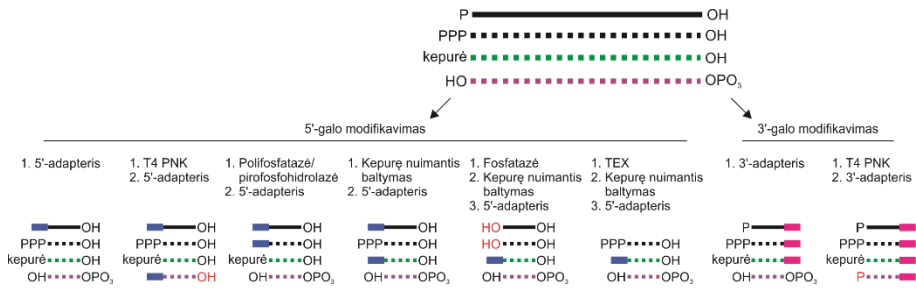
kDNR bibliotekos paruošimas mažųjų RNR atveju susideda iš 3'- ir 5'- adapterių prisiuvimo, atvirkštinės transkripcijos ir kDNR padauginimo PGR metodu. Adapterių prisiuvimas tiesiai prie RNR užtikrina grandinei specifinę sekoskaitą bei tikslų RNR galų nustatymą. Tačiau pastarąjį dešimtmetį atlikti tyrimai parodė, jog ši RNR ligazių katalizuojama reakcija pasižymi bene didžiausiais šališkumais visame kDNR bibliotekos paruošimo procese. Būtent neefektyvus adapterių prisiuvimas yra pagrindinė netolygaus skirtingų sekų RNR nuskaitymo priežastis. Dėl netolygaus RNR įtraukimo į kDNR biblioteką po sekoskaitos gaunamas nuskaitymų kiekis gali neatspindėti tikrojo sRNR raiškos lygio, santykinio jų kiekio, o negausios RNR gali likti ir visai neidentifikuotos. Ne veltui šis etapas yra nuolat tobulinamas ir optimizuojamas (23,24,26,27,166,167).

1.4.1 Mažųjų reguliacinių RNR paruošimas – rRNR pašalinimas ir selektyvus tiriamų RNR praturtinimas

Ruošiantis 50-500 nt ilgio bakterinių mažųjų RNR sekoskaitai, būtina pašalinti apie 120 nt 5S rRNR ir ilgųjų rRNR degradacijos produktus. Nepašalintos, didžiąją dalį visų ląstelės transkriptų apimančios rRNR, ypač visuminės RNR sekoskaitos metu, gali sudaryti net iki 98% po sekoskaitos gaunamų nuskaitymų (168–171). Bene labiausiai paplitę specifiniai rRNR pašalinimo metodai yra paremti jų hibridizacija su komplementariais oligonukleotidais, sąveikaujanciais su magnetinėmis dalelėmis ir, pavyzdžiui, pritaikyti plačiai naudojamuose RiboMinus (Thermo Fisher Scientific) ir Ribo-Zero (Illumina) rinkiniuose (169,172). Kito tipo metoduose su komplementariais DNR oligonukleotidais hibridizuota rRNR pašalinama

RNazei H degraduojant susidariusius heterodupleksus (Ribo-Zero Plus, Illumina; NEBNext rRNA Depletion Kit, NEB) (173). Kadangi ribosominės RNR yra iškerpamos iš pirminių transkriptų ir 5'-gale turi monofosfato grupę, rRNR gali būti pašalintos mėginį veikiant ir 5'-P-RNR specifine egzonukleaze (170,174,175). rRNR pašalinamas gali būti vykdomas ir vėlesniuose bibliotekos paruošimo etapuose – rRNR kDNR sudarant dupleksus su komplementariais nukleotidais jie yra hidrolizuojami dupleksams specifine nukleaze (176,177). Naujame, DASH (angl. *Depletion of Abundant Sequences by Hybridization*) metode pasitelkiama Cas9 nukleazė ir sgRNR (angl. *single-guide*) rinkinys, kartu pašalinantys rDNR po poros PGR ciklą (168).

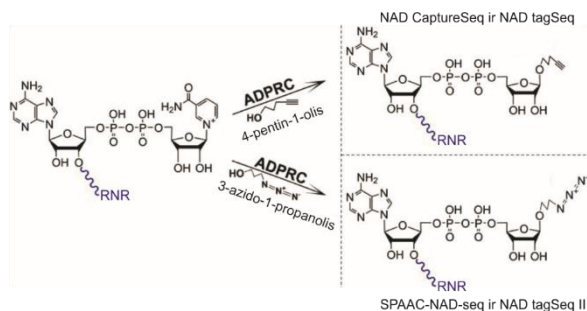
Priklausomai nuo eksperimento tikslo, RNR paruošimo etape galima papildomai praturtinti ir konkrečia modifikacija, taigi dažnai ir specifinėmis funkcijomis, pasižyminčias RNR (165). Visos eukariotinės mažosios reguliacinės RNR 5'-gale turi 5'-P modifikaciją, o 3'-galinio nukleotido ribozė 3'-padėtyje gali būti papildomai modifikuotos metilo grupė (31,34). Bakterinės sRNR 5'-gale gali turėti keletą skirtingų cheminių modifikacijų: 5'-PPP, būdingą pirminiems transkriptams, 5'-P ar 5'-OH, būdingus hidrolizuotoms RNR, dar vadinamoms antriniais transkriptais, ar prijungtą didesnę cheminę grupę – RNR kepurę (32,178,179). Kai kurios mažosios bakterinės antrinės RNR, pavyzdžiui CRISPR RNR (crRNR), 3'-gale turi ir 2'-fosfato ar 2'-3'-ciklo fosfato grupes (180). Kadangi, naudojant pradmenų prisiuvimo prie RNR strategiją (detalesniam aptariamam sekančiame poskyryje) į kDNR biblioteką yra įtraukiamos tik 5'-monofosfatą ir 3'-OH grupes turinčios RNR, siekiant nuskaityti bet kurią iš išvardintų RNR grupių prieš ruošiant kDNR biblioteką jos turi įgyti aptartas modifikacijas. Kuri konkreti RNR grupė bus praturtinta ir nuskaityta, priklauso nuo pasirinktos fermentinių reakcijų sekos bei jų kombinacijos (Pav. 1.16). Siekiant identifikuoti 5'-PPP ar 5'-kepurę turinčias RNR, jos yra paveikiamos 5'-PPP iki 5'-P hidrolizuojančiomis polifosfatazėmis, pirofosfohidrolazėmis ar specifines kepurės nuimančiais baltymais. 5'-OH turinčios RNR yra fosforilamos veikiant T4 polinukleotidkinazei (T4 PNK), kuri taip pat defosforilina 3'-RNR galus (165). O išskirtinai 3'-OCH₃ grupes turinčios RNR yra nuskaitytos selektyviai oksiduojant ir iš tolimesnio kDNR bibliotekos paruošimo etapo pašalinant nemetilintas, 2',3'-OH grupes turinčias RNR molekules (159).



Pav. 1.16. Mažųjų reguliacinių RNR 5'- ir 3'-galinių modifikacijų įvairovė ir selektyvaus jų įtraukimo į ruošiamą kDNR biblioteką galimybės. T4 PNK – T4 polinukleotidų kinazė, TEX – nuo 5'-P priklausoma galinė egzozukleazė. Modifikuota pagal (165).

Per pastarąjį dešimtmetį buvo sukurti ir plačiai ne tik mažųjų RNR, bet ir viso transkriptomo sekoskaitai, pritaikyti net keli selektyviu RNR praturtinimu paremti metodai. Pavyzdžiui – diferencinė RNR sekoskaita, dRNA-Seq, įgalinanti transkripcijos pradžių sričių identifikavimą palyginus dviejų – i) tik iš 5'-PPP-RNR ir ii) iš 5'-PPP- bei 5'-P-RNR sudarytų – kDNR bibliotekų sekoskaitos rezultatus (181). Tik iš 5'-PPP-RNR sudarytas mėginys yra paruošiamas nuo 5'-P priklausomai egzozukleazei (TEX, angl. *5'-P-Terminal Exonuclease*) degraduojant 5'-monofosfatą turinčius RNR transkriptus (Pav. 1.6). Vis dėlto, svarbu pažymėti, jog itin struktūrizuotos 5'-P-RNR, pavyzdžiui tRNR ar rRNR, nėra efektyviai degraduojamos, tad neretai dRNA-Seq mėginiuose lieka neatskirtos nuo pirminių transkriptų bei gali sudaryti didelę dalį nuskaitymų, taip iškreipdamos sekoskaitos rezultatus (182). Cappable-Seq metodas veikia pagal kitą principą ir ne pašalina antrinius, o praturtina išskirtinai pirminius transkriptus. Tam pasitelkiamas *Vaccinia* viruso kepurė uždedanti baltymas, 3'-biotilintą GTP pernešantis tik ant 5'-PPP-RNR. Dėka biotino-streptavidino sąveikos modifikuota RNR yra praturtinama ir, pašalinus kepurės struktūrą, įtraukiama į ruošiamą kDNR biblioteką. Lyginant su dRNA-Seq, Cappable-seq pasižymi didesniu selektyvumu 5'-PPP-RNR atžvilgiu, tad tiksliau identifikuoja TSS vietas bei išvengia klaidingo TSS priskyrimo antriniam ribosominių RNR transkriptams (183). Pritaikant kitą TagRNA-Seq metodą prie 5'-P yra prisiuvas vienos sekos 5'-adapteris, o prie sekančiame etape iki 5'-P defosforilintos 5'-PPP-RNR – kitos sekos 5'-adapteris, taip įgalinant skirtingų transkriptų atskyrimą sekoskaitos rezultatų analizės metu. Priešingai nei prieš tai aptartų metodų atveju, TagRNA-Seq užtenka paruošti vieną sekoskaitos biblioteką, taip sumažinant eksperimento kaštus (184).

Ilgą laiką manyta, jog priešingai nei eukariotinės, bakterinės RNR be 5'-P ir 5'-PPP nepasižymi specialia 5'-galo modifikacija. Tačiau 2009 m. buvo atrasta, jog bakterinės RNR 5'-gale taip pat gali būti modifikuojamos į eukariotų m⁷G kepurę panašia struktūra – 5'-NAD molekule (178). Selektiviam 5'-NAD-(s)RNR praturtinimui ir sekoskaitai buvo sukurti net 5 metodai: naująją kepurę hidrolizuojančius fermentus pasitelkiantis CapZyme-seq (185) ir adenosino difosfato-ribozilciklazės (ADPRC) geba nikotinamidą pakeisti nukleofilais paremti NAD captureSeq, SPAAC-NAD-seq, NAD tagSeq bei NAD tagSeq II (Pav. 1.17) (186–189). Kadangi 5'-adapterio prijungimas tiesiogiai prie 5'-NAD-RNR nėra įmanomas, selektyviam šių RNR įtraukimui į ruošiamą kDNR biblioteką, pasitelkus NudC ar Rai1 fermentus, CapZyme-seq metodu 5'-NAD-RNR yra hidrolizuojama iki 5'-P-RNR (185).

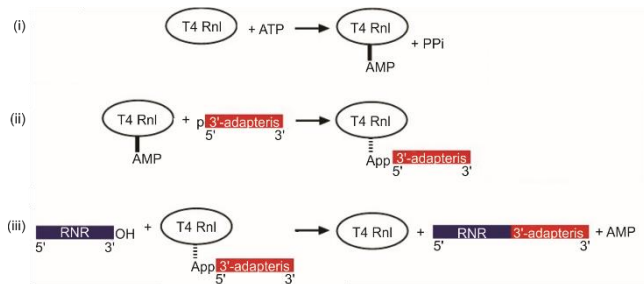


Pav. 1.17. 5'-NAD-RNR sekoskaitos metoduose pritaikytos ADPRC katalizuojamos reakcijos. Modifikuota pagal (188).

NAD CaptureSeq metodu 5'-NAD modifikaciją turinčios RNR yra praturtinamos ADPRC fermentui nikotinamidą pakeičiant 4-pentin-1-oliu, prie susidariusių produktų CuAAC reakcijos metu prijungiant azido grupę modifikuotą biotiną, bei išgryninant su streptavidinu dengtomis magnetinėmis dalelėmis (186). Panašiu principu yra paremtas ir SPAAC-NAD-seq metodas, tik šiuo atveju 5'-NAD modifikaciją turinčios RNR yra modifikuojamos 3-azido-propilu, prie kurio SPAAC reakcijų metu yra prijungiamas įtempto ciklooktano žiede alkino grupę turintis biotinas (187). Siekiant ne tik praturtinti 5'-NAD-RNR, bet ir iš karto pažymėti jas kDNR bibliotekos paruošimui, NAD tagSeq atveju, pasitelkiant NAD CaptureSeq pritaikytą ADPRC katalizuojamą reakciją, prie alkino grupę turinčios RNR CuAAC reakcijos metu yra prijungiamas azido modifikaciją turintis 5'-adapteris (189). Analogiškai, NAD tagSeq II, remiantis SPACC-NAD-Seq principais, prie azido grupę turinčios RNR SPAAC reakcijos metu yra prijungiamas alkino grupę ciklooktano žiede turintis 5'-adapteris (188).

1.4.2 Kopijinės DNR bibliotekos paruošimas – netolygus adapterių prisiuvimas

3'-adapterio prisiuvimas dažnai yra pirmasis mažųjų RNR kDNR bibliotekos paruošimo etapas. Jo metu, reakciją katalizuojant T4 RNR ligazei (T4 Rnl), prie RNR yra prisiuvas 5'-adenilintas bei 3'-blokuotas DNR pradmuo (190). T4 RNR ligazės sujungia gretimus 3'-OH ir 5'-PO₄ grupes turinčius polinukleotidus (Pav. 1.18). Ši susiuvimo reakcija susideda iš trijų etapų: (i) pirmajame fermentui sąveikaujant su ATP jo aktyvusis centras yra adenilinas – baltymas prisijungia AMP, (ii) antruoju etapu. AMP yra perkeliamas ant 5'-fosforilintos nukleorūgšties, susidarant 5'-adenilintam polinukleotidui, (iii) trečiojo etapo metu 3'-OH grupę turintis polinukleotidas yra susiuvamas su 5'-adenilintu polinukleotidu, tarp jų susidarant fosfodiesteriniam ryšiui ir atsipalaiduojant AMP (191). Siekiant išvengti RNR tarpusavio susisiuvimo, prie RNR prisiuvas 3'-adapterį reakcija yra pradeda nuo trečiojo etapo, naudojant jau adenilintą 3'-adapterį. Tam, kad tarpusavyje nebūtų susiūti keli adapteriai, jų 3'-galai yra blokuojami įjungiant dideoksinukleotidą ar ribozę modifikuojant, pavyzdžiui, propanolio grupe (angl. *C3 spacer*) (23). 3'-adapterio prisiuvimui yra naudojamas sutrumpintas ir modifikuotas T4 RNR ligazės 2 variantas, T4 trRnl2 (angl. *truncated form of T4 RNA ligase 2*), turintis pakaitą 227 pozicijoje – K227Q. T4 trRnl2 K227Q ne tik naudoja preadenilintą 3'-adapterį, bet ir nėra linkusi jo deadenilinti (22), todėl 3'-pradmens prisiuvimo reakcijos metu praktiškai nesusidaro pašaliniai RNR tarpusavio susiuvimo produktai (23,166). Kadangi T4 trRnl2 K227Q vienodai efektyviai prie RNR prisiuva tiek 5'-gale ribonukleotidą, tiek ir deoksinukleotidą turinčius 3'-adapterius (166), dėl didesnio stabilumo kDNR bibliotekos paruošimui dažniausiai naudojamas 3'-DNR adapteris.



Pav. 1.18. 3'-adapterio prisiuvimo reakcija. Modifikuota pagal (165).

Vis dėlto, net ir modifikuotos T4 trRnl2 K227Q vykdomo RNR susiuvimo su 3'-adapteriu efektyvumas nėra tolygus. Hafner su kolegomis parodė, jog

šios reakcijos efektyvumas priklauso nuo konkrečių RNR (23,24). Atlikus iš 24 atsitiktinių nukleotidų sudarytos RNR, N24 RNR, sekoskaitą, buvo nustatyta, jog į kDNR biblioteką dažniau įtraukiamos sekos trečioje nuo galo pozicijoje turi G arba A nukleotidus (25). Susiuvimo efektyvumo priklausomybės nuo 3'-adapterio tyrimai atskleidė, jog ši reakcija priklauso ir nuo adapterio sekos, ypač pirmų 2-jų jo nukleotidų (24,26). Kadangi nukleorūgščių seka yra tampriai susijusi su jų struktūra, siekiant įvertinti jos įtaką 3'-adapterio prisiuvimui, 770 sintetinių nuskaitytų miRNR sekos buvo suskirstytos į 5 grupes pagal galimas sudaryti vidines struktūras bei sąveikas su 3'-adapteriu. Palyginus skirtingoms grupės priskirtų miRNR nuskaitymų kieki, buvo nustatyta, jog iš tiesų skirtinga RNR bei RNR ir 3'-adapterio struktūrizacija nulemia nevienodus RNR kiekius kDNR bibliotekose. Vidinių ar su 3'-pradmeniu struktūrų nesudarančios miRNR sudaro mažiausią dalį nuskaitymų, o stabilias vidumolekulines ir su 3'-pradmeniu struktūras turinčios RNR yra kur kas efektyviau įtraukiamos į kDNR biblioteką (23). Atlikus detalesnę 3'-adapterio prisiuvimo analizę ir ištyrus 4²¹ skirtingų RNR sekų, nebuvo nustatyta, jog T4 trRnl2 K227Q būtų linkusi prisiūti konkrečios sekos RNR, tačiau parodyta, jog tiriamą RNR ligazę kur kas efektyviau susiūva tris ir daugiau nesuporuotų nukleotidų 3'-gale turinčias sekas. Dar daugiau, patyrinėjus RNR ir 3'-pradmens sudaromas struktūras buvo dar kartą patvirtinta, jog būtent nuo jų priklauso konkrečios RNR nuskaitymų kiekis. Iš 8 skirtingų RNR-3'-pradmens sudaromų struktūrų tipų, trys jų užtikrino palankesnę nei vidutinę sRNR susiuvimą ir didesnę atitinkamų RNR nuskaitymų kieki. Tai, jog susiuvimo efektyvumas priklauso ir nuo paties 3'-pradmens struktūros, autoriai parodė pasitelkę du 21 nt pradmenis, sudarytus iš 12 vienodų ir 9 skirtingų 3'-galo nukleotidų, ir įgyjančių skirtingas vidumolekulines struktūras (27). Panašūs rezultatai buvo gauti ir išanalizavus beveik 1000-čio miRNR-3'-adapterio struktūras – šiuo atveju iš 9-ių skirtingų struktūrų tipų, 3 užtikrino dažnesnę RNR įtraukimą į kDNR biblioteką, 5 turėjo priešingą efektą (28). Kito tyrimo metu, nuskaičius RNR sudarytas iš 10 vienodų ir 10 atsitiktinių nukleotidų, taip pat buvo nustatyta, kad itin daug nuskaitymų turėjusios sekos formavo stabilesnes antrines struktūras ir su didesne tikimybe sudarė struktūras su 3'-adapteriu (29).

Sekantį, iš ribonukleotidų sudaryto 5'-adapterio prisiuvimą, paprastai katalizuoja kitas fermentas – T4 RNR ligazė 1 (T4 Rnl1). Kaip minėta anksčiau, šiai reakcijai būtina, jog susiuvama RNR 5'-gale turėtų monofosfato modifikaciją (192). T4 Rnl1 vykdoma reakcija taip pat nepasižymi vienodu efektyvumu skirtingų substratų atžvilgiu. Kaip ir 3'-adapterio prisiuvimo atveju, buvo parodyta, jog T4 Rnl1 katalizuojamas 5'-adapterio prisiuvimas

priklauso ir nuo konkrečios RNR, ir nuo pradmens sekos, ypač paskutinių 2-jų jo nukleotidų (26). Tačiau patyrinėjus detaliau ir 5'-adapterio prisiuvimą įvertinus su RNR rinkiniu, sudarytu iš 21 atsitiktinio nukleotido, buvo nustatyta, jog vis dėlto ne seka, o RNR ir RNR-5'-adapterio struktūra turi lemiamą reikšmę. Efektyviam 5'-adapterio prisiuvimui būtinas bent vienas nesuporuotas 5'-RNR nukleotidas. Ir nors didėjant nesuporuotų nukleotidų skaičiui didėja ir konkrečių RNR praturtinimas, visiškai nestruktūrizuotos RNR yra rečiau įtraukiamos į kDNR biblioteką (28,193). 962 skirtingas miRNR suskirsčius į 12 grupių pagal su 5'-adapteriu sudaromas struktūras buvo parodyta, jog nuo to taip pat priklauso konkrečios RNR nuskaitymų kiekis – 8-ioms grupėms priskirtų mažųjų RNR nuskaitymų dalis viršijo teoriškai apskaičiuotąją, 4-ioms – buvo mažesnė nei tikėtasi (28).

1.4.3 Adapterių prisiuvimas reakcijos tolygumo didinimas

Sekoskaitos rezultatus iškreipianti netolygaus adapterių prisiuvimas problema sprendžiama optimizuojant prisiuvimas reakcijos sąlygas – laiką, temperatūrą, reagentų koncentracijas, pridėdamas papildomų komponentų, pavyzdžiui polietilenglikolio, PEG, kuris naudojamas NEBNext (New England Biolabs) ir NEXTFLEX (PerkinElmer) rinkiniuose (23–25,166), – keičiant adapterio seką taip, jog susidarytų palankios RNR-adapterio struktūros (27) ar naudojant adapterius prie RNR prisiuvamuose galuose turinčius 2-6 nt ilgio atsitiktinę seką (2-6N adapterius) (24–27,167). Atsitiktiniai nukleotidai su RNR sąveikaujančiuose adapterių galuose užtikrina, jog kiekviena RNR būtų prisūta prie jai optimaliausios pradmens sekos, taip sumažinant susiuvimas šališkumus. Pavyzdžiui, nuskaičius iš 9 ar 21 atsitiktinio nukleotido sudarytas RNR, buvo parodyta, jog pasitelkus 4N adapterius, RNR identifikavimo jautrumas padidėja 2 kartus, o nuskaitytų RNR struktūros tampa panašesnės į atsitiktines. Atitinkamai, po biologinių mėginių miRNR sekoskaitos gauti rezultatai pasižymėjo stipresne koreliacija su *Northern* hibridizacijos duomenimis (167). Itin didelis palyginamasis tyrimas buvo atliktas nuskaičius kDNR bibliotekas, ruoštas devyniose skirtingose laboratorijose, naudojant 9 skirtingus protokolus – tris pasitelkiančius konkrečios sekos adapterius ir šešis su 4N adapteriais. Palyginus skirtingais metodais paruoštų kDNR bibliotekų rezultatus, buvo parodyta, jog ekvimoliarinio RNR mišinio kiekiai po sekoskaitos konkrečios sekos adapterius naudojančiuose protokoluose varijavo net milijoną kartų, o 4N adapterius naudojusiose bibliotekose maksimali variacija buvo 100 kartų mažesnė (194). Daugiau nei 10 k. nuo teorinės vertės besiskiriančių nuskaitymų kiekis konkrečios sekos adapterius turinčiuose bibliotekose sudarė 41-56%, 4N – tik 5-23%. Vis dėlto, svarbu

pažymėti, jog visi metodai galėjo tiksliai atskirti skirtingus tos pačios RNR kiekius jiems besiskiriant vos 1,5 karto. Tai rodo, jog santykinis konkrečios RNR kiekio nustatymas yra tikslus naudojant bet kurią protokolą. Atlikus biologinio mėginio – kraujo plazmos miRNR – sekoskaitą, didžiausias skirtingų miRNR kiekis taip pat buvo nustatytas su 4N adapteriais paruoštuose mėginiuose (194). Nustačius, jog tarpusavyje dalinai komplementarūs 3'- ir 5'-adapteriai dėl sudaromos struktūros taip pat padidina susiuvimo reakcijos efektyvumą, 962 unikalių sintetinių miRNR rinkinio sekoskaitai buvo pasitelkti 6 atsitiktinius nukleotidus sekos viduryje ir 7 komplementarius nukleotidus nuo susiuvimo srities nutolusiuose galuose turintys adapteriai. Šios sekoskaitos rezultatus palyginus su gautais naudojant konkrečios sekos adapterius, buvo nustatyta, jog, pritaikius aptartą strategiją, nuo teorinio kiekio 2 kartus nukrypstančių miRNR skaičius sumažėja 2-3 kartus, o daugiau negu 10 kartų – net 4-10 kartų (28).

Iš komerciškai platinamų kDNR bibliotekos paruošimo rinkinių 4N adapteriai šiuo metu yra naudojami tik NEXTFLEX rinkinyje. Iš tiesų, šiuo rinkiniu paruoštų kDNR bibliotekų sekoskaitos rezultatai, lyginant su vienos sekos adapterius naudojančiu TrueSeq (Illumina) rinkiniu, pasižymi geresne koreliacija su atvirkštinės transkripcijos-kiekybinės PGR, AT-kPGR, duomenimis (195). Pasitelkiant NEXTFLEX gaunami ir tiksliausi ekvimoliarinio miRNR rinkinio sekoskaitos rezultatai (196,197). NEXTFLEX rinkiniu paruoštuose smegenų, kepenų ir placentos miRNR kDNR bibliotekose identifikuojama daugiausiai ir įvairiausių miRNR lyginant su konkrečios sekos adapterius turinčių TrueSeq bei NEBNext rinkinių bibliotekomis (196,198). Į TrueSeq rinkinį įkomponavus NEXTFLEX rinkinio privalumus – pasitelkus 4N adapterius, bei į susiuvimo reakcijas pridėjus PEG – sumažėja TrueSeq nuskaitomų RNR nuokrypis nuo tikrojo jų kiekio. O abiejų rinkinių tikslumą papildomai padidina vienas kitam dalinai komplementarių, sekos viduje N nukleotidų turinčių adapterių pasitelkimas (199).

Siekiant tolygesnio RNR įtraukimo į ruošiamą kDNR biblioteką, ne tik optimizuojamos esamų reakcijų sąlygos, bet ir ieškoma alternatyvų. Kai kuriuose kDNR bibliotekos paruošimo rinkiniuose 3'-adapterio prisivimas yra pakeičiamas poli(A) sekos pridėjimu naudojant poli(A) polimerazę (D-plex, CATS, *Diagenode*, SMARTer, *Takara*). Vis dėlto, šios reakcijos efektyvumas taip pat priklauso nuo RNR 3'-galo struktūros, o pati poli(A) seka komplikuoja tikslų mažosios RNR ribų nustatymą (165). Termostabilios, II grupės intronų koduojamos retrovirusinės atvirkštinės transkriptazės pasitelkiamos TGIRT-Seq (angl. *Thermostable Group II Intron Reverse*

Transcriptase Sequencing) protokole. TGIRT sąveikauja su 3'-RNR adapterio/DNR dupleksu, turinčiu vieną atsitiktinį nesuporuotą RNR nukleotidą. Pastarajam hibridizuojantis su analizuojama RNR, yra inicijuojama matricos pakeitimo reakcija ir kDNR sintezė. Vis dėlto šis metodas taip pat pasižymi RNR įtraukimo į kDNR biblioteką netolygumais – didesnę dalį jų sudaro 3'-gale G, mažesnę – U nukleotidus turinčios sekos (200).

Kadangi vidumolekulinė susiuvimo reakcija yra efektyvesnė už tarpmolekulinę, vienas iš 5'-adapterio prisiuvimo optimizavimo būdų – su 3'-DNR adapteriu sulietas 5'-RNR adapterio naudojimas pritaikomas RealSeq-AC protokole. Šiuo metodu prie RNR prisiuvus 3'-adapterio-5'-adapterio seką, vykstant vidumolekulinei susiuvimo reakcijai susidaro žiedo formos struktūra, toliau naudojama kaip matrica kDNR sintezei (201). Paruošus kDNR bibliotekas RealSeq-AC metodu bei penkiais komerciškai platinamais rinkiniais, buvo parodyta, jog šis metodas įgalina tikslų kiekybinį net 71,8% visų mėginyje buvusių sintetinių RNR identifikavimą. Palyginimui, kiekybiškai tikslų nuskaitymų dalis NEXTFLEX rinkiniu paruoštose bibliotekose siekė 35,7%, NEBNext – 19,2%, o TrueSeq – tik 12,9%. Pasitelkus RealSeq-AC buvo nustatytas ir didžiausias kiekis skirtingų žmogaus smegenų miRNR bei gauta didžiausia koreliacija tarp sekoskaitos ir AT-kPGR rezultatų (201). 5'-adenilintas ir 3'-blokuotas 5'-adapteris gali būti prisiūtas ne tik prie RNR, bet ir prie kDNR, tam dažniausiai pasitelkiant termostabilios RNR ligazės Mth K97A variantą (202). Vis dėlto, šis fermentas dažniau kaip substratus naudoja kDNR trečioje pozicijoje nuo 3'-galo turinčius A arba C nukleotidus (200). 5'-pradmuo kDNR stadijoje gali būti prisiūtas ir pritaikant jau minėtą vidumolekulinę susiuvimo reakciją. Prie RNR prisiuvus iš sulietų 3'- ir 5'-adapterių sudarytą DNR oligonukleotidą, po atvirkštinės transkripcijos gautas produktas gali būti susiuvamas tarpusavyje naudojant CricLigazę (203). Tačiau duomenys apie šio fermento substratinę specifiškumą kol kas yra priešaringi – remiantis vienais tyrimais CricLigazė efektyviau susiuvu pirmoje pozicijoje A arba T, antroje – C arba T nukleotidus turinčias RNR (204,205), kituose teigiama, jog fermentas nepasižymi identifikuojamais šališkumais (193).

Siekiant visiškai atsakyti 5'-adapterio prisiuvimo yra pasitelkiamos atvirkštinių transkriptazių matricos pakeitimo reakcijos (165). SMART technologijoje naudojama galinės transferazės ir matricos pakeitimo aktyvumu pasižyminti M-MuLV AT. Pasiekus RNR matricos galą, šis fermentas papildomai prideda keletą C nukleotidų. Reakcijos mišinyje esant su pastaraisiais hibridizuotis galinčiam, kelių G nukleotidų seką turinčiam, 5'-

adapteriui komplementariam oligonukleotidui, M-MuLV pakeičia kDNR sintezės matricą ir prie jau susintetintos kDNR prideda 5'-adapterio seką (206). Šis principas pritaikomas komerciškai platiname SMARTer, CATS ir jį šiuo metu pakeitusiame D-plex rinkinyje. Iš N21 RNR mišinio ir 6-ių konkrečios sekos RNR paruošus kDNR biblioteką TrueSeq, NEBNext, NEXTFLEX, SMARTer ir CATS rinkiniais, buvo parodyta, jog identifikuoti jų kiekiai nuo teorinių mažiausiai nukrypsta būtent SMARTer ir CATS bibliotekose, nors jose ir susidaro daugiausiai trumpų nuskaitymų. Įvertinus HeLa miRNR sekoskaitos rezultatus pagal tai, kiek nuskaitymų atitiko pačias miRNR ir kiek konkrečių miRNR buvo identifikuota, SMARTer protokolą vis dėlto pranoko TrueSeq ir NEXTFLEX rinkiniai (199). Svarbu pažymėti, jog vykdant kDNR sintezę prieš 5'-adapterio prisiuvimą dėl ne iki galo įvykusios atvirkštinės transkripcijos ar galinio transferazinio fermentų aktyvumo tampa sudėtinga nustatyti tikslią nuskaitytos RNR 5'-galo seką (25,200,205).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Reagentai

10 mg/ml etidžio bromidas (EtBr), 5× Roti-Nanoquant, akrilamido-biskarilamido (AA-bisAA) tirpalai Rotiphorese gel 30 (37,5:1) ir Rotiphorese gel 40 (19:1), ampicilino natrio druska, amonio persulfatas (APS), Brilliant Blue R 250, chloramfenikolis, chloroformas, CoCl_2 , $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA), fenolio/chloroformo/izoamilalkoholio mišinys, glicerolis, redukuotas glutationas (GSH), $\text{H}_3\text{B}_3\text{O}_3$, kanamicino sulfatas, KCl, KH_2PO_4 , KOH, Na_2HPO_4 , NaCl, natrio citratas, natrio dodecilsulfatas (NDS), NiSO_4 , Rotiphorese 10× NDS-PAGE buferis, tetrametiletilendiaminas (TEMED), triptofanas, Tris, Triton X-100, Tween-20, urėja, $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, ZnCl_2 – *Carl Roth*.

2× RNR leidimo dažas, 20 mg/ml glikogenas, 3M NaOAc (pH 5.2), 4× 2,5 μmol dNTP mišinys, 6× DNR leidimo dažas, agaras, ditiotreitolis (DTT), HEPES, izopropil-β-tiogalaktozidas (IPTG), 1M MgCl_2 , MnCl_2 , TOPVision agarozė, vanduo be nukleazių – *Thermo Fisher Scientific*.

CaCl_2 , *Complete EDTA-free* proteazių inhibitorių kokteilis, CuBr, formamidas, NaIO_4 , pepstatinas, tris[(1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]aminas (TBTA) – *Merck*.

CH_3COOH , EtOH, fenilmetilsulfonilfluoridas (PMSF), HCl, mielių tRNR, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ – *Honeywell*.

Lactobacilli MRS Broth, mielių ekstraktas, triptonas – *BD-Difco*.

Sacharozė – *Polskie Odczynniki chemiczne S. A.*

RNazol RT – *Molecular Research Center, Inc.*

ATP, [γ - ^{32}P] (6000Ci/mmol) – *PerkinElmer*.

Cy5-649/670-NHS-esteris – *GE Healthcare*.

50 mg/ml jaučio serumo albuminas (BSA, angl. *Bovine Serum Albumin*), fenolis pH 4,5 – *Ambion*.

Cy5.5-673/707-alkinas – *Lumiprobe*.

Bromfenolio mėlis – *AppliChem*.

2.1.2 Kofaktoriai

AdoMet 1 (A. Osipenko papildomai išgrynintas nuo AdoHcy), AdoHcy – *Sigma-Aldrich*.

Ado-6-aminas 2, Ado-6-azidas 3, Ado-13-biotinas 4, Ado-14-Cy3 – dr. Viktoro Masevičiaus grupės susintetinti AdoMet analogai.

2.1.3 Pradmenys, vektoriai ir molekulinės masės žymenys

GeneRuler 1 kb ir Ultra Low Range DNR molekulinės masės žymenys – *Thermo Fisher Scientific*.

Low Range vgRNR molekulinės masės žymuo – *New England Biolabs*.
miRXplore RNR – *Miltenyi Biotec*.

43, 60 ir 80 nt ilgio RNR koduojančių vektorių konstravimui naudoti oligonukleotidai – *Metabion*

T7II-Fw	CAGTAATACGACTCACTATTAGGAAAGC
siR-HDV-Rv	GCCATGCCGACCCGTGATTCTCTCTGCAAGCGTT AAC
HDV-Fw	GGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCGGTCC GACCTGGGCTA
HDV-Rv	CTTCTCCCTTAGCCTACCGAAGTAGCCCAGGTCTG GACCGCGAGGA
pUC-Fw	GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA
pUC-Rv	GAGCGGATAACAATTCACACAGG

FRET eksperimentuose naudoti oligonukleotidai – *Metabion*

DNR	GTGATTCTCTCTGCAAGCGTTAA
DNR-2Cy5	G(Cy5-dT)GATTCTCTCTGCAAGCGTTAA
DNR-5Cy5	GTGA(Cy5-dT)TCTCTCTGCAAGCGTTAA

RNR oligonukleotidai – *Metabion*

miR173-C/U/A/G	UUCGCUUGCAGAGAGAAAUCAC/U/A/G
miR173*	GAUUCUCUGUGUAAGCGAAAG
miR26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
let-7a2	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
N21 RNR	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
piR3	UGAGAGUGGCAUCUAAAUGUUUAGUGGA
siR23	UUAACGCUUGCAGAGAGAAUCAC

Darbo metu susintetinti RNR oligonukleotidai

siR43	AGGAAAGCUUCGAUCAAUUGUUAACGCUUGCAGAGA GAAUCAC
siR60	AGGAAAGCUUUGAAGAUUAAGAUUAGAAUGCCAAUU GUUAACGCUUGCAGAGAGAAUCAC
siR80	AGGAAAGCUUACCAUGUACACAAGACGUAGUACCGA UUAAGAUUAGAAUGCCAAUUGUUAACGCUUGCAGAG AGAAUCAC

kDNR bibliotekos paruošimui naudoti oligonukleotidai

Exiqon

5S komp. 1 T+TCTGTGTTCGG/ACA+TGGGAACAGG+TGTATC-
Biotin-TEG

Metabion

5S komp. 2 CCACCAACTACTCTCGGCGTGAAGA-Biotin-TEG

5S komp. 3 AGCTTCCTACCCTCGCAGGCAGTTT-Biotin-TEG

AT pradmuo GCCTTGGCACCCGAGAATTCCA

Baseclick

PT hTNNNNNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG-ddC

PC hCNNNNNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG-ddC

1U aUNNNNNNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG-ddC

1C aCNNNNNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG-ddC

2U NaUNNNNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG-ddC

2C NaCNNNNNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG-ddC

U CaUCCNNNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG-ddC

C AaCTCNNNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG-ddC

Vektoriai

pGEX-DmHen1 – Mikiko C. Siomi dovana. Keio University School of
Medicine, Tokijas, Japonija.

pGEX-DmHen1ΔC – sukonstruota VU GMC BTI DMTS Linos
Vasiliauskaitės.

pGEX-HsHen1 – sukonstruota VU GMC BTI DMTS Viliaus Kurausko.

pTZ19-siR43/60/80 – sukonstruota VU GMC BTI DMTS Linos
Vasiliauskaitės.

pUC19/SmaI – *Thermo Fisher Scientific*.

pUC19-T7II-siR43/60/80-HDV – sukonstruotos šio darbo metu.

2.1.4 Baltymai ir fermentai

Phusion™ High-Fidelity DNR polimerazė, T4 polinukleotidų kinazė, FastAP temperatūrai jautri šarminė fosfatazė, T4 DNR ligazė, Taq DNR polimerazė, DNazė I be RNazių priemaišų, PageRuler™ Plus dažytas baltymų molekulinės masės žymuo, RiboLock RNazių slopiklis, proteinazė K, RevertAid atvirkštinė transkriptazė (AT) – *Thermo Fisher Scientific*.

M-MulV AT, RNR 5'-Pirofosfohidrolazė (RppH) – *New England Biolabs*.

P1 nukleazė – *Merk*.

HsHen1, DmHen1, DmHen1ΔC – išgryninta šio darbo metu.

2.1.5 Rinkiniai

GeneJET Gel Extraction Kit, GeneJET Plasmid Miniprep Kit, TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit, Qubit RNA HS Assay Kit, Ribominus Transcriptome Isolation Kit, bacteria – *Thermo Fisher Scientific*.

Agilent High Sensitivity DNA kit, Agilent RNA 600 Nano Kit – *Agilent Technologies*.

KAPA Library Quantification Kits - Complete Kit (universal) – *Roche*.

RNA Clean & Concentrator-25 Kit – *Zymo Research*.

NEXTFLEX Small RNA-seq Kit v3 – *PerkinElmer*.

2.1.6 Bakterijų kamienai ir ląstelių linijos

Escherichia coli BL21(DE3)RIL – *Agilent Technologies*.

Escherichia coli ER2267 – *New England Biolabs*.

Lactobacillus casei BL23 – Marie-Pierre Chapot-Chartier ir Saulius Kulakausko iš Micalis Instituto, INRA, Prancūzija, dovana.

HCT116 žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linija – dr. L. Gasiulės dovana.

2.1.7 Tirpalai ir terpės

Darbai su bakterijomis naudoti tirpalai ir terpės

LB terpė	1% triptono, 0,5% mielių ekstrakto, 0,5% NaCl
Agarizuota LB terpė	LB terpė, 2% agaru
HMCK buferis	10 mM HEPES, 55 mM MnCl ₂ , 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl

Baltymų gryninimui naudoti tirpalai

Ląstelių ardymo buferis, pH 7,6	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 10% sacharozės, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 1 μM pepstatino, 0,5 mM PMSF, 1 tabletė <i>Complete EDTA-free</i> proteazių inhibitorių kokteilio
Baltymų gryninimo buferis 1, pH 7,3	140 mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 1 mM EDTA
Baltymų gryninimo buferis 2, pH 8,0	50 mM Tris-HCl, 10 mM GSH, 1 mM DTT
Baltymų gryninimo buferis 3, pH 8,0	50 mM Tris-HCl
Baltymų gryninimo buferis 4, pH 8,0	50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl

Baltymų dializės buferis, pH 8,0	25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1% Triton X-100
2,5× NDS-PAGE elektroforezės mėginio dažas, pH 6,8	0,25 M Tris-HCl, 12% glicerolio, 2% NDS, 1,5% DTT, 0,0005% bromfenolio mėlio
4× Tris/NDS buferis, pH 6,8	0,5 M Tris-HCl, 0,4% NDS
4× Tris/NDS buferis, pH 8,8	1,5 M Tris-HCl, 0,4% NDS
Kumasi R-250 tirpalas	0,05% Brilliant Blue R 250, 50% etanolio, 10% CH ₃ COOH

RNR modifikavimui ir analizei naudoti tirpalai

1× Boratinis buferis, pH 8,2	100 mM H ₃ B ₃ O ₃ , 2 mM EDTA, 15 mM CH ₃ COOH
5× TBE, pH 8,0	445 mM Tris-HCl, 445 mM H ₃ BO ₃ , 10 mM EDTA
RNR eliuacijos buferis	0,5 M CH ₃ COONH ₄ , 0,1% NDS, 0,1 mM EDTA
Baltymų skiedimo buferis, pH 7,4	10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA, 0,1% Triton X-100, 2 mM DTT, 50% glicerolio, 0,02 a.v./μl RiboLock RNazių slopiklio
Modifikavimo reakcijos buferis, pH 7,4	10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5% glicerolio, 10 mM CoCl ₂ , 0,2 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 0,04 a.v./μl RiboLock RNazių slopiklio
Cy3 reakcijos buferis, pH 7,0	0,1 M Tris-HCl, 0,2 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 10 mM CoCl ₂ , 50 μM triptofano
Stabdymo buferis, pH 7,5	20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,5% NDS
Boratinis buferis, pH 8,6	4,375 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , 50 mM H ₃ BO ₃
Boratinis buferis, pH 9,5	33,75 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , 50 mM H ₃ BO ₃
P1 buferis, pH 6,5	10 mM NaOAc, 1mM Zn(OAc) ₂
Surišimo buferis, pH 7,4	10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA, 5% glicerolio
5× TB buferis, pH 7,5	445 mM Tris-HCl, 445 mM H ₃ BO ₃
2× Surišimo ir plovimo buferis, pH 7,5	10 mM Tris-HCl, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,2% Tween-20

4× SSC-formamido buferis, pH 7,0	0,6 M NaCl, 0,06 M natrio citratas, 50% formamido
Sulydymo buferis, pH 7,4	7,5 mM HEPES-KOH, 25 mM KCl, 0,5 mM MgCl ₂
TE buferis, pH 7,0	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
STOP tirpalas	95% etanolio, 5% rūgštinio fenolio

2.2 Metodai

2.2.1 Hen1 metiltransferazių gryninimas

2.2.1.1 *E. coli* kompetentinių ląstelių paruošimas ir transformacija

Kompetentinių ląstelių paruošimas

Kompetentinių ląstelių paruošimui vienos kolonijos *E. coli* BL21(DE3)RIL bakterijos 18°C temperatūroje 200 ml LB terpėje, 200 rpm greičiu besisukančiame termostate, užaugintos iki $OT_{600\text{ nm}} = 0,6$. Bakterijos surinktos centrifuguojant 10 min. 4°C 1500×g greičiu ir 10 min. inkubuotos 80 ml ledo šaltumo HMCK buferyje. Dar kartą surinkus minėtomis sąlygomis, po 10 min. inkubacijos 20 ml ledo šaltumo HMCK buferyje su 7% DMSO, ląstelės išpilstytos po 200 µl ir užšaldytos skystame azote.

Bakterijų transformacija

Su GST sulietų metiltransferazių raiškai *E. coli* BL21(DE3)RIL kamieno bakterijos transformuotos pGEX-DmHen1, pGEX-DmHen1ΔC ar pGEX-HsHen1 vektoriais. *E. coli* transformacija vykdyta 0,2 ml paruoštų kompetentinių ląstelių sumaišius su 0,1 µg vektoriaus, 30 min. inkubavus ledo vonioje ir 1,5 min. 42°C temperatūroje. Pridėjus 1,3 ml LB terpės, transformuotos bakterijos 1 val. inkubuotos 37°C 1400 rpm greičiu besisukančiame termostate. Bakterijos užsėtos ant 100 µg/ml ampicilino ir 10 µg/ml chloramfenikolio turinčios agarizuotos LB terpės ir 16 val. augintos 37°C temperatūroje.

2.2.1.2 Rekombinantinių baltymų raiška ir gryninimas

Rekombinantinių baltymų raiškos indukcija

Į 5 ml skystos LB terpės, su 100 µg/ml ampicilino ir 10 µg/ml chloramfenikolio, perkelti transformuotų bakterijų klonai per naktį auginti 37°C temperatūroje 200 rpm greičiu besisukančiame termostate. 100 kartų skiestos naktinės bakterijų kultūros 500 ml skystos LB terpės 37°C 200 rpm greičiu besisukančiame termostate augintos iki $OT_{600\text{ nm}} = 0,6$. Temperatūrą sumažinus iki 16°C, baltymų raiška indukuota pridėjus 0,1 mM IPTG. Po 18

val. auginimo bakterijos surinktos 15 min. centrifuguojant 4°C 400×g greičiu, suspenduotos vandenyje ir dar kartą surinktos po 15 min. centrifugavimo 4°C 500×g greičiu.

Bakterijų biomasės paruošimas

Ląstelių ardymo buferyje suspenduota bakterijų biomasė suardyta per 6 min. ultragarsu naudojant pulsinį 1 sek. trukmės 60% amplitudės režimą. Tirpi baltymų frakcija surinkta po 20 min. centrifugavimo 4°C 45000×g greičiu ir perfiltruota per 0,2 µm filtrą.

Pirmasis gryninimo etapas – afininė chromatografija

Siekiant išvengti nukleazių priemaišų, baltymai gryninti dviem žingsniais pasitelkiant afininę ir jonų mainų chromatografiją ÄKTA purifier (*GE Healthcare*) sistema. Pirmajame etape tirpi, filtruota baltymų frakcija užnešta ant pagal gamintojo rekomendacijas paruoštos 5 ml GSTrap HP (*GE Healthcare*) kolonėlės. Su sorbentu nesąveikavę ir silpnas sąveikas sudarę baltymai pašalinti kolonėlę plaunant Baltymų gryninimo buferiu 1 ir 1-10% 10 mM GSH turinčiu Baltymų gryninimo buferiu 2. Su GST sulieti tiksliniai baltymai išgryninti naudojant 100% Baltymų gryninimo buferio 2.

Natrio dodecilsulfato-piliakrilamidinė gelelektroforezė – NDS-PAGE

Tikslinio baltymo kiekis po pirmojo gryninimo gautose frakcijose įvertintas NDS-PAGE metodu. 5 min. 95°C temperatūroje su NDS-PAGE elektroforezės mėginio dažu pakaitinti mėginiai išfrakcionuoti iš 4% koncentruojančiojo (4× Tris/NDS pH 6,8, 4% AA-bisAA (37,5:1), 0,04% APS, 0,02% TEMED) ir 10% frakcionuojančiojo (4× Tris/NDS pH 8,8, 10% AA-bisAA (37,5:1), 0,04% APS, 0,02% TEMED) gelio sudarytoje NDS-PAGE sistemoje, užpildytoje 1× NDS-PAGE buferiu, naudojant tokius srovės parametrus: 10 min. 100 V, 10 min. 100 V-200 V gradientą ir 25 min. 200 V. NDS-PAGE nudažytas jį 2 min. pakaitinus 500 W galia mikrobangų krosnelėje su Kumasi R-250 tirpalu ir 3 min. 700 W galia su H₂O. Po abiejų kaitinimų gelis 10 min. inkubuotas 150 rpm greičiu besisukančioje horizontalioje purtyklėje.

Antrasis gryninimo etapas – jonų mainų chromatografija

Didžiausią tikslinio baltymo kiekį turėjusios frakcijos sujungtos ir užneštos ant pagal gamintojo rekomendacijas paruoštos 5 ml HiTrap Q HP (*GE Healthcare*) anijonų mainų kolonėlės. Po plovimo Baltymų gryninimo buferiu 3 ir 1-5% 1M NaCl turinčiu Baltymų gryninimo buferiu 4, tiksliniai baltymai išgryninti naudojant 5-100% Baltymų gryninimo buferio 4 gradientą.

Didžiausią tikslinio baltymo kiekį turėjusios, NDS-PAGE metodu įvertintos frakcijos sujungtos ir du kartus – 2 ir 16 val. – dializuotos mažesnius už 14 kDa dydžio baltymus praleidžiančioje dializės žarnelėje, Baltymų dializės buferyje be ir su 50% glicerolio, atitinkamai.

Baltyminių preparatų koncentracijos ir grynumo įvertinimas

Po gryninimo gautų baltyminių preparatų koncentracija įvertinta Bredfordo metodu naudojant Roti-Nanoquant (*Carl Roth*) dažą Synergy H4 (*Biotek*) plokštelių skaitytuvu pagal gamintojo rekomendacijas. Grynumas – NDS-PAGE metodu Kumasi R-250 dažytą gelį nuskenavus Fujifilm FLA-5100 skeneriu ir atskirų juostelių intensyvumą įvertinus MultiGauge v.3.0 programa.

2.2.2 RNR substratų paruošimas

2.2.2.1 43, 60 ir 80 nt ilgio RNR koduojančių vektorių konstravimas

PGR produktų gavimas

In vitro transkripcijos metu siekiant gauti homogeniškas 43, 60 ir 80 nt ilgio RNR – siR43, siR60 ir siR80, atitinkamai, – jas koduojančios sekos buvo sulietos su T7 II klasės promotoriumi 5'-gale ir hepatito D viruso (HDV) ribozimu 3'-gale (207) trijų PGR reakcijų metu. Pirmoje PGR reakcijoje T7 II klasės promotoriaus, konkrečios RNR, bei HDV ribozimo 5'-galo seka buvo padauginta kaip matricą naudojant atitinkamą RNR koduojantį pTZ19-siR43/60/80 vektorių, T7 II klasės promotoriaus seką turintį T7II-Fw ir RNR 3'-galui bei HDV ribozimo 5'-daliai komplementarų siR-HDV-Rv pradmenis. Antroje PGR reakcijoje HDV ribozimo seka gauta pasitelkus dalinai komplementarius HDV-Fw ir HDV-Rv pradmenis. Trečioje PGR reakcijoje, sumaišius pirmų dviejų reakcijų metu padaugintus PGR produktus, ir naudojant T7II-Fw bei HDV-Rv pradmenis, gauti visas reikiamas sekas turintys 143, 160 ir 180 nt ilgio fragmentai. Visos PGR reakcijos atliktos naudojant Phusion™ High-Fidelity DNR polimerazę (*Thermo Fisher Scientific*) pagal gamintojo rekomendacijas.

Elektroforezė agaroziniame gelyje

PGR produktų dydis įvertintas mėginius sumaišius su 6× DNR leidimo dažu ir išfrakcionavus 2,5% agaroziniame gelyje, 1× Boratiniame buferyje, 45 V/cm elektriniame lauke. DNR vizualizuota gelį 7 min. inkubavus su 2 µg/ml EtBr tirpalu ir apšvietus 312 nm ilgio banga, naudojant Biometra TI 1 transiliumatorių.

PGR fragmentų paruošimas susiuvimui

Tikslinio dydžio PGR produktai išgryninti iš 2,5% agarozinio gelio naudojant GeneJET Gel Extraction Kit (*Thermo Fisher Scientific*). Jų koncentracija nustatyta NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*) spektrofotometru, galai fosforilinti pasitelkus T4 PNK (*Thermo Fisher Scientific*) pagal gamintojo rekomendacijas.

Vektoriaus ir PGR fragmentų susiuvimas

Paruošti PGR fragmentai susiūti su SmaI restrikcijos endonukleaze kirptu, defosforilintu pUC19 vektoriumi (*Thermo Fisher Scientific*) naudojant T4 DNR ligazę (*Thermo Fisher Scientific*) pagal gamintojo rekomendacijas. Gauti pUC19-T7II-siR43/60/80-HDV vektoriai transformuoti į *E. coli* ER2267 kamieno bakterijas (2.2.1.1 skyrius) ir užsėti ant 100 µg/ml ampicilino ir 15 µg/ml kanamicino turinčios agarizuotos LB terpės.

Po transformacijos gautų kolonijų ir vektorių analizė

Tai, jog po transformacijos užaugusios kolonijos turi vektorius su įsiūtais PGR fragmentais, patvirtinta atlikus diagnostinę PGR reakciją su pUC-Fw ir pUC-Rv pradmenimis, naudojant Taq DNR polimerazę (*Thermo Fisher Scientific*) pagal gamintojo rekomendacijas, ir gautus fragmentus išfrakcionavus agaroziniame gelyje. Pasirinktas kolonijas per naktį užauginus 5 ml skystos LB terpės su ampicilino ir kanamicino antibiotikais, plazmidės išskirtos naudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit (*Thermo Fisher Scientific*). Jų seka nuskaityta VU GMC BTI Sekvenavimo centre.

2.2.2.2 43, 60 ir 80 nt RNR *in vitro* transkripcija

In vitro transkripcija

In vitro transkripcijai matrica naudoti nuo sukonstruotų vektorių su T7II-Fw ir HDV-Rv pradmenimis padauginti ir iš 1% agarozės gelio GeneJET Gel Extraction Kit (*Thermo Fisher Scientific*) rinkiniu išgryninti PGR produktai. Reakcijos atliktos pasitelkus TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (*Thermo Fisher Scientific*) rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. Po 4 val. inkubacijos 37°C, DNR matrica pašalinta veikiant RNazių priemaišų neturinčia DNaze I (*Thermo Fisher Scientific*) pagal gamintojo rekomendacijas.

RNR analizė denatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje – dPAG

In vitro transkripcijos mišinys sumaišytas su 2× RNR leidimo dažų, 10 min. pakaitintas 70°C temperatūroje ir išfrakcionuotas 13% denatūruojančiame

poliakrilamidiniame gelyje (1× TBE pH 8,3, 13% AA-bisAA (19:1), 40% urėjos, 0,03% APS ir 0,03% TEMED), 1× TBE buferyje, naudojant tokius srovės parametrus: 5 min. 45 W ir 55 min. 65W.

RNR gryninimas iš dPAG

RNR mėginiai vizualizuoti gelį perkėlus ant UV šviesoje fluorescuojančios TLC-PET celiuliozės plokštelės bei apšvietus jį 254 nm šviesa. Tikslines RNR atitinkančios juostelės išpjautos iš gelio, susmulkintos ir 2,5 val. inkubotos RNR eliucijos buferyje 37°C 600 rpm greičiu besisukančiame termostate. Gautas eliuatas sumaišytas su 1/10 jo tūrio 3M NaOAc (pH 5,2) ir 20 mg/ml glikogeno mišiniu, paruoštu nurodytus komponentus sumaišius santykiu 19:1, bei 3 tūriais 96% EtOH. RNR išsodinta po 1 min. inkubacijos skystame azote ir 15 min. centrifugavimo 4°C 16000×g greičiu. RNR nuosėdos nuplautos 1 tūriu 75% EtOH, 3 min. centrifuguojant 4°C 16000×g greičiu. RNR ištirpinus nukleazių neturiniame vandenyje, jos koncentracija įvertinta NanoDrop 2000 spektrofotometru.

2.2.2.3 ³²P-žymėtų RNR substratų paruošimas

In vitro transkripcijos metu susintetintos RNR 30 min. 37°C defosforilintos naudojant 0,1 a.v./μl FastAP temperatūrai jautrią šarminę fosfatazę, 7,5 μM RNR ir 0,5 a.v./μl RiboLock RNazių slopiklio. Reakcija sustabdyta mėginį 5 min. inkubavus 75°C. 5 μM defosforilintos RNR radioaktyviu fosforu pažymėti 15 min. 37°C temperatūroje reakcijos mišinyje su 1 a.v./μl T4 PNK, 0,2 μM [γ -³²P]ATP, 0,5 a.v./μl RiboLock RNazių slopiklio, naudojant T4 PNK B buferį. T4 PNK inaktyvuota mėginį 10 min. pakaitinus 70°C. Sintetinės RNR ³²P pažymėtos atlikus tik jų fosforilimo reakciją T4 PNK A buferyje.

2.2.3 Hen1 metiltransferazių fermentinio aktyvumo tyrimas

2.2.3.1 RNR modifikavimas ir analizė denatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje

RNR modifikavimas

0,02-0,2 μM ³²P-RNR modifikuota Modifikavimo reakcijos buferyje su 1-20 mM CoCl₂, 37°C temperatūroje 30 min. reakcijos mišinyje esant 1-2 μM Baltymų skiedimo buferyje skistos metiltransferazės, 0,1 mM AdoMet 1/Ado-6-amino 2/Ado-6-azido 3 ar 0,05 mM Ado-13 biotino 4. Tiriant skirtingų metalo kofaktorių įtaką modifikavimo reakcijos efektyvumui, CoCl₂ buvo pakeistas atitinkamo metalo chlorido druska (Co³⁺ atveju naudotas [Co(NH₃)₆]Cl₃), išskyrus nikelio sulfatą. Reakcijose su 3-6 μM Ado-14-Cy3

5, RNR modifikuota 1 val. Cy3 reakcijos buferyje. Modifikavimo reakcijos sustabdytos jas sumaišius su lygiu tūriu 2 mg/ml proteinazės K turinčiu Stabdymo buferiu ir 20 min. pakaitinus 55°C.

IO₄ oksidacijos/β-eliminacijos reakcija

Reakcijose su AdoMet 1, Ado-6-amino 2 ir Ado-6-azido 3 modifikuotos RNR dalis nustatyta atlikus IO₄ oksidacijos/β-eliminacijos reakcijas (208). Šiuo tikslu RNR pirmiausia buvo išsodinta naudojant 1/10 tūrio 3M NaOAc (pH 5,2) ir 20 mg/ml glikogeno, sumaišytų santykiu 19:1, bei 3 tūrius 96% EtOH, 30 sek. atšaldžius skystame azote ir 12 min. kambario temperatūroje centrifuguojant 16000×g greičiu. RNR nuosėdos plautos keturiais tūriais 75% EtOH 5 min. centrifuguojant 16000×g greičiu. RNR ištirpinta 17 μl 60 mM Boratiniame buferyje (pH 8,6) ir, pridėjus 3 μl 0,2 M NaIO₄, 15 min. inkubuota tamsoje kambario temperatūroje. IO₄ oksidacijos reakcija sustabdyta pridėjus 3 μl 67% glicerolio po 10 min. inkubacijos. Išsodinus RNR, β-eliminacijos reakcijai RNR ištirpinta 20 μl 60 mM Boratinio buferio (pH 9,5) ir 1,5 val. inkubuota 45 °C.

Modifikuotos RNR analizė dPAG

Sumaišius su lygiu tūriu 2× RNR leidimo dažo ir 5 min. pakaitinus 85°C, RNR mėginiai išfrakcionuoti 10-13% dPAG kaip aprašyta 2.2.2.2 skyriuje. Vakuuminiame gelių džiovavimo aparate 1 val. 65°C išdžiovintas gelis eksponuotas ant radiacijai jautraus ekrano, kuris nuskenuotas Fujifilm FLA-5100 skeneriu, naudojant 635 nm lazerį ir IP filtrą. Gauti rezultatai išanalizuoti MultiGauge v.3.0 programa.

2.2.3.2 RNR modifikavimo reakcijų greičio nustatymas vienos apšukos sąlygomis

Vienos apšukos modifikavimo reakcijos buvo atliktos Modifikavimo reakcijos buferyje, naudojant 0,2 μM ³²P-RNR, 2 μM Hen1 metiltransferazių, 0,1 mM AdoMet 1/Ado-6-amino 2/Ado-6-azido 3 ar 0,05 mM Ado-13-biotino 4. Po 0-60 min. inkubacijos 37°C, reakcijos sustabdytos proteinaze K ir išanalizuotos dPAG kaip aprašyta 2.2.3.1 skyriuje. Modifikavimo reakcijų greičių konstantos, k_{chem} , nustatytos naudojant vienos eksponentės lygtį GraFit 5.0.6 programa, eksperimentą pakartojus bent du kartus.

2.2.3.3 RNR modifikavimo analizė reakcijos mišinyje su dviem kofaktoriais

DmHen1 polinkis modifikuoti RNR pernešant šonines grandines nuo AdoMet 1 ar Ado-6-azido 3 kofaktorių reakcijoje esant abiejų jų mišiniui buvo ištirtas modifikavimo reakcijos buferyje naudojant 0,2 μM ³²P-siR23, 2 μM DmHen1

ir 0,1 mM kofaktorių mišinio, konkretaus kofaktoriaus daliai mėginiuose kas 10 μ M kintant nuo 0 iki 0,1 mM. 30 min. 37°C inkubuoti mėginiai išfrakcionuoti dPAG kaip aprašyta 2.2.3.1 skyriuje.

2.2.3.4 Modifikuotų nukleozidų analizė HPLC-MS metodu

2 μ M miR173 RNR modifikuoti reakcijos mišinyje esant 1 μ M metiltransferazių Modifikavimo reakcijos buferyje su 0,1 mM AdoMet 1/Ado-6-amino 2/Ado-6-azido 3 ar Ado-13-biotino 4 kofaktoriais arba Cy3 reakcijos buferyje naudojant 6 μ M Ado-14-Cy3 5. Po 1,5 val. inkubacijos 37°C, RNR išskirta pridėjus 1 tūrį chloroformo ir 2 min. centrifugavus 16000×g greičiu. RNR išsodinta kaip aprašyta 2.2.3.1 skyriuje ir ištirpinta P1 buferyje. Pridėjus 0,01 a.v./ μ l P1 nukleazės, mėginys 2 val. inkubuotas 50°C ir per naktį defoforilintas 37°C su 0,02 a.v./ μ l FastAP fosfatazės. 15 min. 70°C inaktyvuoti fermentai išsodinti mėginį centrifugavus 20000×g greičiu 40 min. 4°C. Nukleozidų analizę didelio našumo skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos HPLC-MS (angl. *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) metodu atliko Audronė Rukšėnaitė. HPLC chromatogramos ir teigiamos jonizacijos sąlygomis gauti masių spektrai išanalizuoti naudojant Agilent MassHunter Workstation B.08.00 programą.

2.2.3.5 RNR elektroforetinio judrumo pokyčio poliakrilamidiniame gelyje nustatymas

0,2 μ M 32 P-miR173 30 min. 37°C inkubuota su 1 μ M Hen1 metiltransferazių Surišimo buferyje, turinčiame 0,1 mM AdoHcy be ar su 1, 5 ir 10 mM nurodytų metalų druskų. Mėginiai analizuoti natyviame 8% poliakrilamidiniame gelyje (8% AA-bisAA (19:1), 0,5× TB buferis (pH 7,5), 0,04% APS, 0,02% TEMED), 0,5× TB buferyje (pH 7,5) 50 min. esant 200 V įtampai. Kaip ir dPAG atveju, išdžiovintas gelis eksponuotas ant radiacijai jautrių ekranų, kurį nuskenavus, gauti rezultatai įvertinti MultiGauge v.3.0 programa.

2.2.4. Hen1 metiltransferazių pritaikymas RNR žymėjimui

2.2.4.1. Dviejų žingsnių RNR žymėjimas

Dviejų žingsnių RNR žymėjimo reakcijos

0,2 μ M RNR modifikavimo reakcijos buferyje 30 min. 37 °C inkubuota su 1 μ M DmHen1 ir 0,1 mM Ado-6-amino 2/Ado-6-azido 3 ar AdoMet 1 (kontrolinė reakcija). Reakcijos sustabdytos proteinaze K kaip aprašyta

2.2.3.1 skyriuje. RNR išskirta pridėjus 1 tūrį fenolio/chloroformo/izoamilo alkoholio mišinio, 2 min. centrifugavus 16000×g greičiu, surinktą vandeninę fazę sumaišius su 1 tūrio chloroformo ir dar kartą centrifugavus minėtomis sąlygomis. RNR išsodinta kaip aprašyta 2.2.3.1 skyriuje centrifuguojant 4°C temperatūroje. 4 μM amino grupę turinčia pernešama šonine grandine modifikuotos RNR sumaišyta su Cy5-649/670-NHS-esteriu ir 1 val. inkubuota 60 mM Boratiniame buferyje (pH 8,6) kambario temperatūroje. 4 μM azido grupę turinčia pernešama šonine grandine modifikuotos RNR 1 val. 40°C inkubuota su 0,5 mg/ml Cy5.5-673/707-alkinu, 60% DMSO ir 3.3 mM šviežiai paruošto CuBr-TBTA.

Žymėtų RNR analizė dPAG

Žymėtos RNR išsodintos kaip aprašyta 2.2.3.1 skyriuje. Vandenyje ištirpinta RNR sumaišyta su lygiu tūriu 95% formamido ir 10 mM EDTA (pH 8.2) turinčiu RNR leidimo dažu, 5 min. pakaitinta 85°C ir išanalizuota 10% dPAG kaip aprašyta 2.2.2.2 skyriuje. Cy5 ir Cy5.5 fluorescencija nustatyta Fujifilm FLA-5100 skeneriu, naudojant 635 ir 670 nm lazerius bei ilgesnei nei 665 ir 705 nm bangas praleidžiančius LPR ir LPFR filtrus, atitinkamai. Bendras RNR kiekis įvertintas gelį 7 min. nudažius 2 μg/ml EtBr tirpalu bei nuskenavus naudojant 473 nm lazerį ir ilgesnes nei 510 nm bangas praleidžiantį LPB filtrą.

2.2.4.2 Vieno žingsnio RNR žymėjimas

RNR žymėjimas biotinu ir išgryninimas

0,05 mM Ado-13-biotino 4 (kontroliniuose mėginiuose – 0,1 mM AdoMet) buvo panaudota siekiant pažymėti 0,01 μM ³²P-RNR, 1 μM DmHen1 turinčiame modifikavimo reakcijos buferyje, mėginį 30 min. inkubuojant 37°C temperatūroje. Kaip aprašyta 2.2.4.1 skyriuje, po poveikio fenolio/chloroformo/izoamilo alkoholio mišiniu išgryninta ir išsodinta RNR, ištirpinta vandenyje iki 0,2 μM. 0,1 mg Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (*Thermo Fisher Scientific*) magnetinės dalelės paruoštos pagal gamintojo rekomendacijas ir suspenduotos 10 μl 2× Surišimo ir plovimo buferyje. Dalelės užblokuotos pridėjus 5 μl 0,4 mg/ml mielių tRNR, 15 min. inkubavus kambario temperatūroje mėginiui sukantis pastoviu 70 rpm greičiu. Pridėjus 5 μl 0,2 μM biotinu žymėtos RNR, inkubacija pratęsta dar 15 min. 23 ir 43 nt ilgio su magnetinėmis dalelėmis nesąveikavusios RNR atplautos pagal gamintojo rekomendacijas, ilgesnės – du kartus su 1× Surišimo ir plovimo buferiu, kartą su 4× SSC-formamidu ir kartą su 2× SSC-formamidu. Biotinu žymėta RNR nuo magnetinių dalelių nuimta po 10 min. inkubacijos 70 °C su

95% formamido ir 10 mM EDTA (pH 8,2). Su magnetinėmis dalelėmis sąveikavusios RNR ir tarpinių eksperimento stadijų mėginiai išanalizuoti 10-13% dPAG, kaip aprašyta 2.2.3.1 skyriuje.

RNR analizė Försterio rezonansinės energijos pernašos, FRET, metodu tirpale

1 μM DmHen1 ΔC buvo pasitelktas siekiant pažymėti 1 μM siR23 reakcijos mišinyje su 3 μM Ado-14-Cy3 5 ar AdoMet 1 (kontrolinė reakcija), Cy3 reakcijos buferyje, mėginį 1 val. inkubuojant 37°C temperatūroje. 0,2 μM modifikuotos RNR buvo sulydyta su 0,2 μM komplementarios DNR, turinčios Cy5 modifikaciją antroje arba penktoje pozicijoje (kontrolinėse reakcijose – nemodifikuota DNR), Sulydymo buferyje mėginį 3 min. inkubavus 85°C ir atšaldžius iki 4°C, temperatūrą mažinant 0,01°C/sek. greičiu. Iki 15 nM TE buferyje skiestų RNR mėginių fluorescencija įvertinta FluoroMax-3 (*Horiba*) spektrofluorimetru. Mėginius sužadinus 500 nm ilgio banga, emisija registruota 520-800 nm intervale, o 590 nm banga – 610-800 nm intervale. Abiem atvejais bangos ilgis keistas kas 1 nm, naudotas 0,2 sek. signalo integracijos laikas ir 5 nm sužadinimo/emisijos pralaidumas. siR23-CH₃/DNR-Cy5, siR23-Cy3/DNR, siR23-Cy3/DNR-Cy5 duplesų fluorescencijos intensyvumas įvertintas atėmus foninę siR-CH₃/DNR mėginio fluorescenciją. Gauti duomenys išanalizuoti naudojant GraphPad Prism programą.

Konkrečios RNR identifikavimas FRET metodu tirpale

Analizuojant Cy3 fluoroforu žymėtas siR23 ir let-7a2 RNR visuminės RNR mėginyje, Ado-14-Cy3 5 kiekis padidintas iki 10 μM ir į reakcijas pridėta 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ visuminės RNR, išgrynintos iš HCT116 žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linijos naudojant RNazol RT (*Molecular Research Center, Inc.*) pagal gamintojo rekomendacijas.

RNR analizė FRET metodu gelyje

RNR analizei FRET metodu gelyje anksčiau aprašytomis sąlygomis buvo paruošti 3 mėginiai: siR23-CH₃/DNR, siR23-Cy3/DNR ir siR23-Cy3/DNR-2Cy5. Santykiu 7:3 sumaišyti su 66,6% glicerolio, mėginiai išfrakcionuoti 12% poliakrilamidiniame gelyje, kaip aprašyta 2.2.3.5 skyriuje. Gelis nuskenuotas Fujifilm FLA-5100 skeneriu, naudojant 532 nm lazerį ir ilgesnes už 570 nm bangas praleidžiantį LPG filtrą bei ilgesnes už 662 nm bangas praleidžiantį LPRF filtrą. Gauti duomenys išanalizuoti MultiGauge v.3.0 programa.

2.2.5. DmHen1ΔC baltymo pritaikymas RNR sekoskaitai

2.2.5.1 N21 RNR modifikavimas, CuAAC reakcija ir atvirkštinė transkripcija

N21 RNR modifikavimas

0,2-10 μM ³²P-N21 RNR 30-60 min. 37°C modifikuota Modifikavimo reakcijos buferyje, turinčiame 0,1-0,2 mM Ado-6-azido ir 2 μM DmHen1ΔC. Reakcija sustabdyta paveikus proteinaze K, RNR išsodinta NaOAc-glikogeno-96% EtOH mišiniu ir po IO₄ oksidacijos/β-eliminacijos reakcijos išfrakcionuota dPAG, kaip aprašyta 2.2.3.1 skyriuje, arba panaudota CuAAC reakcijai.

CuAAC reakcija

CuAAC reakcija atlikta 55% DMSO reakcijos mišinyje esant 0,025-0,2 μM ³²P-RNR-azido, 1,25-10 μM alkilinto 3'-adapterio/AT pradmens (sulydytų kaip aprašyta 2.2.4.2 skyriuje) ir 3.3 mM šviežiai paruošto CuBr-TBTA 30 min. 45°C temperatūroje. Išsodintas mėginys išfrakcionuotas dPAGE metu (2.2.3.1 skyrius). Ruošiant mėginį atvirkštinei transkripcijai, 45 min. trukusiai CuAAC reakcijai naudota 20 μM RNR-azido ir 5 μM alkilinto 3'-adapterio/³²P-AT pradmens, pažymėto kaip aprašyta 2.2.2.3 skyriuje. Mėginys išsodintas (2.2.3.1 skyrius) ir ištirpintas vandenyje.

Atvirkštinė transkripcija

Kopijinės DNR, kDNR, sintezė vykdyta reakcijos mišinyje su 10 nM RNR-3'-adapterio/³²P-AT pradmens, 1 a.v./μl RiboLock RNazių slopiklio, 0,25 mM dNTP ir 10 a.v./μl RevertAid (*Thermo Fisher Scientific*) ar M-MuLV (*New England Biolabs*) atvirkštinės transkriptazės, pagal gamintojų rekomendacijas mėginius inkubuojant 38°C 2 val. arba 42°C 1 val. ir fermentus inaktyvuojant 10 min. pakaitinus 70°C ar 90°C, atitinkamai. Reakcijos efektyvumas įvertintas mėginius išfrakcionavus 13% dPAG, kaip aprašyta 2.2.3.1 skyriuje.

2.2.5.2 miRXplore kDNR bibliotekos paruošimas ir įvertinimas

miRXplore kDNR bibliotekos paruošimas

2,5 μM miRXplore RNR buvo sumaišyta su 0,1 mM EDTA, 2 min. pakaitinta 82,5°C ir 5 min. atšaldyta lede. Mėginį padalinus į dvi dalis, paruošta po dvi eksperimentines kDNR bibliotekų replikas su kiekvienu iš alkilintų 3'-adapterių. 0,2 μM miRXplore RNR 30 min. 37°C modifikuota Modifikavimo reakcijos buferyje esant 2 μM DmHen1ΔC ir 0,1 mM Ado-6-azido. Reakcija sustabdyta proteinaze K ir RNR išsodinta kaip aprašyta 2.2.3.1 skyriuje. RNR

koncentracija nustatyta Qubit fluorimetru naudojant Qubit RNA HS Assay Kit (*Thermo Fisher Scientific*) pagal gamintojo rekomendacijas. CuAAC reakcija atlikta naudojant 0,4 μM RNR-azido ir 10 μM alkilinto 3'-adapterio/AT pradmens, kaip aprašyta 2.2.5.1 skyriuje, ir išsodinta (2.2.3.1 skyrius). 0,35 pmol RNR-3'-adapterio/AT pradmens panaudota kDNR bibliotekos paruošimui su NEXTFLEX Small RNA-seq Kit v3 (*PerkinElmer*) pagal gamintojo rekomendacijas, pradedant nuo B žingsnio ir taikant šias modifikacijas: D žingsnyje naudotas 4 \times skiestas NEXTFLEX 5'-4N adapteris, G žingsnyje atlikta 18 PGR ciklą, po H1 žingsnio atliktas H2 žingsnis.

miRXplore kDNR bibliotekos įvertinimas ir sekoskaita

Paruoštos kDNR bibliotekos dydis įvertintas kapiliarinės elektroforezės metu naudojant Agilent High Sensitivity DNA kit (*Agilent technologies*), Agilent 2100 Bioanalyzer aparatu pagal gamintojo rekomendacijas. kDNR bibliotekos kiekis išmatuotas atlikus kiekybinės PGR (kPGR) reakciją naudojant KAPA Library Quantification Kits - Complete Kit (universal) (*Roche*) pagal gamintojo rekomendacijas Rotor-Gene Q (*Qiagen*) aparatu.

Iki 4 nM praskiestos miRXplore kDNR bibliotekos sumaišytos lygiomis dalimis ir nuskaitytos Lexogen padalinyje, naudojant NextSeq 500/550 High Output Kit (*Illumina*) rinkinį ir nuskaitant 75 nukleotidus nuo vienos iš kDNR grandinių.

miRXplore sekoskaitos duomenų analizę atliko K. Kvederavičiūtė. 16-os 3'-galinių miRXplore RNR nukleotidų sekų LOGO buvo paruoštas naudojant WEBLOGO įrankį (209).

2.2.5.3 *Lactobacillus casei* BL23 sRNR kDNR bibliotekos paruošimas

L. casei biomasės paruošimas

Trys iš pavienių kolonijų užsėtos *L. casei* BL23 naktinės kultūros užaugintos 40 ml Lactobacilli MRS Broth terpėje 37°C temperatūroje. Išmatavus jų optinį tankį ties 600 nm, naktinės kultūros 200 ml minėtos terpės atskiestos iki 0,1 OV ir augintos kas 1,5 val. matuojant OT iki vienos iš šešių augimo stadijų ankstyvoje ($OT_{600\text{ nm}} = 0,2$), vidurinėje ($OT_{600\text{ nm}} = 0,9$) ir vėlyvoje ($OT_{600\text{ nm}} = 3,1; 6,0$) eksponentinėje bei stacionarioje augimo fazėje ($OT_{600\text{ nm}} = 8,5; 10,0$). Lygus kiekis bakterijų sumaišytas su 1/8 tūrio dalimi ledo šaltumo STOP tirpalu. Bakterijos surinktos centrifuguojant 1800 \times g greičiu 20 min. 4°C ir laikytos -80°C.

L. casei visuminės RNR išskyrimas ir kokybės įvertinimas

Vieno biologinio pakartojimo visų šešių augimo stadijų užšaldytos ląstelės sumaišytos ir sutrintos naudojant skystą azotą. Iš 100 mg sutrintų ląstelių visuminė RNR išgryninta RNazol RT (*Molecular Research Center, Inc.*) reagentu pagal gamintojo rekomendacijas. Išskirtos RNR koncentracija įvertinta NanoDrop 2000 spektrofotometru, kokybė – kapiliarinės elektroforezės metu naudojant Agilent RNA 600 Nano Kit (*Agilent Technologies*) pagal gamintojo rekomendacijas.

RNR paruošimas kDNR bibliotekos ruošimui

Visuminė RNR paveikta RNazių priemaišų neturinčia DNaze I (*Thermo Fisher Scientific*) pagal gamintojo rekomendacijas ir išgryninta naudojant RNA Clean & Concentrator-25 Kit (*Zymo Research*). rRNR pašalintos pasitelkus Ribominus Transcriptome Isolation Kit, bacteria, (*Thermo Fisher Scientific*) naudojant 2 μ l rinkinyje pateiktų, 23S ir 16S rRNR komplementarių pradmenų ir 2 μ l 100 μ M koncentracijos 5S rRNR specifinių, trijų biotinu modifikuotų pradmenų (5S komp. 1-3) mišinį. Ribosominių RNR pašalinimo efektyvumas įvertintas atlikus kapiliarinės elektroforezė Agilent RNA 600 Nano Kit (*Agilent Technologies*) rinkiniu pagal gamintojo rekomendacijas. Po išsodinimo etanoliu, 50-500 nt ilgio RNR išgrynintos iš 8% dPAG. Iš piestele sutraiškytų gelio gabalėlių RNR eliuota naudojant 500 μ l RNR eliacijos buferį, 4 val. inkubuojant 25°C 300 rpm greičiu besisukančiame termostate. Gautas eliuatas surinktas 10 min. centrifuguojant 16000 \times g greičiu naudojant Corning Costar Spin-X 1,5 ml mėgintuvėliams pritaikytus filtrus (*Merk*). RNR išsodinta kaip aprašyta 2.2.2.2 skyriuje, pirmą kartą centrifuguojant 30 min., o su 75% EtOH – du kartus po 5 min. 5'-PPP-RNR hidrolizuota iki 5'-P-RNR pasitelkus RppH (*New England Biolabs*) pagal gamintojo rekomendacijas ir iš reakcijos mišinio išgryninta naudojant RNA Clean & Concentrator-25 Kit (*Zymo Research*).

kDNR bibliotekų paruošimas mDOT-seq metodu

1,6 μ M RNR 2 min. pakaitinus 82,5°C su 0,1 mM EDTA ir 5 min. atšaldžius ledo vonioje, 0,2-0,3 μ M RNR modifikuota azido grupę turinčia pernešama grandine ir 0,2 μ M RNA-azido panaudoti CuAAC reakcijai kaip aprašyta 2.2.5.2 skyriuje. 2 pmol RNR-3'-adapterio pradendant nuo B žingsnio toliau paruošti pagal NEXTFLEX Small RNA-seq Kit v3 (*Perkin Elmer*) protokolą pagal gamintojo rekomendacijas pradendant nuo B žingsnio, pritaikius nurodytas modifikacijas: D žingsnyje naudotas 4 \times skiestas NEXTFLEX 5'-4N adapteris, E žingsnyje mėginio inkubacija 42°C pratęsta iki 60 min., G

žingsnyje atlikta 15 PGR ciklų, o F ir H1 žingsniai atlikti pagal alternatyvų Preparing Libraries without Size Selection protokolą.

kDNR bibliotekų paruošimas standartiniu metodu

N bibliotekos paruoštos naudojant 2 p_{mol} RppH paveiktos RNR pagal NEXTFLEX Small RNA-seq Kit v3 protokolą (*Perkin Elmer*), remiantis gamintojo rekomendacijomis, E, F ir H1 žingsnius modifikavus kaip mDOT-seq bibliotekų paruošimo atveju, o G žingsnyje atlikus 12 PGR ciklų.

kDNR bibliotekų įvertinimas ir sekoskaita

Abiem metodais paruoštų bibliotekų koncentracija ir kokybė įvertinta kaip nurodyta 2.2.5.2 skyriuje. Iki 4 nM skiestos ir lygiomis dalimis sumaišytos bibliotekos nuskaitytos Lexogen padalinyje, naudojant NextSeq 500/550 Mid Output Kit (*Illumina*), nuskaitant po 75 nukleotidus nuo abiejų kDNR grandinių.

Sekoskaitos duomenų analizė

L. casei sRNR sekoskaitos duomenų analizę atliko K. Kvederavičiūtė. Nuskaitymai buvo vizualizuoti ir analizuoti naudojantis Integrative Genomic Viewer programa (210). APERO v1.0.3 nuspėtos potencialios sRNR papildomai įvertintos tolimesnei analizei paliekant tik tas, kurių nuskaitymų kiekis ties 5'- ir 3'-ribomis 2 nt intervale išaugo daugiau nei 3 kartus bent viename iš biologinių pakartojimų. Tais atvejais, kai remiantis minėtu reikalavimu didžiaja sekos dalimi persidengiančioms sRNR skirtingose bibliotekose buvo priskirtos skirtingos koordinatės, bendram sRNR sąrašui pasirinktas ilgiausias sRNR variantas ir jo koordinatės. Nuspėtų sRNR pasiskirstymo genome žemėlapis sugeneruotas DNAPlotter įrankiu (212), Veno diagrama – Venn Diagram Plotter programa (<https://omics.pnl.gov/software/venn-diagram-plotter>), sRNR konservatyvumo žemėlapis – Heatmapper programa (<http://www.heatmapper.ca/expression/>). Skirtingose bibliotekose identifikuotų sRNR savybės statistiškai įvertintos past3 programa (213).

Potencialias sRNR *Northern* hibridizacijos metodu patvirtino R. Mineikaitė.

3. REZULTATAI

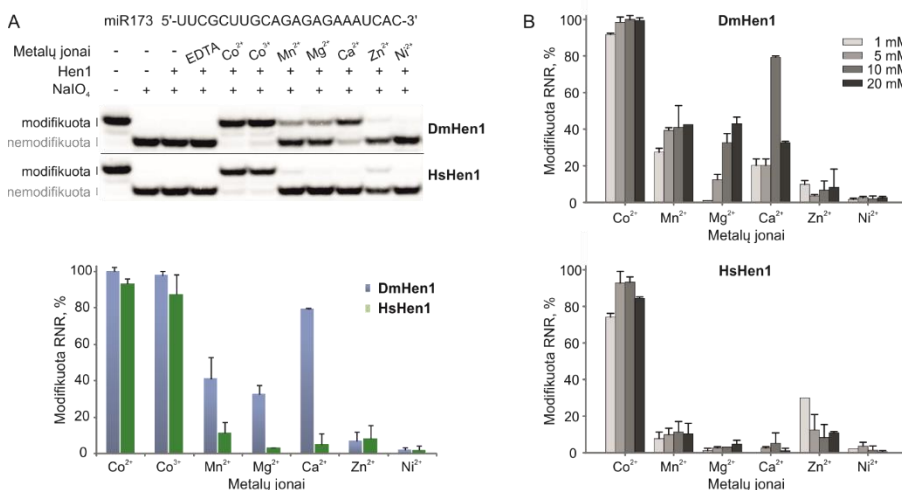
3.1 Hen1 metiltransferazių fermentinio aktyvumo tyrimas

Hen1 metiltransferazės – tai bakterijose ir eukariotuose sutinkami fermentai, pasižymintys konservatyviu metiltransferaziniu (MTaziniu) domenu bei pernešantys metilo grupę nuo *S*-adenozil-*L*-metionino (AdoMet) kofaktoriaus ant 3'-galinio RNR nukleotido 2'-O-ribozės. Pagal domeninę struktūrą ir modifikuojamus RNR substratus šie baltymai išskiriami į keturias pošeimes: (i) daugiadomenes miRNR ir siRNR dupleksus metilinančias augalų metiltransferazes, po papildomą sritį C- ir N-galuose, atitinkamai, turinčias (ii) viengrandines piRNR ir su specifiniais baltymais sąveikaujančias siRNR ir miRNR modifikuojančius gyvūnų baltymus ir (iii) ribotoksinų hidrolizuotas tRNR metilinančius bakterijų fermentus bei (iv) tik iš katalizinio domeno sudarytas bakterijų metiltransferazes, apie kurių substratinį specifiškumą šiuo metu nėra duomenų (3). Dar prieš dešimtmetį buvo parodyta, jog gyvūnų Hen1 metiltransferazės ląstelėse modifikuoja 21-33 nt ilgio viengrandines mažąsias RNR, taip apsaugodamos pastarąsias nuo uridilinio ir degradacijos (11,126). Apie fermentines gyvūnų metiltransferazių savybes šio darbo pradžioje nebuvo beveik jokių duomenų. Užsibrėžę užpildyti egzistuojančią žinių spragą, išgryninome su glutationo *S*-transferaze (GST) sulietus *Drosophila melanogaster* DmHen1 ir žmogaus HsHen1 baltymus ir pradėjome jų tyrimą siekdami nustatyti metalo kofaktoriaus poreikį, substratinį ir kofaktoriaus specifiškumą bei jų vykdomos metilinimo reakcijos greitį.

3.1.1 RNR metilinimo reakcijos priklausomybė nuo metalo kofaktoriaus

Detaliau ištirtos Hen1 metiltransferazės pasižymi skirtingu metalo jonų specifiškumu, pavyzdžiui, 21-24 nt miRNR ir siRNR dupleksus modifikuojanti *Arabidopsis thaliana* AtHEN1 metiltransferazė funkcionuoja reakcijos mišinyje esant Mg^{2+} jonams (4), tačiau pastarieji slopina bakterinės *Clostridium thermocellum* CtnHen1 metiltransferazės aktyvumą, kuriam būtini divalenciniai mangano jonai (131). Siekdami nustatyti efektyviausią DmHen1 ir HsHen1 katalizuojamą modifikaciją užtikrinančią metalo kofaktorių, atlikome RNR metilinimo eksperimentus reakcijos mišiniuose su baltymo ir metalo jonų pertekliumi. Modifikuotos 22 nt viengrandinė ^{32}P žymėtos miR173 RNR dalį nustatėme atlikę IO_4^- oksidacijos/ β -eliminacijos reakcijas. Jų metu nuo nemetilintos RNR buvo nuskeltas 3'-galinis nukleozidas, todėl denatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje (dPAG)

išfrakcionuota nemodifikuota RNR pasižymėjo didesniu, o modifikuota – atvirkščiai, mažesniu elektroforetiniu judrumu (208). Pradiniai eksperimentai atlikti su DmHen1 ir HsHen1 metiltransferazėmis parodė, jog nei mangano, nei magnio jonai neužtikrina efektyvios RNR modifikacijos (Pav. 3.1). Metilintos RNR dalis reakcijose su Mn^{2+} ir Mg^{2+} tesiekė atitinkamai 39 ir 33% bei 11 ir 3% DmHen1 ir HsHen1 atvejais. Vis dėlto, tai, jog metalų jonai yra būtini tiriamų metiltransferazių katalizuojamai reakcijai, patvirtinome reakcijomis be pridėto metalo kofaktoriaus ir su metalų jonus surišančiu EDTA – abiem atvejais visa reakcijos mišinyje buvusi ^{32}P -miR173 liko nemodifikuota.



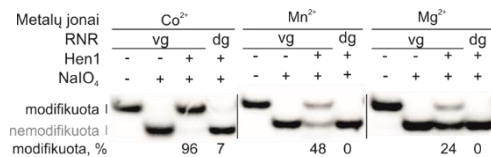
Pav. 3.1. DmHen1 ir HsHen1 katalizuojamo vgRNR metilinimo priklausomybė nuo metalo kofaktoriaus. A. Co^{2+} ir Co^{3+} jonai užtikrina efektyvų vgRNR metilinimą. 0,2 μM 22 nt ilgio ^{32}P -miR173 buvo modifikuota reakcijos mišinyje, turinčiame 100 μM AdoMet 1, 10 mM nurodytų metalų chloridų druskų ($CoCl_2$ ir $[Co(NH_2)_6]Cl_3$, Co^{2+} ir Co^{3+} atveju, atitinkamai), išskyrus nikelio sulfatą, ir 1 μM Hen1 metiltransferazių. Po 30 min. inkubacijos 37°C modifikuotos RNR dalis buvo nustatyta atlikus IO_4^- oksidacijos/ β -eliminacijos reakciją (208), išfrakcionavus mėginį 13% dPAG ir vizualizavus radiacijai jautrių fotoekranų pagalba. B. Metilinimo reakcijos efektyvumo priklausomybė nuo skirtingų jonų koncentracijos. Histogramose pateikta modifikuotos RNR dalis įvertinta eksperimentą atlikus bent du kartus.

Efektyvų tiriamų metiltransferazių vykdomą modifikavimą užtikrinančius metalo jonų paiešką pratęsėme ištyrę keletą plačiau paplitusių metalo kofaktorių: Ca^{2+} ir tris pereinamųjų metalų jonus – Co^{2+} , Ni^{2+} ir Zn^{2+} (Pav. (Pav. 3.1). Šiuo atveju mūsų pačių nuostabai gauti rezultatai parodė, jog reakciją katalizavus ir DmHen1, ir HsHen1 visa reakcijos mišinyje buvusi vgRNR buvo visiškai modifikuota naudojant divalenčius kobalto jonus.

Panašus, daugiau nei 90% reakcijos mišinyje buvusios miR173 metilinimas nustatytas ir su Co^{3+} jonais. Tokie pat rezultatai gauti su Co^{2+} ir Co^{3+} reakciją atlikus argono atmosferoje, apsaugančioje Co^{2+} nuo papildomos oksidacijos (rezultatai nepateikti) patvirtino, jog iš tiesų dviejų skirtingų oksidacinių laipsnių kobalto jonai geba katalizuoti DmHen1 ir HsHen1 metiltransferazių vykdomą reakciją. Itin aukštas modifikavimo efektyvumas su DmHen1 buvo pasiektas į reakcijos mišinį pridėjus Ca^{2+} jonų (79%), tačiau HsHen1 metiltransferazės vykdomos reakcijos jie nekatalizavo.

Taigi, gauti rezultatai rodo, jog tiriamos metiltransferazės *in vitro* pasižymi šiai baltymų klasei nebūdingu nuo Co^{2+} ir Co^{3+} priklausomu fermentiniu aktyvumu. HsHen1 efektyvumas yra griežtai nulemtas šių metalų kofaktorių. DmHen1 RNR modifikuoja ir pasitelkdamas Ca^{2+} , Mn^{2+} ir Mg^{2+} jonus, nors tirtomis sąlygomis pastarosios reakcijos nėra efektyvios.

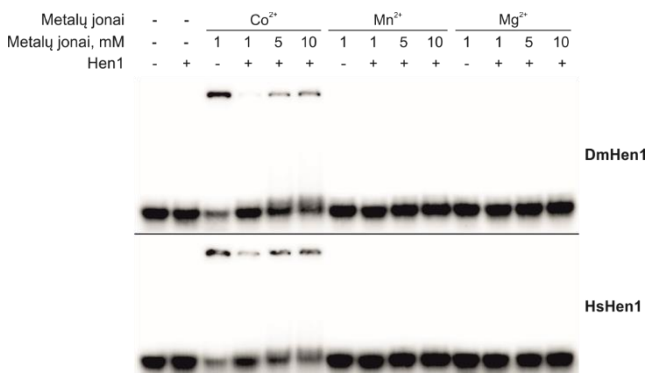
Išskirtinis antros pošeimės Hen1 metiltransferazių specifiskumas būtent viengrandinei RNR *in vitro* reakcijose yra parodytas tik su Mg^{2+} jonais (5–7,115). Nustatę, jog Mg^{2+} neužtikrina visiškos RNR substrato modifikacijos, nusprendėme patikrinti, ar reakciją papildomai katalizuojantys Co^{2+} jonai nepakeičia Hen1 metiltransferazių substratinio specifiskumo būtent viengrandinės RNR atžvilgiu. Eksperimentai atlikti DmHen1 baltymui modifikuojant miR173 ar iš šios RNR bei jai visiškai komplementarios miR173k sudarytą dupleską patvirtino, jog metilinimo reakciją katalizuojant Co^{2+} , Mn^{2+} ar Mg^{2+} jonams, visais atvejais efektyviau modifikuojama yra būtent viengrandinė RNR (Pav. 3.2).



Pav. 3.2. Viengrandinės ir dvigrandinės RNR metilinimas veikiant DmHen1 metiltransferazei ir reakcijos mišinyje esant skirtingiems metalų jonams. Reakcija atlikta kaip aprašyta Pav. 3.1, išskyrus tai, jog buvo naudota $0,2 \mu\text{M}$ ^{32}P -miR173 arba ^{32}P -miR173/miR173k RNR. vg – viengrandinė miR173, dg – dvigrandinė RNR, sudaryta iš miR173 ir jai komplementarios miR173k.

Hen1 metiltransferazėms nebūdingo metalo kofaktoriaus poreikis paskatino atsakyti ir į dar vieną klausimą – ar sąveikaudamos su Co^{2+} jonais gyvūnų metiltransferazės sudaro stabilius kompleksus su modifikuojama RNR. Nors gyvūnų Hen1 polipeptidinėje sekoje, priešingai nei jų augalų homologų atveju, neišskiriamas RNR surišantis domenas (3), vis dėlto, iki šiol nebuvo patikrinta ar tikrai toks surišimas nėra galimas, ar ir kaip jis

priklauso nuo metalo kofaktoriaus. Atlikę RNR elektroforetinio judrumo gelyje poslinkio eksperimentus (angl. *Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA*) nustatėme, jog nei reakcijos mišinyje esant Co^{2+} , nei mažesnę modifikavimo efektyvumą užtikrinantiems Mn^{2+} ar Mg^{2+} jonams tiriami fermentai nesudaro stabilaus kompleksu su RNR substratu (Pav. 3.3). Remdamiesi gautais rezultatais mes manome, jog ląstelėje DmHen1 ir HsHen1 galėtų modifikuoti RNR molekules sąveikaudami su kitais, mažųjų RNR biogenezeje dalyvaujančiais baltymais.

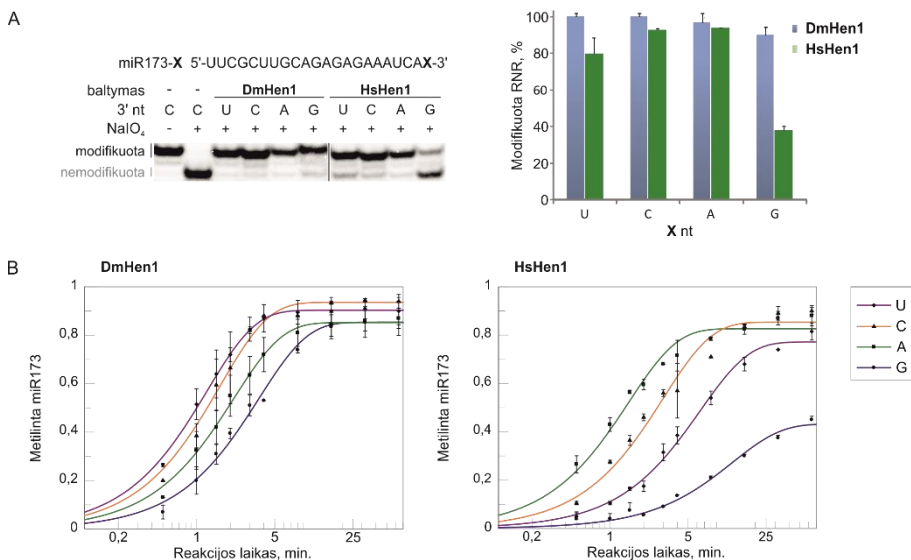


Pav. 3.3. Hen1 metiltransferazių sąveikos su miRNR analizė EMSA metodu. $0,2 \mu\text{M}$ ^{32}P -miR173 buvo sumaišyta su $100 \mu\text{M}$ *S*-adenozilhomocisteino (AdoHcy, demetilinto AdoMet kofaktoriaus), nurodytu kiekiu metalų chloridų ir $1 \mu\text{M}$ Hen1 baltymų. Po 30 min. inkubacijos 37°C temperatūroje mėginys buvo išfrakcionuotas natyviame poliakrilamidiniame gelyje (PAG).

3.1.2 Skirtingus 3'-galinius nukleotidus turinčių RNR modifikavimas

Skirtingiems pošeimiams priklausančios Hen1 metiltransferazės nevienodai efektyviai modifikuoja skirtingus galinius nukleotidus turinčius RNR substratus. Pelės mHen1 aktyvumas 3'-galinio nukleotido atžvilgiu išsidėsto tokia eile $\text{A} > \text{C} > \text{U} > \text{G}$ (6), bakterinio CthHen1 – $\text{G} \gg \text{U} > \text{A} \approx \text{C}$ (132), o baltažiedžio vairo AtHEN1 *in vitro* vienodai efektyviai modifikuoja bet kurį galinį nukleotidą turinčias RNR (52). Siekdami nustatyti ar ir jei taip, tuomet kokių specifškumu modifikuojamo galinio nukleotido atžvilgiu pasižymi tiriamos gyvūnų metiltransferazės, atlikome RNR metilinimo eksperimentus su miR173 3'-gale turinčia U, C, A arba G nukleotidus. Išanalizavę gautus rezultatus nustatėme, jog naudojant Co^{2+} kaip metalo kofaktorių DmHen1 metilinimo efektyvumas tik nežymiai priklauso nuo 3'-galinio nukleotido – visais atvejais reakcijas vykdžius 30 min. esant baltymo pertekliui buvo modifikuota daugiau nei 90% konkrečios RNR (Pav. 3.4 A). Tirtomis sąlygomis HsHen1 pasižymėjo labiau išreikšta modifikavimo

efektyvumo priklausomybe nuo galinio nukleotido – mažesniu nei 90% efektyvumu buvo modifikuojami U (80%) ir G (38%) nukleotidai, o baltymo vykdomos reakcijos efektyvumas išsidėstė tokia eile $A \approx C > U > G$. Išmatuotos DmHen1 vienos apskukos sąlygomis, t. y. esant fermento pertekliui, vykdomų metilinimo reakcijų greičių konstantos, k_{chem} , taip pat tik nežymiai priklausė nuo modifikuojamo substrato galinio nukleotido (varijavo nuo 0,80 iki 0,28 min^{-1}), o HsHen1 atveju tesiekė 0,08 min^{-1} baltymui modifikuojant miR173-G (Pav. 3.4 B, Lentelė 3.1).



Pav. 3.4. RNR metilinimo priklausomybė nuo 3'-galinio nukleotido. A. Skirtingus galinius nukleotidus turinčios miR173-X metilinimas. 30 min. vykdytos reakcijos atliktos kaip aprašyta Pav. 3.1. Histogramoje pateikta modifikuotos RNR dalis įvertinta eksperimentą atlikus bent du kartus. B. Skirtingus galinius nukleotidus turinčios miR173 modifikavimo greičio, aprašyto vienos eksponentės lygtimi, grafikai. Metilinimo reakcijos greitis buvo išmatuotas vienos apskukos sąlygomis, esant fermento pertekliui – 0,2 μM ^{32}P -RNR 0-60 min. buvo modifikuota reakcijos mišinyje su 100 μM AdoMet 1, 10 mM CoCl_2 ir 2 μM Hen1 metiltransferazių. Viso buvo atlikti bent du pakartojimai. Skaitinės išmatuotų reakcijos greičių konstantos pateikiamos 3.1 lentelėje.

Apibendrinami galime teigti, jog panašiai kaip AtHEN1, DmHen1 beveik neišskiria RNR substratų pagal jų galinius nukleotidus, o HsHen1 pasižymi aiškiai išreikštu substratiniumi specifiškumu. Nustatytos gyvūnų Hen1 metiltransferazių vykdomų reakcijų greičio konstantos, siekiančios 0,08-0,8 min^{-1} , yra panašios į išmatuotas bakterinės CthHen1 vykdomo vgRNR ir AtHEN1 katalizuojamo dgRNR metilinimo – 0,11 min^{-1} (132) ir $2,0 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ (51) – atitinkamai.

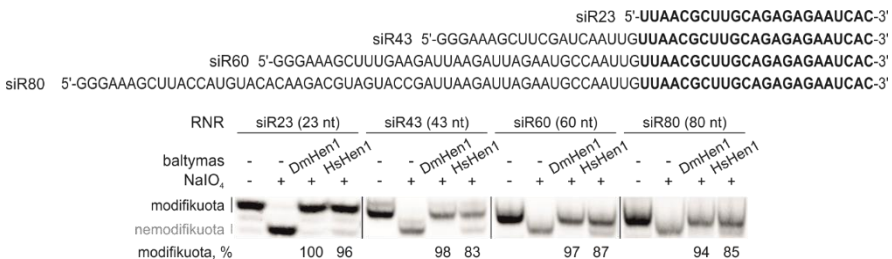
Lentelė 3.1. Išmatuotos skirtingus galinius nukleotidus turinčios miR173 modifikavimo greičio konstantos, k_{chem} .

<i>3'-galinis nt</i>	<i>DmHen1</i>	<i>HsHen1</i>
	$k_{chem}, (\text{min.}^{-1})$	$k_{chem}, (\text{min.}^{-1})$
U	0,80 ± 0,02	0,16 ± 0,01
C	0,61 ± 0,04	0,33 ± 0,03
A	0,46 ± 0,02	0,68 ± 0,06
G	0,28 ± 0,02	0,08 ± 0,01

3.1.3 Skirtingo ilgio RNR substratų modifikavimas

Ląstelėse antrajai pošeimei priklausančios Hen1 metiltransferazės modifikuoja 21-33 nt ilgio RNR molekules. Tačiau *in vitro* reakcijose šie fermentai gali metilinti ir kitokio ilgio RNR: tetrahymena Hen1p MTazė modifikuoja 16-32 nt (115), pelės mHen1 – 20-40 nt ilgio RNR substratus (6). Norėdami nustatyti ar ir kaip efektyviai tiriamos Hen1 metiltransferazės modifikuoja ir gerokai ilgesnes RNR, *in vitro* transkripcijos būdu susintetiname 43, 60 ir 80 nt ilgio transkriptus. Siekdami įvertinti modifikavimo efektyvumo priklausomybę tik nuo RNR substrato ilgio ir minimizuoti RNR sekos įtaką, užtikrinome, jog visi RNR substratai turėtų vienodą, 23 nt apimančią seką, 3'-gale. 3'-galų homogeniškumo pasiekėme substratų gamybai pritaikę hepatito D viruso (HDV) ribozimu paremtą *in vitro* transkripcijos sistemą, t. y. į *in vitro* transkripcijos matricą įtraukę HDV ribozimo seką. Kadangi RNR polimerazės yra linkusios susintetinti už matricą trumpesnes ar kiek ilgesnes RNR molekules, iš karto už RNR sekos koduojamas ir pats sintezės metu išsikerpantis HVD ribozimas padeda išspręsti šią problemą (207).

Atlikus metilinimo eksperimentus paaiškėjo, jog ir DmHen1, ir HsHen1 vykdomos reakcijos efektyvumas mažai tepriklauso nuo RNR substrato ilgio ir siekia 94-98% bei 83-92%, atitinkamai (pav. 3.5).



Pav. 3.5. Skirtingo ilgio vienodą 3'-galinę seką turinčių RNR substratų metilinimas DmHen1 ir HsHen1 metiltransferazėmis. Modifikavimo reakcijos atliktos kaip aprašyta Pav. 3.1.

Taigi, atlikti RNR metilinimo eksperimentai parodė, jog reakcijos mišinyje esant Co^{2+} jonams abi Hen1 metiltransferazės efektyviai modifikuoja skirtingus galinius nukleotidus turinčius įvairaus ilgio RNR substratus. Nustatytas platus substratinis Hen1 specifiškumas paskatino iškelti hipotezę, jog tiriami fermentai potencialiai galėtų pasižymėti ir platesniu kofaktoriaus specifiškumu bei pernešti ne tik metilo, bet ir ilgesnes šonines grupes, t. y. būti pritaikyti metiltransferazių katalizuojamai aktyvuotų grupių pernašai nuo sintetinių kofaktoriaus analogų, mTAG (angl. *methyltransferase directed Transfer of Activated Groups*) reakcijoms.

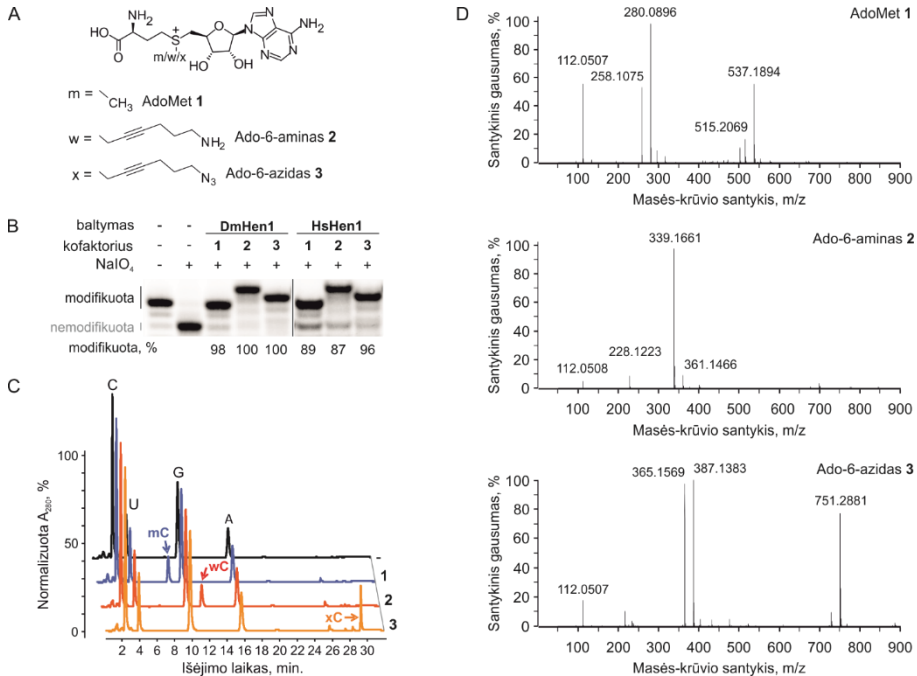
3.1.4 Aktyvuotų grupių pernaša nuo sintetinių S-adenozil-L-metionino analogų

Iš turimos sintetinių AdoMet 1 analogų bibliotekos mTAG reakcijai pasirinkome dr. V. Masevičiaus susintetitus Ado-6-amino 2 ir Ado-6-azido 3 kofaktorius (Pav. 3.6 A). Funkcinės amino ir azido grupės yra plačiai pritaikomos dviejų žingsnių molekulių žymėjimui pirminiams aminams sąveikaujant su NHS esteriais bei galiniams azidams dalyvaujant bioortogonaliose, fiziologinėmis sąlygomis vykstančiose Cu(I) katalizuojamose azidų-alkinų 1,3-ciklo prijungimo (CuAAC) reakcijose (52).

Atlikę modifikavimo eksperimentus su sintetiniais AdoMet 1 analogais nustatėme, jog abi metiltransferazės šonines grupes ant galinio miR173 nukleotido perneša didesniu nei 87% efektyvumu (Pav. 3.6 B). Mūsų nuostabai DmHen1 visiškai modifikavo substratinę RNR bet kuria pernešama grupe. HsHen1 vykdomo alkilavimo efektyvumas išaugus pernešamai grupei taip pat nesumažėjo. Vis dėlto, kadangi lyginant su DmHen1, HsHen1 pasižymėjo mažesniu RNR modifikavimo efektyvumu bei nevisiškai metilino skirtingos sekos ir ilgio RNR substratus, pastarosios metiltransferazės galimybės panaudoti mTAG reakcijoms detaliau netyrėme.

Tai, jog RNR iš tiesų buvo modifikuota pilno ilgio šoninėmis sintetinių AdoMet 1 analogų grandinėmis, patvirtinome RNR degradavę P1 nukleaze (*Sigma-Aldrich*), defosforilinę šarminę fosfotazę (FastAP, *Thermo Fisher Scientific*) ir gautą nukleozidų mišinį išanalizavę didelio našumo skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos (angl. *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS*) metodu. Šią ir kitas HPLC-MS analizes atliko Audronė Rukšėnaitė. DmHen1 modifikavus 3'-galinį miR173 C nukleozidą atitinkamomis pernešamomis grandinėmis HPLC chromatogramose tarp didžiausia sugertimi pasižyminčių keturis pagrindinius nukleozidus atitinkančių smailių, lyginant su kontroliniu mėginiu, išryškėjo papildomos, lėčiau už nemonifikuotą citozino nukleozidą chromatografinę

kolonėle judančių junginių smailės (Pav. 3.6 C). Nustatyti šių junginių masės-kūvio santykiai buvo itin panašūs į atitinkamus teoriškai apskaičiuotus modifikuoto citidino ir jo skilimo produktų santykius (Pav. 3.6 D, Lentelė 3.2). Taigi, ir RNR analizės dPAG, ir HPLC-MS eksperimento rezultatai patvirtino, jog DmHen1 iš tiesų modifikuoja miR173 galinį nukleozidą nuo sintetinių kofaktorių pernešamomis pilno ilgio šoninėmis grandinėmis.



Pav. 3.6. Gyvūnų Hen1 metiltransferazių vykdoma aktyvuotų grupių perneša nuo sintetinių AdoMet 1 analogų ant viengrandinės RNR. A. AdoMet 1 ir jo sintetinių analogų struktūra. B. DmHen1 ir HsHen1 metiltransferazių katalizuojamas miR173 modifikavimas metilo ir ilgesnėmis pernešamomis grupėmis. 0,2 μM ^{32}P -miR173 buvo modifikuota reakcijos mišinyje su 100 μM AdoMet 1, Ado-6-amino 2 ar Ado-6-azido 3, 10 mM CoCl_2 ir 2 μM DmHen1 ar HsHen1 30 min. 37°C temperatūroje. C. Modifikuotų nukleozidų HPLC chromatograma. 2 μM miR173 buvo modifikuoti reakcijos mišinyje esant 100 μM AdoMet 1, Ado-6-amino 2 ar Ado-6-azido 3, 10 mM CoCl_2 ir 1 μM DmHen1. Po 1,5 val. inkubacijos 37°C temperatūroje RNR buvo degraduota iki pavienių nukleotidų veikiant P1 nukleazei, defosforilinta iki nukleozidų su FastAP fosfataze ir išanalizuota HPLC-MS metodu. D. Modifikuotiems nukleozidams specifinių smailių spektrogramos. Identifikuotų 2'-O-alkilintų citidino junginių sąrašas pateikiamas 3.2 lentelėje.

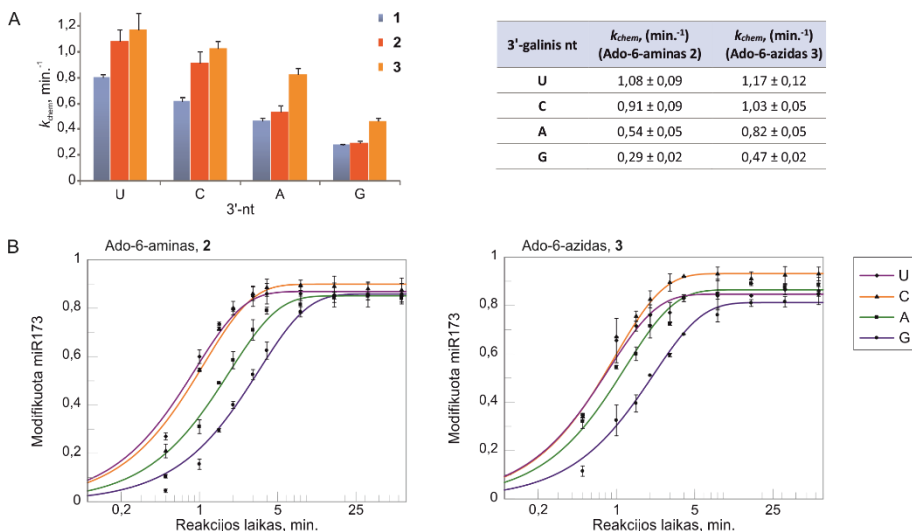
Lentelė 3.2. 2'-O-alkilintų citidino junginių, identifikuotų MS analizės metu, sąrašas.

<i>Modifi- kuotas nukleo- zidas</i>	<i>Jozinuotas junginys</i>	<i>Formulė</i>	<i>Apskaičiuota m/z</i>	<i>Nustatyta m/z</i>
C-CH ₃	[citozinas + H] ⁺	[C ₄ H ₆ N ₃ O] ⁺	112,0505	112,0507
	[citidino-CH ₃ + H] ⁺	[C ₁₀ H ₁₆ N ₃ O ₅] ⁺	258,1084	258,1075
	[citidino-CH ₃ + Na] ⁺	[C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₅ Na] ⁺	280,0904	280,0896
	[2citidino-CH ₃ + H] ⁺	[C ₂₀ H ₃₁ N ₆ O ₁₀] ⁺	515,2096	515,2069
	[2citidino-CH ₃ + Na] ⁺	[C ₂₀ H ₃₀ N ₆ O ₁₀ Na] ⁺	537,1916	537,1894
C-6- aminas	[citozino+ H] ⁺	[C ₄ H ₆ N ₃ O] ⁺	112,0505	112,0508
	[ribozės-6-aminas] ⁺	[C ₁₁ H ₁₈ NO ₄] ⁺	228,1230	228,1223
	[citidino-6-aminas + H] ⁺	[C ₁₅ H ₂₃ N ₄ O ₅] ⁺	339,1663	339,1661
	[citidino-6-aminas + Na] ⁺	[C ₁₅ H ₂₂ N ₄ O ₅ Na] ⁺	361,1482	361,1466
C-6- azidas	[citozinas + H] ⁺	[C ₄ H ₆ N ₃ O] ⁺	112,0505	112,0507
	[citidino-6-azidas + H] ⁺	[C ₁₅ H ₂₁ N ₆ O ₅] ⁺	365,1568	365,1569
	[citidino-6-azidas + Na] ⁺	[C ₁₅ H ₂₀ N ₆ O ₅ Na] ⁺	387,1387	387,1383
	[2citidino-6-azidas + Na] ⁺	[C ₃₀ H ₄₀ N ₁₂ O ₁₀ Na] ⁺	751,1883	751,2881

3.1.5 Aktyvuotų grupių pernaša ant įvairaus ilgio ir sekos RNR substratų

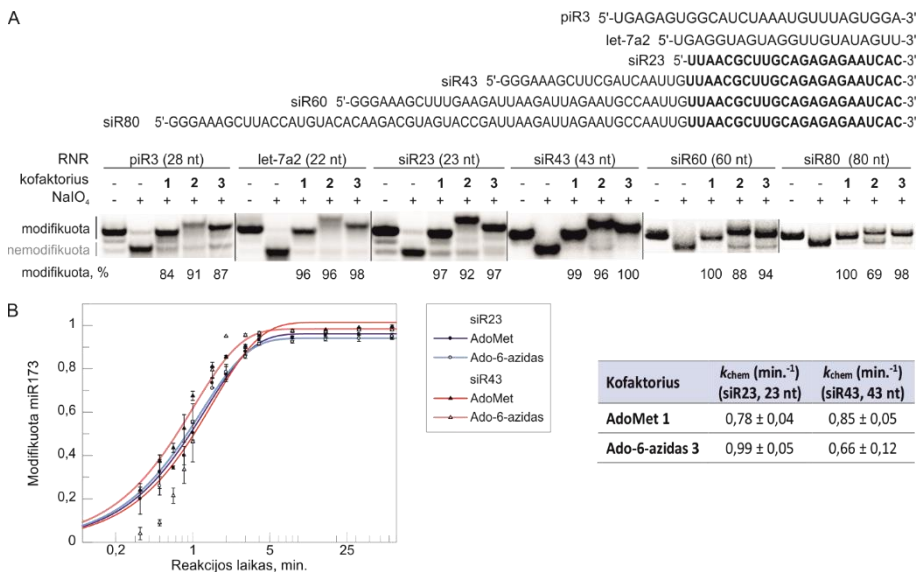
Nustatę, jog DmHen1 iš tiesų gali būti pritaikytas mTAG reakcijoms, nusprendėme patikrinti, ar sintetiniai AdoMet 1 analogai nepakeičia metiltransferazės substratinio specifiškumo galinio RNR nukleotido ir jos ilgio atžvilgiu. Siekdami palyginti skirtingus galinius nukleotidus turinčių RNR substratų modifikavimo metilo ir didesnėmis pernešamomis grupėmis greičius, atlikome vienos apšukos reakcijos greičio konstantų (k_{chem}) nustatymo eksperimentus. Mūsų nuostabai išmatuotos RNR modifikavimo greičio konstantos naudojant sintetinius kofaktoriaus analogus buvo panašios ar net šiek tiek didesnės už anksčiau nustatytas metilinimo reakcijos greičio

konstantas DmHen1 modifikuojant visus keturis galinius nukleotidus turinčius RNR substratus (Pav. 3.7).



Pav. 3.7. RNR alkilavimo greičio priklausomybė nuo 3'-galinio nukleotido. A. miR173 alkilavimo greičio konstantos (k_{chem}), išmatuotos vienos apsukos sąlygomis, esant fermento pertekliui ir atlikus bent du eksperimentus. Reakcijos atliktos kaip aprašyta Pav. 3.4 B. Metilavimo reakcijos greičių konstantos paimtos iš 3.1 lentelės. B. Skirtingus galinius nukleotidus turinčios miR173 alkilavimo greičio, aprašyto vienos eksponentės lygtimi, grafikai.

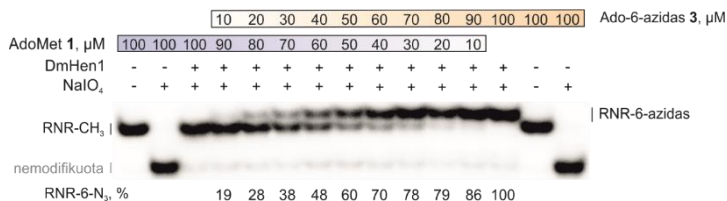
DmHen1 gebą alkilinti skirtingo ilgio substratus įvertinome pasitelkę porą ne tik ilgiu, bet ir seka besiskiriančių RNR molekulių – 22 nt žmogaus let-7a2 miRNR, 28 nt piR3 piRNR ir jau minėtas siR23/43/60/80 RNR (Pav. 3.8 A). Reakcijos mišinyje esant Ado-6-amino skirtingi RNR substratai buvo modifikuoti didesniu nei 69% efektyvumu, o Ado-6-azido – 87-100% efektyvumu nepriklausomai nuo modifikuotos RNR ilgio. Išmatavę siR23 ir siR43 alkilavimo greičio konstantas vienos apsukos sąlygomis, nustatėme, jog jie taip pat nepriklauso nuo modifikuojamo substrato ilgio ar pernešamos grupės dydžio (Pav. 3.8 B). Taigi, įvertinę gautus rezultatus galime užtikrintai teigti, jog DmHen1 gali būti pritaikytas efektyviam įvairaus ilgio ir sekos RNR substratų modifikavimui funkcines amino ar azido grupes turinčiomis pernešamomis grandinėmis bent jau *in vitro* sąlygomis.



Pav. 3.8. DmHen1 katalizuojamas skirtingos sekos ir ilgio RNR alkilinimas. A. Įvairių RNR substratų modifikavimas metilo ir didesnėmis pernešamomis grupėmis. Reakcijos atliktos kaip aprašyta Pav. 3.6 B. B. siR23 ir siR43 alkilinimo greičio, išmatuoto vienos apsukos sąlygomis ir aprašyto vienos eksponentės lygtimi, grafikai ir skaitinės greičio konstantų (k_{chem}) vertės gautos eksperimentą atlikus bent du kartus kaip aprašyta Pav. 3.4 B.

3.1.6 RNR alkilinimas kofaktorių mišinyje

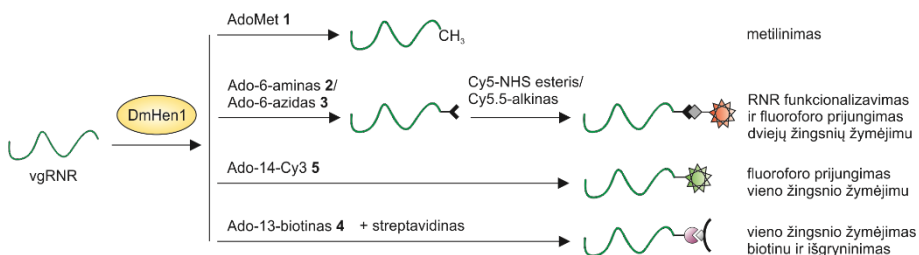
Siekiant pažymėti RNR funkcinėmis grupėmis ne tik kontroliuojamose *in vitro* reakcijose, bet ir ląstelių lizatuose ar pačiose eukariotinėse ląstelėse, DmHen1 turėtų pernešti šonines grandines nuo sintetinių kofaktoriaus analogų aplinkoje su natūraliu AdoMet 1 kofaktoriumi. Norint išsiaiškinti ar tokia reakcija būtų įmanoma, buvo atliktas kofaktorių konkurencijos eksperimentas, įdėjus į reakcijas ir AdoMet 1, ir Ado-6-azido 3. Visais atvejais buvo išlaikyta pastovi bendra kofaktorių koncentracija palaipsniui kintant tik santykiniam jų kiekiui. Atlikę aprašytą eksperimentą nustatėme, jog ilgesne pernešama grupe modifikuojamos RNR kiekis tiesiogiai koreliuoja su sintetinio kofaktoriaus dalimi reakcijos mišinyje (Pav. 3.9). Tai rodo, jog DmHen1 nepasižymi didesniu polinkiu naudoti vieną ar kitą kofaktorių. Reakcijos aplinkoje esant pakankamam Ado-6-azido 3 kiekiui, net ir AdoMet 1 turinčiuose mėginiuose, RNR substratai turėtų būti modifikuojami ilgesne, galinį azidą turinčia pernešama grupe.



Pav. 3.9. siR23 modifikavimas reakcijos mišiniuose su skirtingu santykiu AdoMet 1 ir Ado-6-azido 3 kiekiu. 0,2 μM ³²P-siR23 buvo 30 min. modifikuoti 37°C reakcijos mišinyje su 100 μM kofaktorių (AdoMet 1 ir Ado-6-azidui 3 esant santykiu 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 ir 0:10), 10 mM CoCl₂ ir 2 μM DmHen1.

3.2 DmHen1 pritaikymas RNR žymėjimui

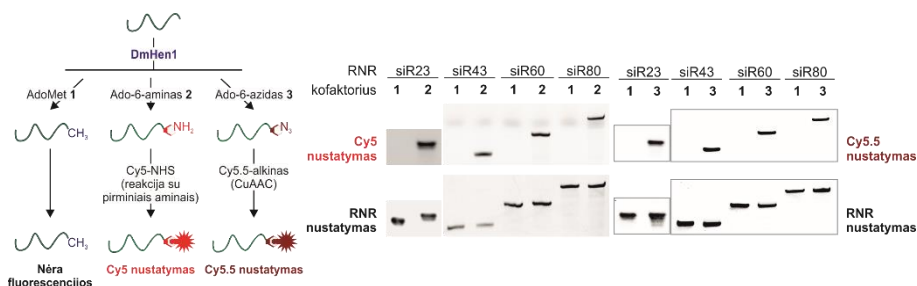
Charakterizavę DmHen1 vykdomas reakcijas bei pademonstravę tiriamos metiltransferazės gebą ant RNR pernešti šonines grandines su funkcinėmis grupėmis, nusprendėme pritaikyti pastarąją technologiją vgRNR žymėjimui. Pasitelkus sintetinius AdoMet 1 analogus RNR substratai gali būti pažymėti vieno ar dviejų žingsnių reakcijose (Pav. 3.10). Vieno žingsnio reakcijose nuo dvigubai aktyvinto sintetinio kofaktoriaus analogo ant modifikuojamos RNR iš karto yra pernešama reporterinę grupę (pavyzdžiui, biotiną ar fluoroforą) turinti šoninė grandinė. Kadangi šiuo atveju yra vykdoma tik viena reakcija, iki minimumo sumažinamas su RNR atliekamų manipuliacijų kiekis, o tai sumažina ir pačios RNR degradacijos ar praradimo riziką. Vis dėlto, dėl paprastai didesnės pernešamos grupės šios reakcijos dažnai pasižymi mažesniu efektyvumu. Taip pat vieno žingsnio žymėjimui reikalingi didelės molekulinės masės reporterines grupes turintys kofaktoriai, kurių sintezė neretai yra itin sudėtinga ir reikalauja daug laiko. Dviejų žingsnių žymėjimo metu ant RNR pirmiausia yra pernešama santykinai nedidelė funkcinę grupę turinti šoninė grandinė, prie kurios sekančioje reakcijoje yra prijungiama reporterinė molekulė. Šiuo atveju atliekamas didesnis manipuliacijų su tiriamu RNR kiekis, tačiau galima RNR pažymėti skirtingomis reporterinėmis grupėmis neapsiribojant turimų sintetinių AdoMet 1 analogų pasirinkimu (52).



Pav. 3.10. DmHen1 pritaikymas vgRNR žymėjimui vieno ir dviejų žingsnių metodu.

3.2.1 Dviejų žingsnių žymėjimas

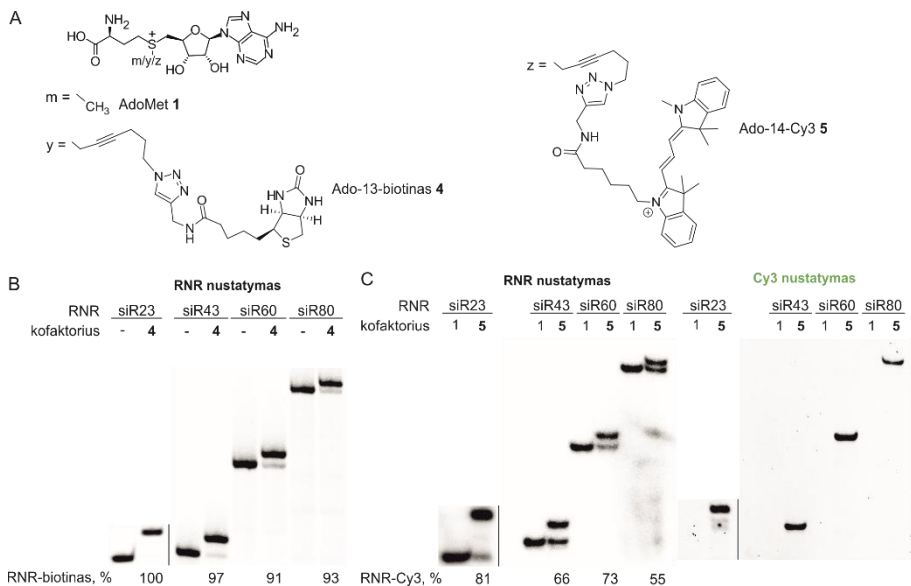
Galimybę RNR pažymėti dviejų žingsnių reakcijose pademonstravome pasitelkę 23-80 nt RNR. Modifikavę RNR substratus pernešamomis grandinėmis su galinėmis amino ar azido grupėmis, sekančiame etape prie jų pirminiam aminui reaguojant su NHS esteriu prijungėme Cy5-NHS-esterį, o vykstant CuAAC reakcijai – Cy5.5-alkiną (Pav. 3.11). RNR išfrakcionavę dPAG ir sužadinę kiekvieną iš fluoroforų, jų emisiją užfiksavome tik funkcines grupes turinčiomis pernešamomis grandinėmis, bet ne metilo grupe modifikuotose RNR mėginiuose. Gauti rezultatai patvirtino, jog DmHen1 gali būti puikiai pritaikytas dviejų žingsnių RNR žymėjimui.



Pav. 3.11. Įvairaus ilgio vgRNR žymėjimas dviejų žingsnių metodu. 0,2 μ M vgRNR 30 min. 37°C temperatūroje buvo inkubuota su 100 μ M AdoMet 1, Ado-6-aminu 2 ar Ado-6-azidu 3, 10 mM CoCl₂ ir 1 μ M DmHen1. Amino ir azido funkcinėms grupėms reagavus su Cy5-649/670-NHS esteriu ar Cy5.5-673/707-galiniu alkinu, pažymėta RNR buvo išfrakcionuota dPAG ir vizualizuota fluorescuojančius dažus sužadinus 635 ar 670 nm lazeriais bei registruojant jų emisiją su ilgesnes nei 665 nm ar 705 nm ilgio bangas praleidžiančiais LPR ir LPFR filtrais, atitinkamai. Bendras RNR kiekis vizualizuotas gelius nudažius etidžio bromidu.

3.2.2 Vieno žingsnio žymėjimas

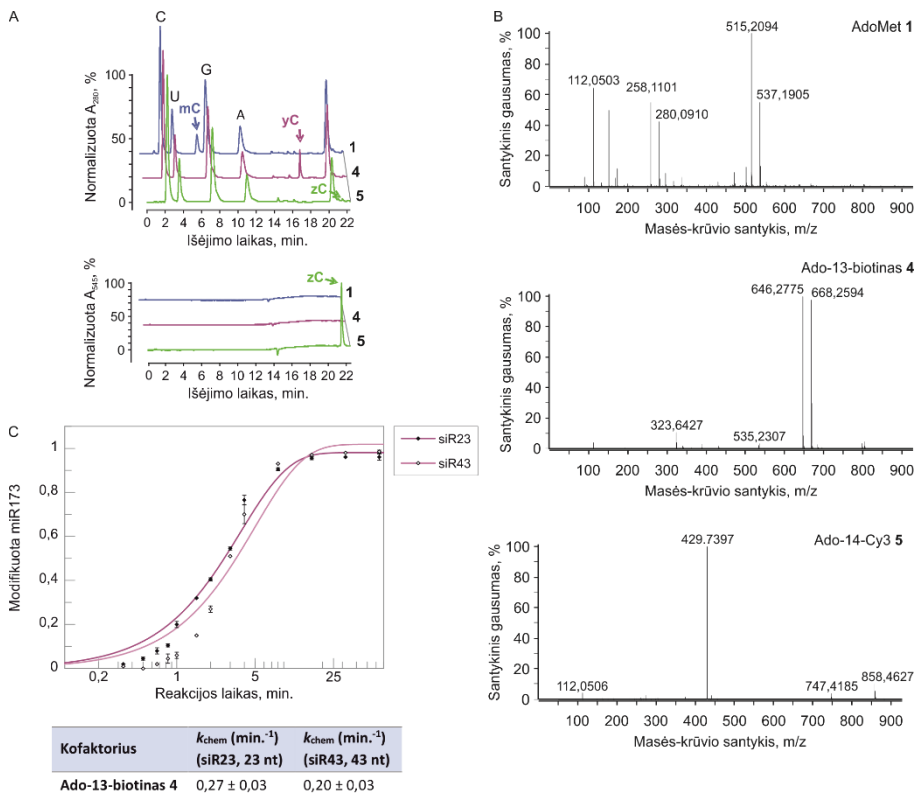
Vieno žingsnio žymėjimui nusprendėme panaudoti Ado-13-biotiną 4 ir specialiai šiam eksperimentui dr. V. Masevičiaus susintetintą Ado-14-Cy3 5 kofaktorių (Pav. 3.12 A). Abiejų jų šoninės grandinės su reporterinėmis grupėmis buvo perneštos ant skirtingo ilgio RNR substratų (Pav. 3.12 B, C). Biotinu pažymėtos vgRNR dalis visais atvejais viršijo 90%, o Cy3 turinčios šoninės grupės pernašos efektyvumas buvo kiek mažesnis (> 55%). Svarbu pastebėti, kad toks modifikavimo efektyvumas buvo pakankamas skirtingo ilgio RNR fluorescencijos nustatymui dPAG.



Pav. 3.12. Įvairaus ilgio vgRNR žymėjimas vieno žingsnio metodu. A. Ado-13-biotino 4 ir Ado-14-Cy3 5 cheminė struktūra. B. vgRNR žymėjimas pasitelkiant Ado-13-biotino 4 ir C. Ado-14-Cy3 5 kofaktorius. 0,1 μM ^{32}P -RNR 30 min. buvo modifikuotas 37°C temperatūroje reakcijos mišinyje esant 50 μM Ado-13-biotino 4 ar 6 μM Ado-14-Cy3, 10 mM CoCl_2 ir 1 μM DmHen1. Mėginius išfrakcionavus dPAG, 532 nm lazeris ir ilgesnes nei 575 nm bangas praleidžiantis LPG filtras buvo panaudoti Cy3 fluorescencijos nustatymui. Bendras RNR kiekis vizualizuotas pasitelkus radiacijai jautrius fotoekranus.

Tai, jog šios didelės šoninės grupės iš tiesų buvo perneštos ant RNR patvirtinome atlikę HPLC-MS analizę. Abiem atvejais HPLC chromatogramoje identifikavome papildomas sugerties smailes, atitinkančias lėčiau už nemodifikuotą citozino nukleozidą kolonėle judančius junginius (Pav. 3.13 A). Cy3 fluoroforu modifikuotą citidiną atitinkanti smailė itin išryškėjo matuojant šiam fluoroforui būdingą 545 nm ilgio bangos sugertį. Nustatyti modifikacijos produktų masės-krūvio santykiai atitiko teoriškai apskaičiuotus, taip papildomai patvirtindami pilno ilgio biotiną ir Cy3 fluoroforą turinčių grandinių pernašą ant 3'-galinio RNR nukleotido (Pav. 3.13 B, Lentelė 3.3).

Atlikę vienos apskukos RNR modifikavimo reakcijos biotiną turinčia šonine grandine greičio matavimus identifikavome, kad nustatytos reakcijų greičio konstantos (k_{chem}) praktiškai nepriklauso nuo modifikuojamo RNR substrato dydžio ir yra tik 3-4 kartus mažesnės už išmatuotas metilinimo reakcijos greičio konstantas (Pav. 3.13 C ir 3.8).



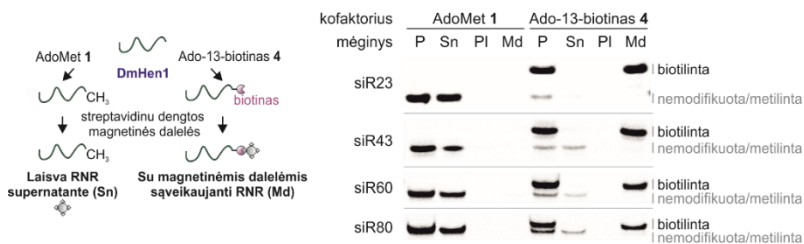
Pav. 3.13. DmHen1 katalizuojamas RNR žymėjimas Ado-13-biotino 4 ir Ado-14-Cy3 5 kofaktoriais. A. Modifikuotų miR173 nukleozidų HPLC chromatogramos. Viršutinėje pavaizduota 280 nm bangos ilgio sugertis, apatinėje – prie pernešamos šoninės grandinės prijungtam Cy3 fluoroforui būdinga 545 nm sugertis. 2 μ M miR173 buvo 1,5 val. modifikuota 37°C temperatūroje reakcijos mišinyje su 100 μ M AdoMet 1, 50 μ M Ado-13-biotino 4 ar 6 μ M Ado-14-Cy3 5. Tada hidrolizuoti iki nukleotidų, defosforilinti ir išanalizuoti HPLC-MS metodu. B. Modifikuotiems nukleozidams specifinių smailių spektrogramos. Identifikuotų 2'-O-alkilintų citidino junginių sąrašas pateikiamas 3.3 lentelėje. C. siR23 ir siR43 alkilavimo greičio, išmatuoto vienos apskokos sąlygomis ir aprašyto vienos eksponentės lygtimi, grafikai ir skaitinės greičio konstantų (k_{chem}) vertės gautos eksperimentą atlikus bent du kartus. Reakcijos atliktos kaip aprašyta Pav. 3.4 B, išskyrus tai, jog buvo naudota 50 μ M Ado-13-biotino 4.

Lentelė 3.3. 2'-O-alkilintų citidino junginių, identifikuotų MS analizės metu, sąrašas.

<i>Modifikuotas nukleozidas</i>	<i>Jonizuotas junginys</i>	<i>Formulė</i>	<i>Apskaičiuota m/z</i>	<i>Nustatyta m/z</i>
<i>C-CH₃</i>	[citozinas + H] ⁺	[C ₄ H ₆ N ₃ O] ⁺	112,0505	112,0503
	[citidino-CH ₃ + H] ⁺	[C ₁₀ H ₁₆ N ₃ O ₅] ⁺	258,1084	258,1101
	[citidino-CH ₃ + Na] ⁺	[C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₅ Na] ⁺	280,0904	280,0910
	[2citidino-CH ₃ + H] ⁺	[C ₂₀ H ₃₁ N ₆ O ₁₀] ⁺	515,2096	515,2094
	[2citidinas-CH ₃ + Na] ⁺	[C ₂₀ H ₃₀ N ₆ O ₁₀ Na] ⁺	537,1916	537,1905
<i>C-13-biotinas</i>	[citidino-13-biotinas + 2H] ²⁺	[C ₂₈ H ₄₁ N ₉ O ₇ S] ²⁺	323,6420	323,6427
	[ribozės-13-biotinas ⁺]	[C ₂₃ C ⁺ H ₃₅ N ₆ O ₆ S]	535,2333	535,2307
	[citidino-13-biotinas + H] ⁺	[C ₂₈ H ₄₀ N ₉ O ₇ S] ⁺	646,2766	646,2775
	[citidino-13-biotinas + Na] ⁺	[C ₂₈ H ₃₉ N ₉ O ₇ SNa] ⁺	668,2585	668,2594
<i>C-14-Cy3</i>	[citozinas + H] ⁺	[C ₄ H ₆ N ₃ O] ⁺	112,0505	112,0506
	[citidino-14-Cy3 ⁺ + H] ⁺	[C ₄₈ H ₆₁ N ₈ N ⁺ O ₆] ⁺	429,7367	429,7397
	[c-ribozės-14-Cy3 ⁺]	[C ₄₄ H ₅₅ N ₅ N ⁺ O ₅]	747,4228	747,4185
	[citidino-14-Cy3 ⁺]	[C ₄₈ H ₆₀ N ₈ N ⁺ O ₆]	858,4661	858,4627

Perneštos biotino grupės funkcionalumą įvertinome atlikę RNR gryninimo iš reakcijos mišinio eksperimentą (Pav. 3.14). Jo metu 23-80 nt ilgio biotinu žymėtą RNR inkubavome su streptavidinu dengtomis magnetinėmis dalelėmis ir susidarius biotino-streptavidino sąveikai, išgryninome iš reakcijos mišinio bei įvertinome eksperimento rezultatus dPAG. Visais atvejais biotilintą RNR identifikavome su magnetinėmis dalelėmis sąveikavusioje frakcijoje (Md).

Likusi nebiotilinta RNR dalis bei metilinta RNR su magnetinėmis dalelėmis nesąveikavo ir buvo pašalinta iš reakcijos su supernatanto frakcija (Sn).



Pav. 3.14. Vieno žingsnio RNR žymėjimas ir gryninimas. 0,01 μM ^{32}P -RNR 30 min. buvo inkubuota 37°C temperatūroje reakcijos mišinyje su 100 μM AdoMet 1 ar 50 μM Ado-13-biotino 4, 10 mM CoCl_2 ir 1 μM DmHen1. Pradinis biotino grupę turinčios RNR mišinys (P) buvo sumaišytas su streptavidinu dengtomis magnetinėmis dalelėmis. Su jomis nesąveikavusi RNR dalis pašalinta kartu su supernatantu (Sn) bei plovimo mėginiu (PI). Su streptavidinu sąveikavusi RNR dalis (Md) nustatyta magnetines daleles 10 min. pakaitinus 70°C temperatūroje su 95% formamido, 10 mM EDTA mišiniu ir išfrakcionavus mėginius dPAG.

Taigi, atlikti eksperimentai parodė, jog DmHen1 gali būti panaudotas RNR žymėjimui vieno bei dviejų žingsnių metodu. Dviejų žingsnių žymėjimo reakcijose pernešdamas nedideles funkcines grupes DmHen1 įgalina tolimesnį RNR žymėjimą norimomis reporterinėmis grupėmis (Cy5 ar Cy5.5) ir jų vizualizavimą. O pritaikytas vieno žingsnio žymėjimo reakcijoms DmHen1 perneša ir itin dideles reporterines grupes tiesiai ant modifikuojamos RNR ir taip įgalina jos vizualizavimą (Ado-14-Cy3 5 atveju) ar praturtinimą (su Ado-13-biotinu 4).

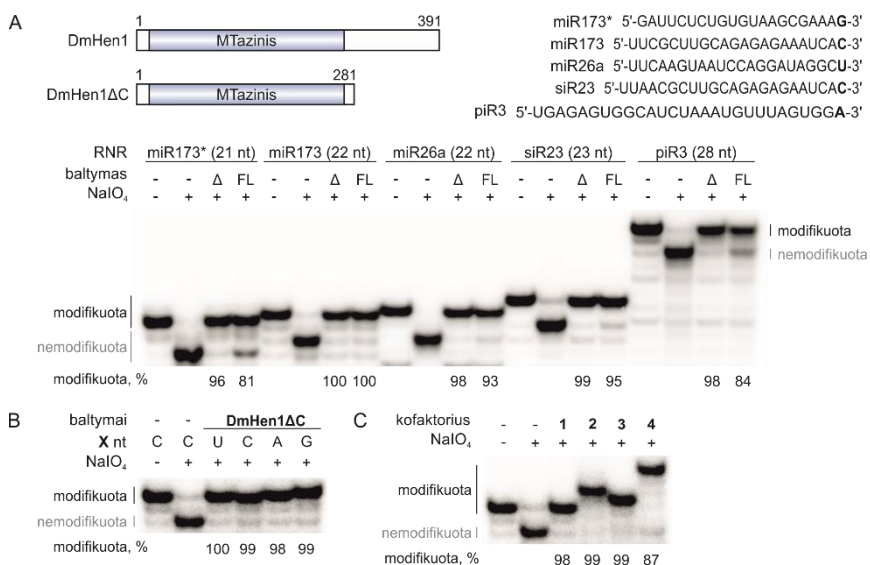
3.3 DmHen1ΔC pritaikymas RNR žymėjimui

DmHen1 polipeptidinėje grandinėje be konservatyvaus N-galinio MTazinio domeno išskiriama ir nenustatytos funkcijos C-galinė sritis. Parodyta, jog efektyviam RNR modifikavimui bakterinei CthHen1 metiltransferazei papildomas domenas nėra reikalingas (130–132), tačiau pavienio AtHEN1 katalizinio domeno aktyvumas kai kurių substratų atžvilgiu nukrenta iki vos išmatuojamo lygio (51). Kadangi platesniam DmHen1 pritaikymui, pavyzdžiui RNR žymėjimui ląstelėse, būtų paranku turėti kuo mažesnės molekulinės masės, potencialiai stabilesnį baltymą, nusprendėme sukonstruoti ir išgryninti trumpesnį, metiltransferazinį fermento domeną apimančią DmHen1 variantą, DmHen1ΔC (Pav. 3.15 A). Mums buvo įdomu įvertinti, ar C-galinė baltymo dalis yra reikalinga metiltransferaziniam DmHen1 aktyvumui, ar ir kaip C-galinės dalies trūkumas keičia metiltransferazės vykdomos modifikavimo reakcijos efektyvumą ir specifiškumą galiniam

nukleotidui, galiausiai, ar sutrumpintas baltymas gali būti pritaikytas RNR žymėjimui.

3.3.1 DmHen1ΔC fermentinio aktyvumo tyrimas

C-galinės baltymo dalies įtaką DmHen1 vykdomai RNR metilinimo reakcijai nustatėme atlikę RNR metilinimo eksperimentus su penkiais skirtingais RNR oligonukleotidais (Pav. 3.15 A). Gauti rezultatai parodė, jog lyginant su pilno ilgio baltymu DmHen1ΔC pasižymėjo net didesniu modifikavimo efektyvumu. Dar daugiau, DmHen1ΔC vienodai efektyviai modifikavo ir skirtingus galinius nukleotidus neišskirdamas nė vieno iš jų (Pav. 3.15 B), nors pilno ilgio baltymui buvo būdingas neigiamas šališkumas 3'-galinį G nukleotidą turinčio substrato atžvilgiu (Pav. 3.4).

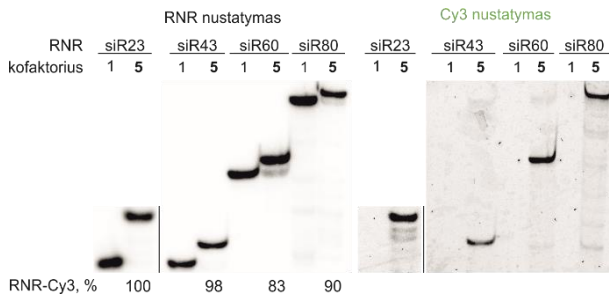


Pav. 3.15. DmHen1ΔC katalizuojamo vgRNR modifikavimo analizė. A. Skirtingo ilgio ir sekos RNR substratų metilinimas pilno ilgio ir C-galinės srities neturinčiu DmHen1 ir DmHen1ΔC baltymais, atitinkamai, 0,2 μM ³²P-RNR buvo 30 min. modifikuota 37°C temperatūroje reakcijos mišinyje su 100 μM AdoMet 1, 10 mM CoCl₂ ir 2 μM DmHen1 (FL) ar DmHen1ΔC (Δ). B. Skirtingus galinius nukleotidus turinčių RNR modifikavimas. C. Įvairaus ilgio šoninių grandinių pernaša nuo sintetinių AdoMet 1 analogų ant miR173. Reakcijai naudota 100 μM AdoMet 1, Ado-6-amino 2, Ado-6-azido 3 ir 50 μM Ado-13-biotino 4.

Tik iš metiltransferazinio domeno sudarytas DmHen1 variantas pasižymėjo ir efektyvesne aktyvuotų šoninių grandinių pernaša ant modifikuojamo RNR substrato – ≥98% visos reakcijos mišinyje buvusios RNR buvo modifikuota funkcinėmis, dviejų žingsnių žymėjimui mTAG metodu skirtomis amino ir azido grupėmis (Pav. 3.15 C). DmHen1ΔC

efektyviai pritaikėme ir vieno žingsnio žymėjimo reakcijai RNR modifikavę reporterine biotino grupe.

Didžiausias pokytis, lyginant su pilno ilgio baltymu, buvo nustatytas kitos vieno žingsnio žymėjimo reakcijos metu pasitelkus Ado-14-Cy3 5 kofaktorių. Šią reakciją katalizuojant DmHen1ΔC skirtingų ilgių RNR buvo pažymėtos didesniu nei 83% efektyvumu (pilno ilgio baltymo vykdytos modifikacijos efektyvumas siekė 55-81% (Pav. 3.12 C)) bei vizualizuotos gelyje matuojant Cy3 fluorescenciją (Pav. 3.16).



Pav. 3.16. Įvairaus ilgio RNR substratų žymėjimas Cy3 fluoroforu vieno žingsnio mTAG metodu. 0,1 μM ^{32}P -RNR buvo 30 min. modifikuota 37°C temperatūroje reakcijos mišinyje su 100 μM AdoMet 1 ar 6 μM Ado-14-Cy3 5, 10 mM CoCl_2 ir 1 μM DmHen1ΔC. Mėginius išfrakcionavus dPAG, jie vizualizuoti kaip aprašyta Pav. 3.12 C.

Taigi, gauti rezultatai rodo, jog C-galinė DmHen1 sritis nėra būtina ir, kai kuriais atvejais, net gi neigiamai veikia fermento vykdomą RNR modifikaciją, jos efektyvumą ir tolygumą skirtingų RNR substratų atžvilgiu. Tik iš DmHen1 metiltransferazinio domeno sudarytas baltymas gali būti puikiai pritaikytas chemofermentiniam RNR žymėjimui.

3.3.2 DmHen1ΔC pritaikymas RNR nustatymui FRET metodu

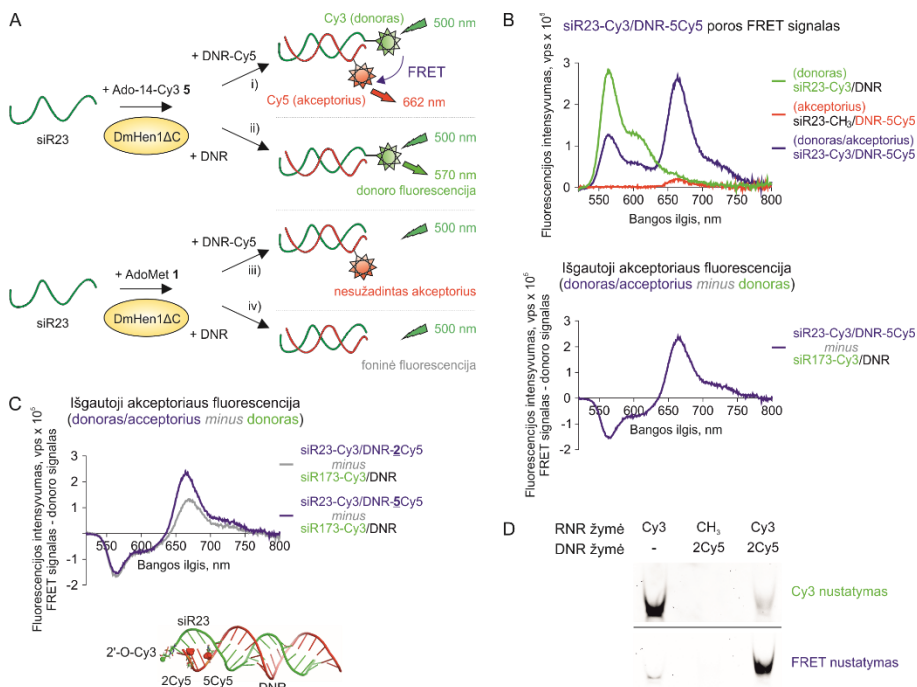
Biomolekulių žymėjimui reikalingi specifiški ir jautrūs, aukštu signalo/fono santykiu pasižymintys metodai. Būtent tokiems metodams yra priskiriama Försterio rezonansinės energijos pernašos, FRET (angl. *Förster Resonance Energy Transfer*), technologija. FRET – tai sužadinto fluoroforo donoro energijos perdavimas mažiau nei 10 nm atstumu esančiam fluoroforui akceptoriui, kurio sugerties spektras persidengia su donoro emisijos spektru. FRET rezultatas – po donoro sužadavimo registruojamas sumažėjęs jo fluorescencijos intensyvumas ir išaugusi specialiai nesužadinto akceptoriaus fluorescencija (149).

Siekdami išsiaiškinti, ar DmHen1ΔC galėtų būti pritaikytas RNR nustatymui FRET metodu, nusprendėme įvertinti FRET signalą tarp vienu

žingsniu Cy3 fluoroforu, FRET donoru, pažymėtos RNR (RNR-Cy3) ir jai komplementarios Cy5 fluoroforą, FRET akseptorių, turinčios DNR (DNR-Cy5). Prie ilgos šoninės grandinės prijungto Cy3 fluoroforo sugerties maksimumas – 545 nm, emisijos – 570 nm. Cy5 sugertis maksimumą pasiekia ties 646 nm, emisija – 662 nm. Kadangi Cy3 emisijos spektras persidengia su Cy5 sugerties spektru, sužadintas Cy3 dažas gautą energiją gali perduoti šalia esančiam Cy5 fluoroforui ir taip jį sužadinti. Taigi, įvykus Försterio rezonansinės energijos pernašai sužadinę Cy3 turėtume registruoti Cy5 emisiją.

RNR nustatymui FRET metodu paruošėme keturis mėginius: i) FRET signalo registravimui – panaudojant DmHen1ΔC Cy3 fluoroforu pažymėtą RNR, RNR-Cy3, sulydėme su Cy5 žymėtu komplementariu DNR oligonukleotidu, DNR-Cy5, ii) donoro emisijos nustatymui – RNR-Cy3 sulydėme su komplementaria nežymėta DNR, iii) nesužadinto akceptoriaus emisijos registravimui – nežymėtą RNR sulydėme su DNR-Cy5, iv) foninį fluorescencijos signalą matavome naudodami DmHen1ΔC metilintos RNR/komplementarios DNR dupleksą (Pav. 3.17 A). Eksperimentą atlikome naudodami penktoje pozicijoje Cy5 fluoroforu žymėtą DNR, DNR-5Cy5. Kaip galime matyti iš 3.17 paveiksle, B dalyje, viršuje, pateiktų tirpale išmatuoto fluorescencijos intensyvumo spektrų, gautų mėginius sužadinus 500 nm ilgio banga ir iš jų atėmus foninį fluorescencijos signalą, tik FRET donorą turinčiame mėginyje buvo registruotas jo fluorescencijos pikas. Cy5 sugerties spektro nesiekiantis sužadinimas 500 nm ilgio banga praktiškai nesukėlė šio dažo fluorescencijos – gauta itin žemo intensyvumo Cy5 fluorescencijos smailė. O mėginyje, turinčiame ir fluorescencijos donorą, ir akseptorių, buvo užregistruotas FRET signalas – Cy3 sužadinimo sukelta Cy5 fluorescencija ir kartu sumažėjęs paties Cy3 fluorescencijos intensyvumas. Neigiamą donoro emisijos signalo pokytį ir išaugusią akceptoriaus emisiją vaizdžiai iliustruoja šių dviejų emisijos signalų skirtumas (Pav. 3.17 B, apačioje).

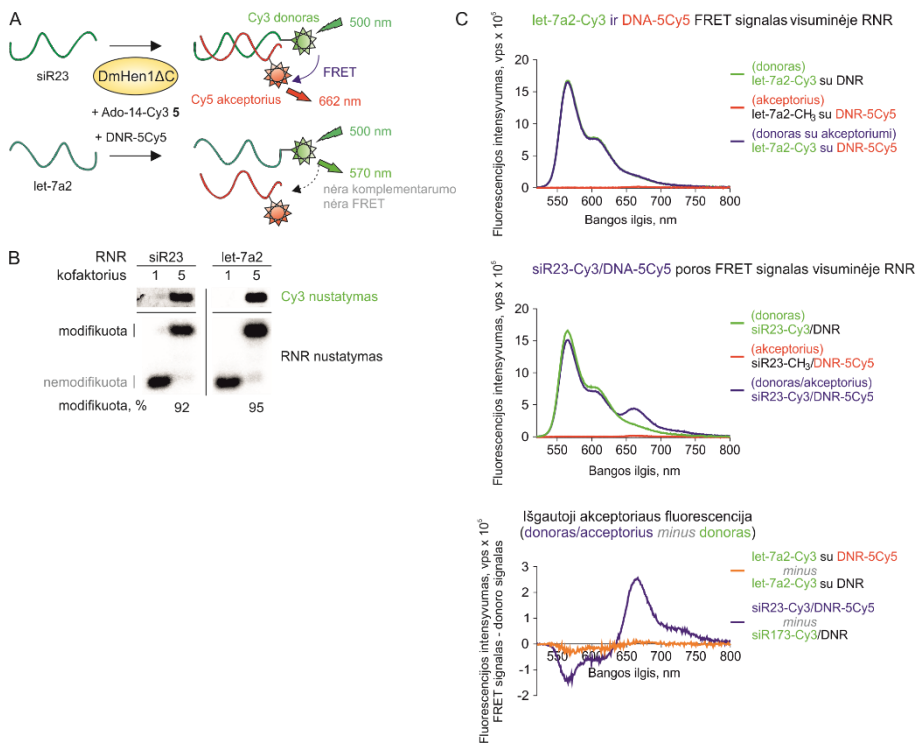
Kadangi FRET efektyvumas yra atvirkščiai proporcingas atstumui tarp FRET donoro ir akceptoriaus šeštuoju laipsniu, ištyrėme, ar dvigrandinėje struktūroje arčiau Cy3 turinčio RNR 3'-galo atsiduriantis, prie antro DNR T nukleotido prijungtas Cy5 fluoroforas galėtų garantuoti intensyvesnį FRET signalą (Pav. 3.17 C). Vis dėlto, šiuo atveju donoro fluorescencijos intensyvumas po akceptoriaus sužadinimo buvo net mažesnis nei DNR-5Cy5 atveju. Tikėtina, jog prie ilgos perneštos grandinės prijungto Cy3 ir penktoje DNR pozicijoje esančio Cy5 išsidėstymas erdvėje yra palankesnis sužadinto akceptoriaus energijos perdavimui.



Pav. 3.17. Specifinė DmHen1ΔC žymėtos vgRNR nustatymas FRET metodu. A. FRET eksperimento schema. B. siR23-Cy3/DNR-5Cy5 poros FRET signalo nustatymas tirpale. vps – registruotų fono vienėtų per sekundę skaičius. 1 μM siR23 buvo modifikuota naudojant 100 μM AdoMet 1 ar 3 μM Ado-14-Cy3 5, 10 mM CoCl₂ ir 1 μM DmHen1ΔC reakciją vykdančią 1 val. 37°C temperatūroje bei suldydama su komplementaria DNR. Viršutiniame grafike pavaizduotas siR23-Cy3/DNR-5Cy5 – FRET poros – ir dviejų kontrolinių mėginių siR23-Cy3/DNR bei siR23-CH₃/DNR-5Cy5 emisijos spektras mėginius sužadinus 500 nm banga bei atėmus siR23/DNR fluorescenciją. Apatiniame grafike pateikta išgautoji akceptorius fluorescencija, gauta iš FRET fluorescencijos spektro atėmus donoro fluorescenciją. C. Išgautosios akceptorius fluorescencijos palyginimas po siR23-Cy3/DNR-2Cy5 ir siR23-Cy3/DNR-5Cy5 protų FRET signalo nustatymo. Apačioje pateikiamas siR23/DNR duplekso modelis gautas naudojant 3D-Nus programą (214). Žalia sfera – 2'-O-ribozės atomas ant kurio DmHen1ΔC perneša Cy3 fluoroforą turinčią šoninę sintetinio kofaktoriaus grandinę; raudonos sferos – timino metilo grupės DNR-2Cy5 ir DNR-5Cy5 oligonukleotiduose pakeistos Cy5 fluoroforu. D. FRET signalo nustatymas natyviame PAA gelyje. Cy3 ir FRET signalai buvo išmatuoti sužadinus fluoroforus 532 nm lazeriu ir registruojant jų emisiją su ilgesnes nei 575 nm ar 665 nm ilgio bangas praleidžiančiais LPG ir LPR filtrais, atitinkamai.

Atlikę papildomą tiriamųjų mėginių analizę nedenantūrojančiame PAA gelyje patvirtinome FRET nustatymo tirpale rezultatus (Pav. 3.17 D). Apšvietę gelį 532 nm ilgio bangos lazeriu ir naudodami ilgesnes nei 575 nm bangas praleidžiantį filtrą Cy3 fluorescenciją nustatėme dviejuose mėginiuose: mėginyje su RNR-Cy3/DNR bei RNR-Cy3/DNR-2Cy5. Svarbu

pastebėti, jog pastarajame Cy3 fluorescencija buvo itin silpna, mat didžioji dalis sužadavimo energijos buvo perduota Cy5 fluoroforui, kurio fluorescenciją, t. y. patį FRET signalą, išmatavome naudodami ilgesnes nei 665 nm bangas praleidžiantį filtrą.



Pav. 3.18. Specifinė DmHen1ΔC pažymėtos siR23 nustatymas FRET metodu visuminės RNR mišinyje. A. Eksperimento schema. B. siR23 ir let-7a2 žymėjimas Cy3 fluoroforu visuminės RNR mišinyje. 1 μM ³²P-RNR buvo pažymėta reakcijos mišinyje su 100 μM AdoMet 1 ar 10 μM Ado-14-Cy3 5, 10 mM CoCl₂, 0,5 mg/ml visuminės RNR ir 1 μM DmHen1ΔC reakciją vykdant 1 val. 37°C temperatūroje ir išfrakcionuota dPAG. Cy3 fluorescencija ir bendras RNR kiekis nustatyti kaip aprašyta Pav. 3.12 C. C. siR23 nustatymas FRET metodu visuminės RNR mišinyje tirpale. Viršutiniame grafike – let-7a2, viduriniame – siR23 ir, abiem atvejais, siR23 komplementarią DNR turinčių visuminės RNR mėginių emisijos spektrai. Apatiniame grafike – išgautoji akceptorius fluorescencija abiejuose mėginiuose. Fluorescencijos intensyvumus užregistruotas ir apskaičiuotas kaip aprašytas Pav. 3.17 B.

Siekdami įvertinti DmHen1ΔC žymėjimu paremtą FRET metodo selektyvumą, nusprendėme ištirti galimybę visuminės RNR mišinyje specifiskai nustatyti DmHen1ΔC pažymėtą konkrečią RNR ją hibridizuodami su komplementariu DNR-5Cy5 oligonukleotidu (Pav. 3.18 A). Šiuo tikslu į

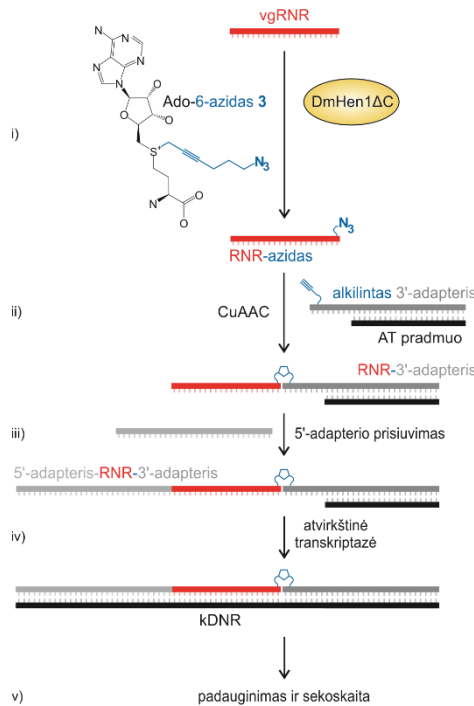
HCT116 visuminę RNR pridėjome siR23 arba let7a-2 RNR. DmHen1ΔC efektyviai modifikavus abi mažąsias RNR (Pav. 3.18 B), į reakcijos mišinius papildomai pridėjome tik siR23 komplementarios, Cy5 fluoroforu žymėtos DNR. Kiekvienam tiriamajam mėginiui paruošėme ir po tris skyriaus pradžioje aprašytus kontrolinius mėginius. Nors FRET porą – donorą ir akceptorį – turinčiame mėginyje su pridėta let-7a2 registravome tik Cy3 fluorescenciją, mėginyje su siR23 buvo matuojamas aiškus akceptoriaus fluorescencijos signalas (Pav. 3.19 C). Svarbu pastebėti, jog šis signalas buvo registruotas net ir esant dideliame Cy3 fluoroforo pertekliui. Taigi, gauti rezultatai rodo, jog DmHen1ΔC gali būti pritaikytas konkrečių molekulių nustatymui ir kompleksiniuose visuminės RNR mėginiuose.

3.4 DmHen1ΔC pritaikymas RNR sekoskaitai

Pastarąjį dešimtmetį RNR sekoskaita tapo vienu pagrindinių įrankių transkriptomo tyrimuose, padėjusių atskleisti eukariotinių ir bakterinių mažųjų reguliacinių RNR įvairovę (88,162–164). Mažosios RNR reguliuoja tokius svarbius procesus kaip ląstelių diferenciacija, vystymasis, augimas, atsakas į stresą ar net žūtis (30,31,33). Dažniausiai minėta reguliacija yra vykdoma mažajai RNR sąveikaujant su bent dalinai komplementariais iRNR taikiniaisiais, o šioje sąveikoje, pavyzdžiui, eukariotinių mažųjų RNR atveju, dalyvauja konkrečioje pozicijoje nuo 5'-galo esantys nukleotidai (55,57,92). Taigi, siekiant adekvačiai įvertinti mažųjų RNR sekoskaitos metu gaunamą informaciją, itin svarbu žinoti, nuo kurios DNR grandinės buvo nurašyta analizuojama RNR ir kokios yra tikslios jos ribos. Abu šie reikalavimai yra išpildomi kDNR bibliotekos paruošimą pradedant nuo 3'- ir 5'-adapterių prisiuvimo. 3'-adapterio prisiuvimas yra atliekamas pasitelkiant sutrumpintą ir modifikuotą T4 RNR ligazės 2 variantą – T4 trRnl2 K227Q (22). Deja, daugybė tyrimų rodo, jog T4 trRnl2 K227Q vykdoma reakcija yra itin netolygi, mat jos efektyvumas priklauso nuo RNR ir adapterio sekos, vidinės ir su adapteriu sudaromos struktūros. Dėl šios priežasties ne visos RNR yra vienodai efektyviai įtraukiamos į ruošiamą kDNR biblioteką, galiausiai nuskaitomos, identifikuojamos ir įvertinamos kiekybiškai (23,25–29).

Nustatę, jog C-galinės dalies neturintis DmHen1 variantas DmHen1ΔC efektyviai modifikuoja RNR substratus nepriklausomai nuo jų sekos bei gali būti pritaikytas RNR žymėjimui dviejų žingsnių metodu, nusprendėme sukurti naują, T4 trRnl2 K227Q būdingais šališkumais nepasižymintį kDNR bibliotekos paruošimo metodą – mDOT-seq (angl. *methyltransferase-Directed Orthogonal Tagging and RNA sequencing*). mDOT-seq metodu, pasitelkiant DmHen1ΔC ir Ado-6-azidą 3, ant RNR 3'-galo pirmiausia būtų

pernešama azido funkcinę grupę turinti aktyvuota grandinė (Pav. 3.19). Prie modifikuotos RNR, trumpiau vadinamos RNR-azidu, sekančios, CuAAC reakcijos metu, būtų prijungiamas alkilintas 3'-DNR adapteris su atvirkštinės transkripcijos (AT) pradmeniu. Prie gauto RNR-3'-adapterio junginio tradiciniu metodu prisiuvus 5'-adapterį toliau būtų vykdoma kopijinės DNR (kDNR) sintezė ir jos padauginimas PGR metodu.



Pav. 3.19. mDOT-seq metodo schema.

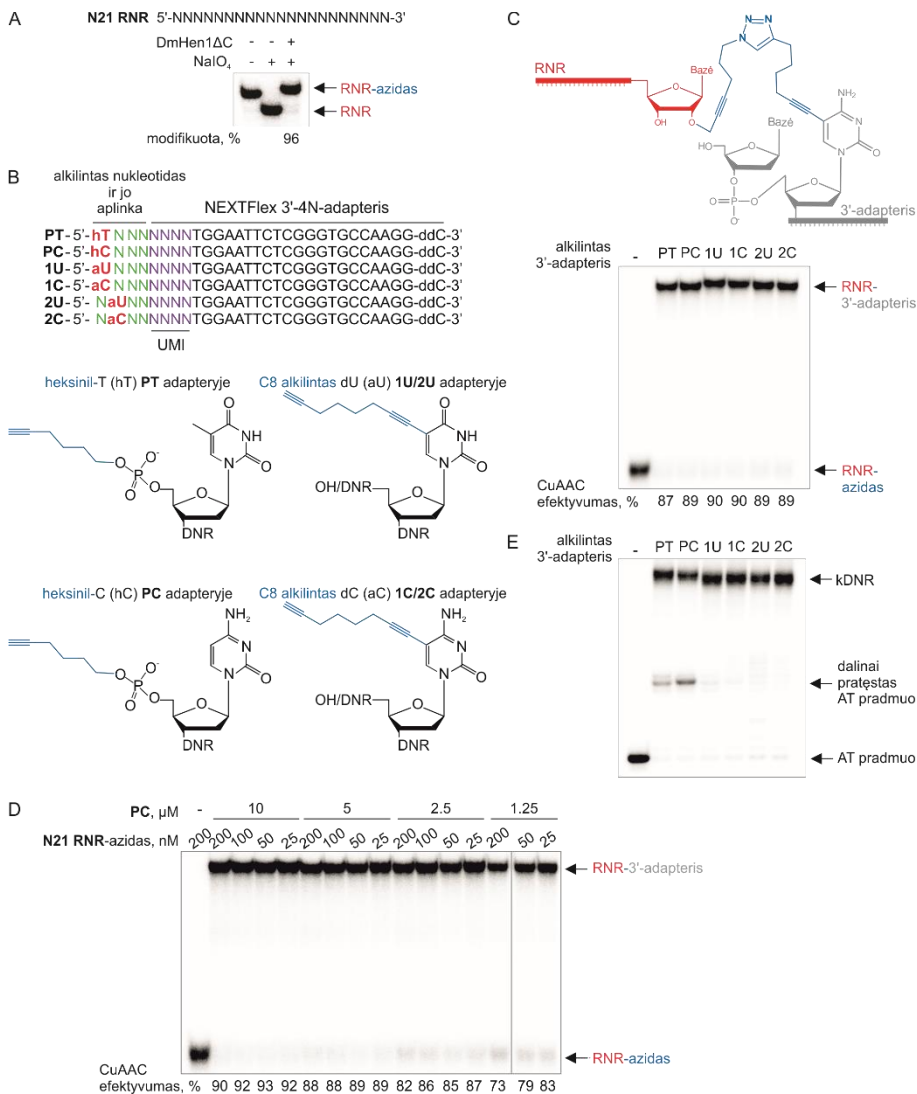
3.4.1 mDOT-seq metodo sukūrimas

Siekdami pritaikyti DmHen1ΔC RNR sekoskaitai, pirmiausia įvertinome ir optimizavome unikalius mDOT-seq metodo etapus: RNR azidavimo (i), alkilinto 3'-adapterio/AT pradmens prijungimo (ii) ir kDNR sintezės (iii) reakcijas.

(i) RNR azidavimas

DmHen1ΔC pritaikomumą kDNR bibliotekos paruošimui, konkrečiai gebėjimą modifikuoti bet kokios sekos, o tuo pačiu ir vidumolekulinės struktūros RNR azido funkcinę grupę turinčia pernešama grandine, įvertinome pasitelkę maždaug iš $4,4 \times 10^{12}$ sekų variantų sudarytą 21 nt ilgio RNR rinkinį – N21 RNR (Pav. 3.20 A). Mūsų nuostabai milžiniškas RNR sekų rinkinys

buvo modifikuotas net 96% efektyvumu. Gautas rezultatas leidžia teigti, jog DmHen1ΔC iš tiesų gali būti pritaikytas bet kokios sekos ir įvairios vidumolekulinės struktūros RNR sekoskaitai.



Pav. 3.20. DmHen1ΔC pritaikymas RNR sekoskaitai. A. DmHen1 vykdomas iš 21 atsitiktinio nukleotido sudaryto RNR substrato, N21 RNR, modifikavimas naudojant Ado-6-azido 3 kofaktorių. 0,2 μM ³²P-N21-RNR buvo 30 min. inkubuota 37°C reakcijos mišinyje su 100 μM Ado-6-azido 3, 10 mM CoCl₂ ir 2 μM DmHen1ΔC. B. Alkilinti 3'-adapteriai. hT/C – heksinil-T/C, aU/C – C8 alkilintas dU/dC, UMI – unikalių molekulių identifikatorių seka. C. Alkilintų 3'-adapterių prijungimas prie RNR-azido vykstant CuAAC reakcijai. Viršuje – tarp RNR ir 2C 3'-adapterio po CuAAC reakcijos susidaranti triazolo žiedą turinti struktūra. 0,2 μM ³²P-RNR-azido

ir 10 μM alkilinto 3'-adapterio/AT pradmens duplexo buvo 30 min. inkubuoti 45°C 55% DMSO reakcijos mišinys su 3,3 mM CuBr-TBTA. D. PC alkilinto 3'-adapterio prijungimas prie RNR-azido esant skirtingoms oligonukleotidų koncentracijoms. E. Atvirkštinė transkripcija nuo skirtingų RNR-3'-adapterio matricių. Atvirkštinės transkripcijos vizualizavimui CuAAC reakcija buvo atlikta naudojant 20 μM RNR-azido ir 5 μM alkilinto 3'-adapterio/³²P-AT pradmens, po kurios 10 nM gauto junginio buvo sumaišyta su 10 a.v./ μl RevertAid atvirkštinės transkriptazės ir 0,25 mM dNTP turinčiu reakcijos mišiniu.

(ii) Alkilinto 3'-adapterio/AT pradmens prijungimas

Iškėlus hipotezę, jog nuo alkilo grupės padėties 3'-adapteryje, alkilinto nukleotido bei artimiausių jį supančių nukleotidų gali priklausyti 3'-adapterio prijungimo ir/ar kDNR sintezės efektyvumas, sekančios kDNR bibliotekos paruošimo stadijos optimizavimui – alkilinto 3'-adapterio/AT pradmens prijungimui – pasirinkome 6 alkilinto 3'-adapterio variantus (Pav. 3.20 B). Alkilintuose 3'-adapteryuose alifatinė, galinį alkiną turinti grandinė buvo prijungta prie pirmojo nukleotido fosfato grupės ar C5 bazės pozicijos arba prie antro nukleotido bazės. Modifikuojamas buvo U (alkiną jungiant prie fosfato grupės – T) arba C nukleotidas, trijose alkilintui nukleotidui artimiausiose pozicijose adapterio sintezės metu buvo įterpiamas bet koks nukleotidas. Likusi pradmens dalis sutapo su komercinio bibliotekos paruošimo rinkinio NEXTFLEX (*PerkinElmer*) 3'-4N adapteriu ir buvo sudaryta iš unikalių molekulinį identifikatorių (UMI) sekos – keturių bet kokių nukleotidų – bei AT pradmeniui komplementarios srities.

Atlikę CuAAC reakciją su azidinta RNR ir visų šešių tipų 3'-adapteryais nustatėme, jog ši reakcija nepriklauso nuo 3'-adapterio ir visais atvejais vyksta 87-90% efektyvumu (Pav. 3.20 C). Panašus reakcijos efektyvumas išlieka 1,25 – 10 μM alkilinto 3'-adapterio prijungiant prie vos 25 nM azidintos RNR (Pav. 3.20 D). Tai rodo, jog kDNR biblioteką mDOT-seq metodu būtų galima paruošti net ir turint itin mažą pradinės medžiagos kiekį, su kuo dažnai susiduriama vykdant biologinių mėginių sekoskaitą.

(iv) kDNR sintezė

Vykstant CuAAC reakcijai tarp RNR ir DNR susidaro 14-a anglies atomų, įskaitant ir triazolo žiedą apimanti jungtis (Pav. 3.20 C, viršuje), kurią turi įveikti atvirkštinė transkriptazė kDNR sintezės metu. Optimizavę AT reakcijos sąlygas parodėme, jog ir NEXTFLEX kDNR bibliotekos paruošimo rinkinyje naudojama M-MuLV (duomenys nepateikti), ir modifikuota RevertAid (*Thermo Fisher Scientific*) atvirkštinė transkriptazė gali apeiti šią jungtį ir susintetinti pilno ilgio kDNR (Pav. 3.20 E). Ši reakcija yra itin efektyvi naudojant C5 bazės pozicijoje alkilintus 1U, 1C, 2U ir 2C 3'-

adapterius. Kadangi PT ir PC adapterių atveju nepriklausomai nuo atvirkštinės transkriptazės dalis kDNR sintezės nutrūko ties DNR-RNR jungtimi, šie adapteriai tolimesniuose eksperimentuose nebuvo naudojami.

3.4.2 mDOT-seq metodo įvertinimas - miRXplore RNR sekoskaita

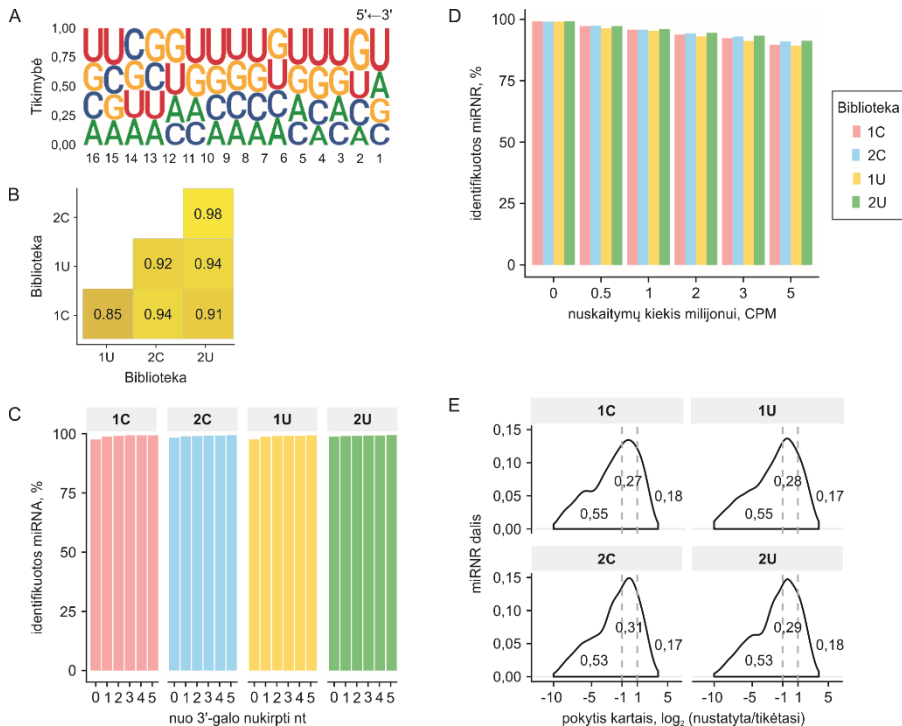
3.4.2.1 Identifikuojamų miRNR kiekio ir tolygumo nustatymas

Siekdami įvertinti mDOT-seq metodo tinkamumą didelio našumo mažųjų RNR sekoskaitai, nusprendėme šiuo metodu nuskaityti miRXplore (*Miltenyi Biotec*) RNR rinkinio sekas. miRXplore RNR rinkinį sudaro 1005 unikalios sintetinės 16-28 nt ilgio sekos, atitinkančios žmogaus, pelių, žiurkių ir virusų miRNR. Sudarytas šių sekų paskutinių 16-os nukleotidų LOGO rodo, jog rinkinio sekose skirtingi nukleotidai yra pasiskirstę gana tolygiai ir adekvačiai atspindi natūraliai egzistuojančią sekų įvairovę (Pav. 3.21 A). Papildomas šio RNR rinkinio privalumas – vienodas kiekvienos iš sekų kiekis jame, leidžiantis tiksliai įvertinti skirtingų RNR įtraukimo į kDNR biblioteką tolygumą.

Ruošiant miRXplore kDNR biblioteką pirmiausia, pasitelkus DmHen1ΔC ir Ado-6-azido 3 kofaktorių, RNR buvo modifikuotos azido funkcinę grupę turinčia pernešama grandine. Sekančiame etape, vykstant CuAAC reakcijai, prie modifikuotų RNR buvo prijungtas vienas iš keturių anksčiau pasirinktų alkilintų 3'-DNR adapterių – 1C, 1U, 2C ar 2U, suldytų su atvirkštinės transkripcijos pradmeniu. Tolimesni kDNR bibliotekos paruošimo etapai atlikti pagal standartinę procedūrą, pritaikius NEXTFLEX mažųjų RNR kDNR bibliotekos paruošimo rinkinį: prie RNR-3'-adapterio prisiūtas 5'-adapteris, susintetinta ir padauginta kDNR. Viso buvo paruoštos 8 kDNR bibliotekos – po dvi eksperimentines replikas kiekvienam alkilintam 3'-adapteriui – ir Lexogen padalinyje atlikta Illumina sekoskaita. Sekoskaitos duomenų analizę atliko Kotryna Kvederavičiūtė.

Įvertinę konkrečių miRNR nuskaitymų kiekį eksperimentinėse replikose, pirmiausia parodėme, jog jos pasižymėjo praktiškai idealia koreliacija – visais atvejais apskaičiuotas Spearman koreliacijos koeficientas siekė vienetą ($p < 0,001$). Tai rodo, jog kDNR bibliotekų paruošimo procedūra buvo puikiai standartizuota ir nepriklausė nuo pašalinių veiksnių. Dėl itin aukštos koreliacijos tolimesnė duomenų analizė buvo atlikta apjungus eksperimentinių replikų sekoskaitos rezultatus. Palyginus po sekoskaitos gautus nuskaitymus tarp bibliotekų ruošų naudojant skirtingus 3'-alkilintus adapterius, buvo nustatyta didesnė koreliacija tarp su 2C ir 2U adapteriais ruošų bibliotekų ($R = 0,98$, $p < 0,001$) nei tarp kitų bibliotekų (Pav. 3.21 B; čia

ir toliau paprastumo dėlei bibliotekos vadinamos pagal jų paruošimui naudotą alkilintą 3'-adapterį). Šie rezultatai rodo, jog naudojant pirmoje pozicijoje alkilintus 3'-adapterius buvo gauti kiek kitokie rezultatai, nei 2C ir 2U atveju. Palyginus skirtingose bibliotekose identifikuotų miRNR dalį paaiškėjo, jog analizuojant pilno ilgio RNR 2U ir 2C bibliotekose bent po vieną nuskaitymą turėjo 98,3-98,7% mėginyje buvusių sekų, o 1C ir 1U bibliotekose jų aptikta kiek mažiau – 97,3% (Pav. 3.21 C, Lentelė 3.4, nuo 3'-galo nukirpti nt = 0).



Pav. 3.21. miRNXplore sekoskaita mDOT-seq metodu. A. 16-os 3'-galinių miRNXplore RNR nukleotidų sekų LOGO, paruoštas naudojant WEBLOGO įrankį (209). B. Spearman koreliacijos koeficientas tarp skirtingų kDNR bibliotekų paskaičiuotas vertinant pilno ilgio miRNR nuskaitymus. $p < 0,001$. C. Kiekvienoje iš bibliotekų bent vieną nuskaitymą turinčių miRNR dalis, įvertinta neatsižvelgiant į nurodytą kiekį 3'-galinių kiekvienos miRNR nukleotidų. Konkretūs skaičiai pateikti 3.4 lentelėje. D. Identifikuotų miRNR dalis vertinant tik nurodytą kiekį nuskaitymų turinčias miRNR neatsižvelgiant į paskutinius du jų nukleotidus. CPM – nuskaitymų kiekis milijonui (angl. *Counts Per Million*). E. Kiekybinis miRNR nuskaitymų įvertinimas. Analizuotos bent 1 CPM turinčios miRNR, identifikuotos neatsižvelgiant į paskutinius du jų nukleotidus. Pilkos vertikalios punktyrinės linijos žymi dviejų kartų nuokrypį nuo teorinės vertės.

Vykstant kDNR sintezei atvirkštinė transkriptazė turi ne tik įveikti jungtį tarp RNR ir 3'-adapterio, bet ir į sintetinamą kDNR grandinę įterpti tiksliai

paskutiniam RNR nukleotidui komplementarų deoksiribonukleotidą. Įvertinę keliamos užduoties sudėtingumą, patikrinome kaip pakinta identifikuojamų miRNR kiekis skaičiuojant 1-5 nukleotidais 3'-gale trumpesnius nuskaitymus. Iš tiesų, įtraukus vieno ar dviejų paskutinių nukleotidų neturinčias RNR, nustatomų miRNR kiekis visose bibliotekose išaugo iki 99,0-99,1% (Pav. 3.21 C, Lentelė 3.4). Papildoma 3-5 nukleotidais trumpesnių nuskaitymų analizė identifikuojamų miRNR kiekio reikšmingai nepadidino. Taigi, gauti rezultatai rodo, jog kai kurios miRNR mDOT-seq metodu yra nuskaitymos be paskutinio ar prieš paskutinio nukleotido ir tai, jog šie netikslumai dažnesni 1C ir 1U bibliotekose. Šis skirtumas tarp bibliotekų dar labiau išryškėja vertinant tik tam tikrą kiekį nuskaitymų turinčias RNR, identifikuotas neatsižvelgiant į du paskutinius jų nukleotidus – skaičiuojant tik 5 ir daugiau nuskaitymus milijonui turinčias sRNR 2U ir 2C bibliotekose identifikuojama 91,0-91,1% miRNR, o 1C ir 1U bibliotekose – 89,2-89,6% miRNR (Pav. 3.21 D).

Lentelė 3.4. Kiekvienoje iš bibliotekų bent vieną nuskaitymą turėjusių miRNR kiekis, įvertintas neatsižvelgiant į nurodytą skaičių 3'-galinių kiekvienos miRNR nukleotidų.

<i>Biblioteka</i> →	<i>1C</i>	<i>2C</i>	<i>1U</i>	<i>2U</i>
<i>Nuo 3'-galo nukirpti nt</i> ↓				
0	871	878	872	882
1	882	883	882	884
2	885	884	884	885
3	887	886	885	886
4	887	886	885	886
5	887	888	887	888

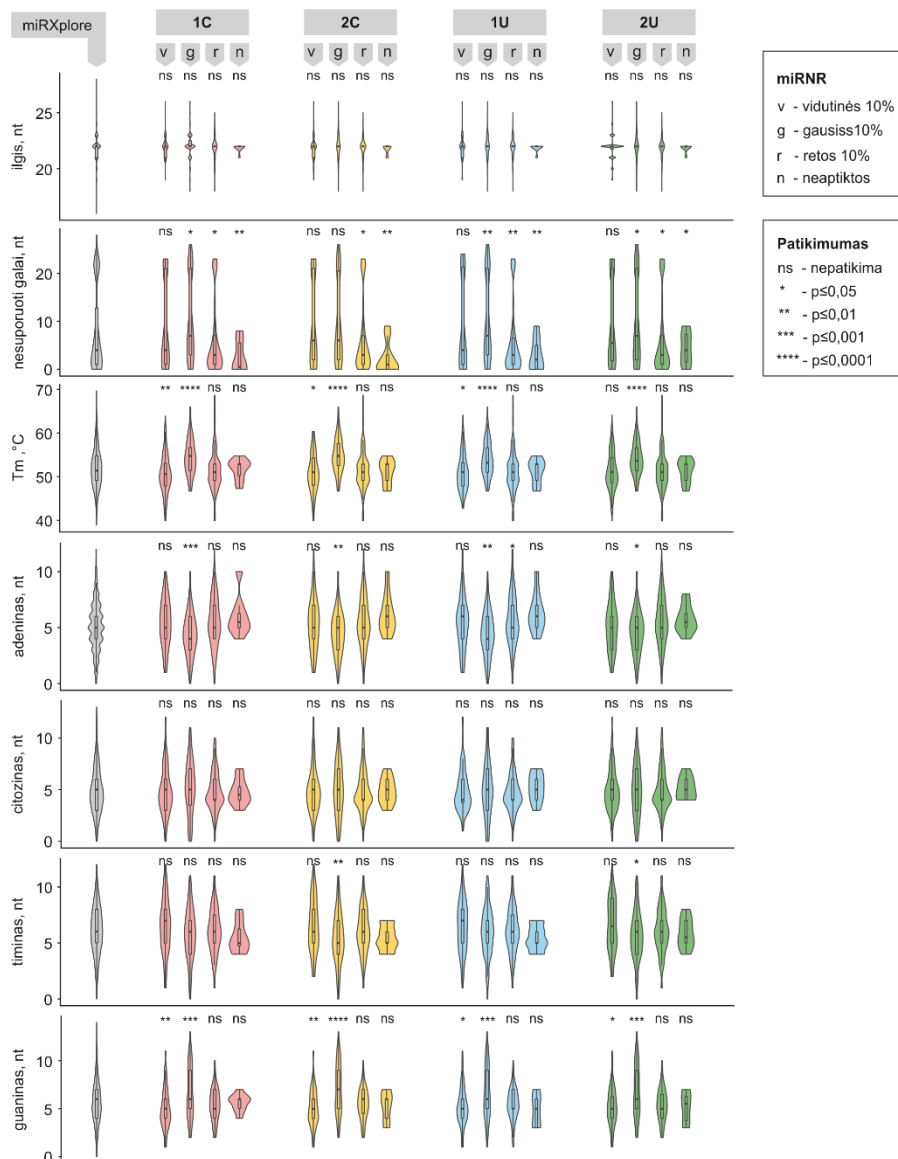
Atlikus sekoskaitos eksperimentą svarbu ne tik identifikuoti konkrečias RNR, bet ir įvertinti santykinį jų kiekį. Siekdami nustatyti miRNR kiekybinio įvertinimo tikslumą skirtingose bibliotekose, kiekvienu atveju įvertinome miRNR nuskaitymų kiekio nuokrypį nuo teoriškai paskaičiuotos jo vertės (Pav. 3.21 E). 2U ir 2C bibliotekos išsiskyrė ir šiuo atveju – jose nustatėme didžiausią dalį tiksliai identifikuojamų, t. y. mažiau nei du kartus nuo teorinio kiekio nukrypstančių (28), miRNR. Taigi, abiem aspektais – identifikuojamų miRNR įvairovės ir jų kiekybinio įvertinimo – mDOT-seq metodu geriausi rezultatai gaunami naudojant 2C ir 2U 3'-adapterius.

3.4.2.2 Netolygų miRNR įtraukimą į kDNR biblioteką nulemiančių faktorių įvertinimas

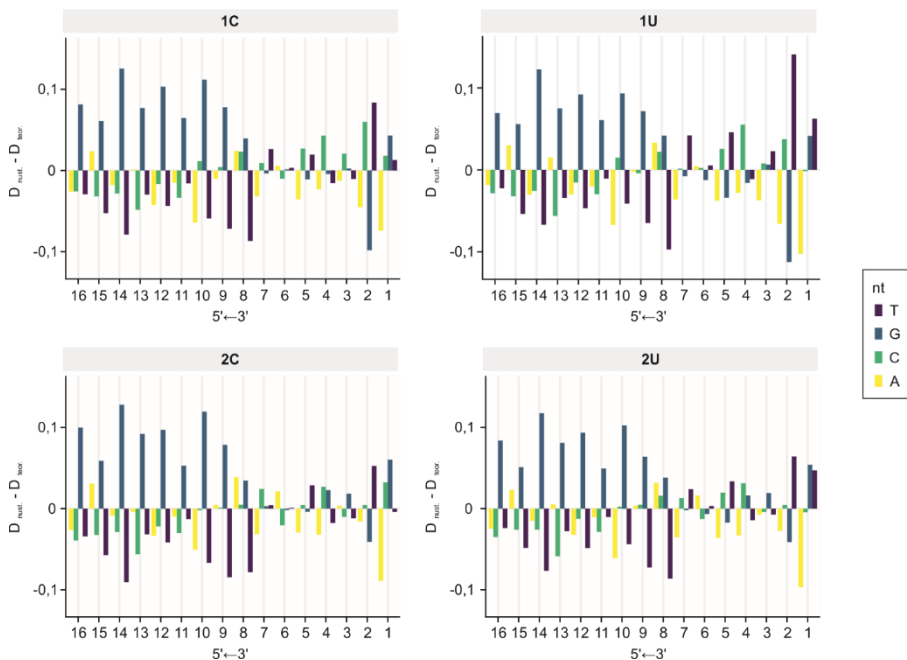
Siekdami suprasti, kodėl dalies miRNR nuskaitymų kiekis mDOT-seq metodu paruoštose kDNR bibliotekose nesutapo su teoriškai paskaičiuotu, detaliau paanalizavome keturias miRNR grupes – 10% gausiausių, vidutinio gausumo bei rečiausių ir visai neidentifikuotų sekų kiekvienoje iš bibliotekų bei palyginome gautus rezultatus su visomis pradiniam miRXPlore rinkinyje buvusiomis RNR. Skirtingų sekų parametrų analizė atskleidė, jog visose bibliotekose neidentifikuotos, arba mažesniais kiekiais už teorinį aptiktos RNR 3'-gale turėjo patikimai mažiau nesuporuotų nukleotidų ($p < 0,01-0,05$, Pav. 3.22). Šis rezultatas sutampa su anksčiau aprašytu DmHen1 polinkiu modifikuoti išskirtinai viengrandines RNR molekules. 10% gausiausių miRNR buvo būdinga patikimai didesnė lydymosi temperatūra, didesnis A ir G nukleotidų kiekis ($p < 0,5-0,0001$). Didesne lydymosi temperatūra (išskyrus 2U biblioteką) bei didesniu guaninų kiekiu išsiskyrė ir 10% vidutiniu gausumu pasižymėjusių miRNR sekų ($p < 0,05-0,01$). miRNR nuskaitymų kiekis visiškai nepriklausė nuo jų ilgio, citozinų ir timinų (1C ir 1U bibliotekose) kiekio.

Detali visų identifikuotų miRNR paskutinių 16-os 3'-galo nukleotidų sudėties analizė atskleidė, jog 2C ir 2U bibliotekose nuskaitomos kDNR paskutinėje pozicijoje rečiau turi A nukleotidą, o 1C ir 1U pasižymi papildomais šališkumais antroje nuo galo pozicijoje, kur rečiau sutinkamas G, dažniau T nukleotidas (1C atveju – ir C nukleotidas) (Pav. 3.23). Gausiau identifikuojamos G nukleotidais 9-16 pozicijose nuo 3'-galo turtingos sekos.

Svarbu pabrėžti, jog detaliai ištirtas Hen1ΔC polinkis modifikuoti skirtingos sekos RNR neparodė aptartų šališkumų – nepriklausė nuo visos RNR sekos ar konkrečių galinių jos nukleotidų. Pastarieji veiksniai neturėjo jokio poveikio ir CuAAC reakcijai. Taigi, galime daryti prielaidą, jog stebimas netolygus skirtingų miRNR identifikavimas galėtų būti po RNR azidavimo ir alkilinto 3'-adapterio prijungimo sekančių kDNR bibliotekos paruošimo stadijų, pavyzdžiui, atvirkštinės transkripcijos, rezultatas. Tikėtina, jog optimizavus šias stadijas ir atlikus sekoskaitos eksperimentą būtų gauti tikslesni, realius miRNR kiekius pradiniam mėginyje atitinkantys rezultatai.



Pav. 3.22. miRNR parametrų analizė skirtingu gausumu pasižymėjusiose sekų grupėse. Skirtumas tarp kiekvienos sekų grupės ir pradinio miRXplore RNR rinkinio įvertintas pasitelkus T-testą. Analizei naudotos miRNR sekos, identifikuotos neatsižvelgiant į paskutinius du jų nukleotidus.



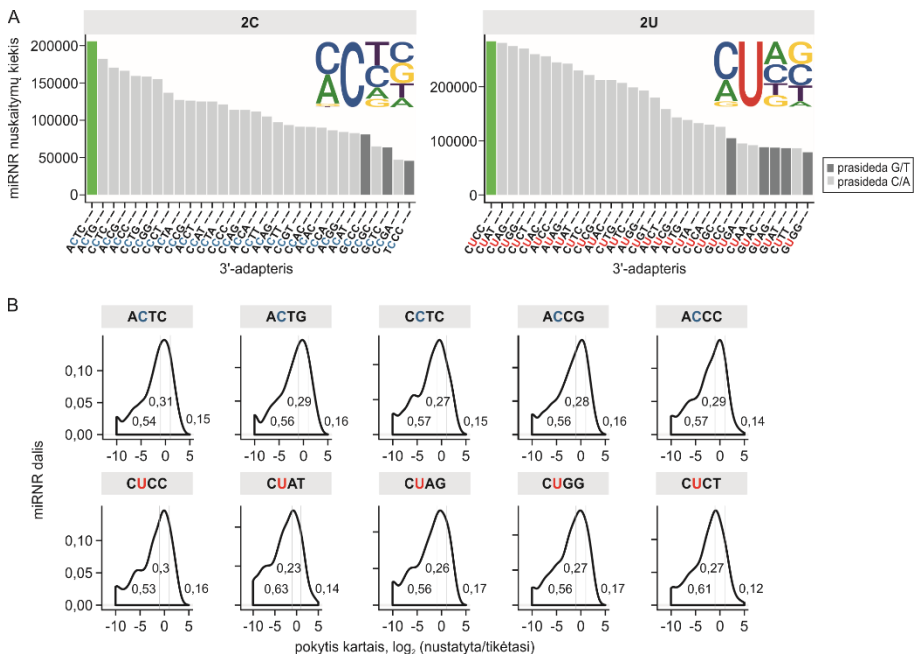
Pav. 3.23. Nustatyto nukleotidų dažnio, D nust., nuokrypis nuo teorinės vertės, D teor., 16-oje 3'-galinių miRNR pozicijų. Analizei naudotos miRNR sekos, identifikuotos neatsižvelgiant į paskutinius du jų nukleotidus.

3.4.2.3 Konkrečios sekos 2C ir 2U oligonukleotido pasirinkimas

Siekdami tolimesniam mDOT-seq metodo pritaikymui pasirinkti konkrečią seką 5'-gale turintį 3'-adapterį, įvertinome alkilintą nukleotidą supančios sekos įtaką miRXPlore sekoskaitos rezultatams. Identifikavę visus konkrečią seką 5'-gale turinčius 2C ir 2U 3'-adapterius atitinkamose bibliotekose, nustatėme su kiekvienu jų susijusių miRNR nuskaitymų kiekį. Atliktos analizės rezultatai parodė, jog miRNR nuskaitymų kiekis tarp skirtingos sekos adapterių pasiskirsto itin netolygiai ir gali skirtis net keturis kartus tarp daugiausiai nuskaitymų generuojančių ir, pavyzdžiui, trisdešimtoje pozicijose pagal šį parametą esančių 3'-adapterių (Pav. 3.24 A).

Abiejose bibliotekose detaliau išanalizavę po 30 daugiausiai miRNR nuskaitymų turinčių konkrečios sekos 3'-adapterių pastebėjome, jog didžioji dalis jų pirmoje pozicijoje turi A arba C nukleotidus ir nepasižymi didesniais šališkumais trečios ir ketvirtos pozicijų atžvilgiu. Įvertinę penkiais daugiausiai nuskaitymų turinčiais 3'-adapteriais identifikuojamų konkrečių miRNR kiekius, nustatėme, jog abiejų bibliotekų atveju daugiausiai nuskaitymų generavę adapteriai 5'-gale turintys ACTC ir CUCC sekas pasižymėjo ir didžiausiu skirtingų miRNR įtraukimo į kDNR biblioteką tolygumu (Pav. 3.24

B). Būtent šios 3'-adapterių sekos buvo pasirinktos kaip tinkamiausios efektyviai sekoskaitai naujuoju mDOT-seq metodu.



Pav. 3.24. Konkrečią seką 5'-gale turinčių alkilintų 3'-adapterių generuojamų miRNR nuskaitymų įvertinimas. A. 2C ir 2U alkilinti 3'-adapteriai, kuriems priskiriamas didžiausias kiekis miRNR nuskaitymų. Įterpta – gausiausių adapterių sekų LOGO. B. Kiekybinis miRNR nuskaitymų įvertinimas. Analizuotos bent 1 CPM turinčios miRNR, identifikuotos neatsižvelgiant į paskutinius du jų nukleotidus. Pilkos vertikalios punktyrinės linijos žymi dviejų kartų nuokrypį nuo teorinės vertės.

Taigi, mDOT-seq metodu atlikta miRXplore sekoskaita parodė, jog mūsų sukurtas metodas gali būti panaudotas miRNR sekoskaitai bei padėjo pasirinkti 3'-alkilintus adapterius platesniam mDOT-seq pritaikymui.

3.4.3 mDOT-seq pritaikymas *Lactobacillus casei* BL23 sRNR sekoskaitai

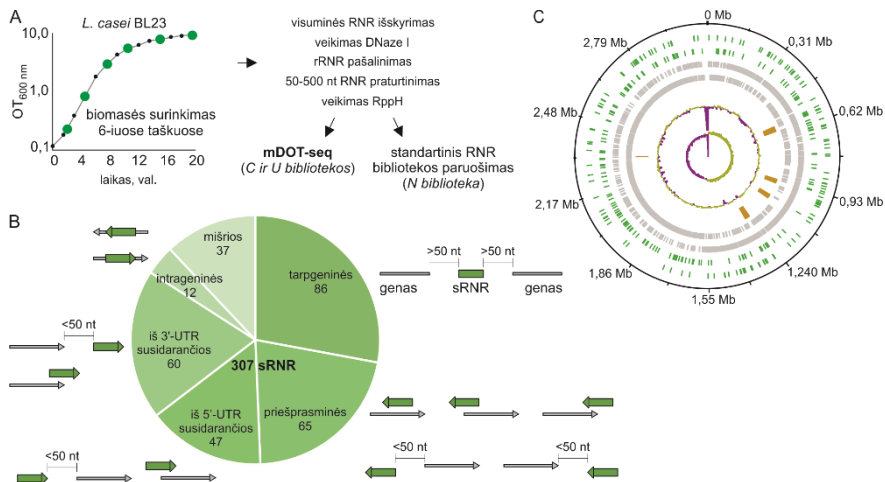
Siekdami įvertinti ar mDOT-seq galėtų būti pritaikytas ilgesnių biologinių RNR sekoskaitai, nusprendėme nuskaityti ir identifikuoti probiotinės bakterijos *L. casei* BL23 mažąsias reguliacines RNR, sRNR (angl. *small*). *L. casei* BL23 – tai viena iš natūralių žarnyno mikroflorą sudarančių, naudingomis fermentacinėmis ir probiotinėmis savybėmis pasižyminčių pienarūgščių bakterijų (angl. *Lactic Acid Bacteria*, LAB) (215–217). LAB pritaikymas maisto ir biomedicinos pramonėje yra susijęs su daugybe stresinių veiksnių, kuriuos bakterijos turi įveikti tiek jų paruošimo procese, tiek ir

patekusios į virškinamąjį traktą. Žinoma, jog kai kuriose geriau ištirtose bakterijose prisitaikyti prie besikeičiančių aplinkos sąlygų bei patiriamo streso padeda būtent mažosios reguliacinės RNR (33). Tikėtina, kad ir *L. casei* sRNR galėtų reguliuoti bakterijų atsaką į biotinius ir abijotinius stresą sukeliančius veiksnius tiek jas paruošiant, tiek prisitaikant prie virškinimo trakto sąlygų.

Siekdami identifikuoti viso *L. casei* BL23 augimo ciklo metu ekspresuojamas mažąsias RNR, visuminę RNR išskyrėme iš šešiose augimo stadijose surinktos bakterijų biomasės (Pav. 3.25 A). DNR priemaišas pašalinome visuminės RNR mėginį paveikę DNAze I (*Thermo Fisher Scientific*). Kadangi ribosominės RNR gali sudaryti net iki 98% visų po RNR sekoskaitos gaunamų nuskaitymų (168–171), 16S ir 23S ribosominės RNR pašalinome hibridizavę jas su komerciniais, o 5S – mūsų sukurtais komplementariais biotilintais oligonukleotidais, šiam tikslui pritaikę Ribominus Transcriptome Isolation Kit, bacteria (*Thermo Fisher Scientific*) rinkinį. Norėdami tirti būtent mažąsias reguliacines RNR, iš denatūruojančio poliakrilamidinio gelio išsigryninome 50-500 nt ilgio, apimančio mažųjų RNR dydžio intervalą (32), RNR. Kadangi į ruošiamą kDNR biblioteką gali būti įtrauktos tik 5'-gale monofostatą turinčios RNR, siekdami nuskaityti ir 5'-monofosfatą turinčias, iš ilgesnių transkriptų iškirptas sRNR, ir 5'-trifosfatus turinčius pirminius transkriptus, turimą RNR rinkinį paveikėme RNR 5'-pirofosfohidrolaze (RppH, *New England Biolabs*) 5'-PPP-RNR hidrolizuojančia iki 5'-P-RNR. Viso buvo paruoštos devynios kDNR bibliotekos – po 3 biologinius mėginius trimis skirtingais metodais: C ir U bibliotekos buvo paruoštos mDOT-seq metodu, pasitelkus anksčiau pasirinktus 5'-gale ACTC ir CUCC sekas turinčius alkilintus 3'-adapterius bei N biblioteka, kuri buvo paruošta naudojant standartinį NEXTFLEX Small RNA-seq Kit v3 (*PerkinElmer*) metodą. Paruošus kDNR bibliotekas buvo atlikta abiejų kDNR grandinių (angl. *paired-end*) Illumina sekoskaita, taip vienu metu identifikuojant abu sRNR galus. Sekoskaitos duomenų analizę atliko Kotryna Kvederavičiūtė.

Įvertinę po sekoskaitos gautų nuskaitymų koreliaciją biologiniuose pakartojimuose, pirmiausia dar kartą patvirtinome, jog ir mDOT-seq, ir NEXTFLEX metodu yra užtikrinamas itin stabilus kDNR bibliotekos paruošimas – visais atvejais Spearman koreliacijos koeficientas buvo lygus 0,96-0,98. Tai, jog Spearman koreliacijos koeficientas tarp skirtingų bibliotekų taip pat buvo itin aukštas – $\geq 0,93$, rodo, jog į kiekvieną jų buvo įtrauktos panašios RNR sekos ir gauti panašūs sekoskaitos rezultatai. Potencialias sRNR nuspėjome pasitelkę APERO algoritimą (211), kurio rezultatai siekiant didesnio tikslumo buvo papildomai įvertinti remiantis

keletu kriterijų: pirma, potencialiomis sRNR laikyti tokie transkriptai, už kurių ribų nuskaitymų kiekis bent viename iš biologinių pakartojimų 2 nt intervale sumažėjo daugiau kaip 2 kartus, antra, potencialios sRNR nuskaitymų kiekis konkrečioje bibliotekoje vidutiniškai turėjo būti didesnis už 15 CPM.



Pav. 3.25. *L. casei* BL23 sRNR sekoakaita mDOT-seq metodu. A. C, U ir N bibliotekų paruošimo schema. B. sRNR suskirstymas į grupes pagal jas koduojančio geno padėtį aplinkinių genų atžvilgiu. Žaliomis rodyklėmis pažymėtos sRNR, pilkomis – anotuotus genus koduojančios sekos. C. Numanomų sRNR pasiskirstymo genome žemėlapis, sugeneruotas DNAplotter įrankiu (212). Pradedant nuo išorės juodame apskritime nurodytos atitinkamos *L. casei* BL23 geno pozicijos, antrame ir trečiame apskritimuose žaliais brūkšneliais pažymėtos prasmninė ir priešprasmninė grandinėje identifikuotos sRNR, atitinkamai, ketvirtame ir penktame apskritimuose pilkais brūkšneliais pažymėti ARS esantys prasmninė ir priešprasmninė grandinėje, atitinkamai, šeštajame apskritime storesniais oranžiniais brūkšneliais pažymėtos profažų sritys, vienu siauresniu kairėje – CRISPR regionas, septintajame apskritime nurodytas GC sąstatas (%), aštuntajame – GC pasiskirstymas apskaičiuotas pagal formulę $(G - C)/(G + C)$ naudojant 10000 bp lango dydį ir 200 bp ilgio žingsnį (abiejuose centriniuose apskritimuose rožinė spalva žymi už vidurkį didesnes, žaliai geltona – mažesnes reikšmes).

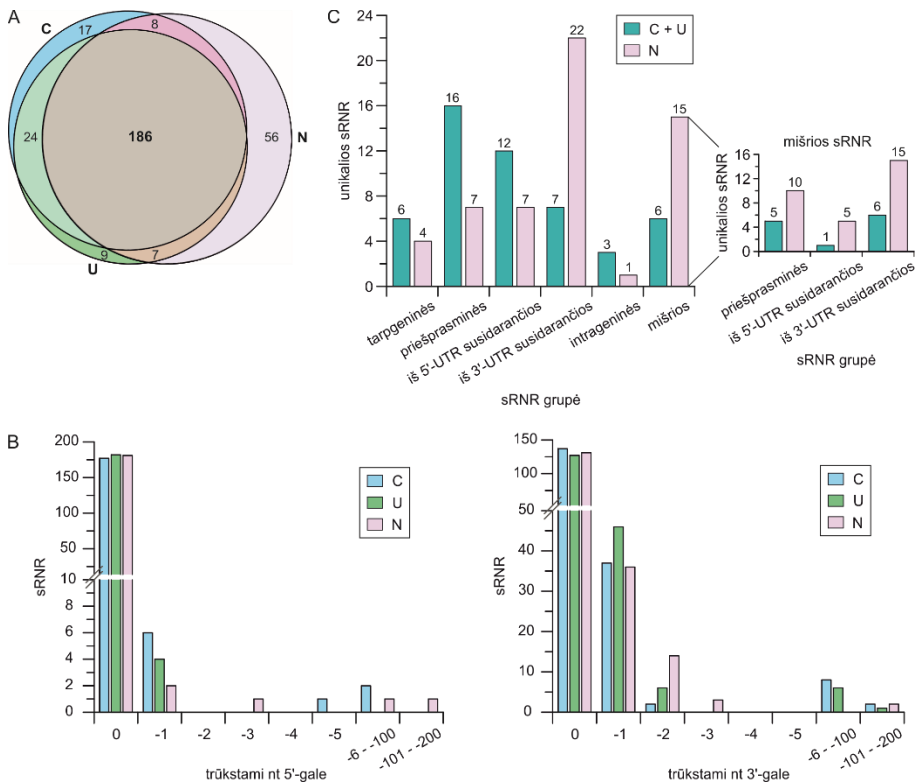
Iš viso trijose bibliotekose identifikavome 307 potencialias sRNR, kurias pagal genominių kontekstą suskirstėme į penkias grupes: 86 tarpgėninės sRNR nuo artimiausių genų nutolusias daugiau kaip per 50 nt, 65 priešprasmnines sRNR, bent dalinai persidengiančias su priešingoje grandinėje koduojamais genais ar už jų arba prieš juos esančiais 50 nt intervalais, 47 iš 5'-netransliuojamų regionų (angl. *UnTranslated Region*, UTR) susidaranti sRNR, dalinai persidengiančias su toje pačioje grandinėje koduojamų genų 5'-galinėmis dalimis ar prieš juos esančiais 50 nt intervalais, 60 iš 3'-UTR

susidarančių sRNR, dalinai persidengiančių su toje pačioje grandinėje koduojamų genų 3'-galinėmis dalimis ar už jų esančiais 50 nt intervalais bei 12 intrageninių, genų viduje koduojamų, sRNR (Pav. 3.25 B, Lentelė p1, priedai). Dar 37 sRNR galėjo būti priskirtos dviem grupėms, tad mes pavadiname jas „mišriomis“ sRNR. Be mažųjų reguliacinių RNR sekoskaitos duomenyse galėjome išskirti ir II-A tipo CRISPR-Cas sistemos transkriptus – trans-koduojamą mažąją RNR (tracrRNR) ir keletą iškirptų CRISPR RNR (crRNR). Šios sekoskaitos analizės metu identifikuotas potencialių sRNR kiekis sutapo su kitose bakterijose gaunamais sekoskaitos eksperimentų rezultatais (102,218). DNAPlotter įrankiu sudarę potencialių sRNR bei atviro skaitymo rėmelių (ASR) pasiskirstymo *L. casei* BL23 genome žemėlapi, pastebėjome, jog pirmaujančioje grandinėje yra koduojama 72% ARS, tačiau tik 56% tarpgeninių (60% visų) sRNR (Pav. 3.25 C). Kadangi ant atsiliekančios grandinės koduojami genai dažniau mutuoja (219), tikėtina, jog sRNR šios mutacijos yra mažiau žalingos, o gal net ir naudingos sRNR bei pačių bakterijų adaptacijai

Iš 307 *L. casei* identifikuotų potencialių sRNR, 235, 226 ir 257 nustatėme C, U ir N bibliotekose, atitinkamai (Pav. 3.26 A). 186 sRNR identifikavome visose kDNR bibliotekose. Palyginę skirtingose bibliotekose nuspėtus šių RNR 5'-galus, pamatėme, jog didžioji dalis jų sutampa (Pav. 3.26 B). Didesnę variaciją nustatėme tik 3'-galų atžvilgiu – 26-32% sRNR buvo būdingos vienu, rečiau keliais nukleotidais trumpesnės sekos. Svarbu pastebėti, jog panašius kiekius trumpesnių sRNR identifikavome visose bibliotekose, nepriklausomai nuo jų paruošimo būdo.

201 bendra sRNR buvo nustatyta tarp įprastu metodu paruoštos N bibliotekos ir mDOT-seq metodu paruoštų abiejų C ir U bibliotekų (C+U) (Pav. 3.26 A). 56 ir 50 sRNR identifikavome tik N ir C+U bibliotekose. Palyginę šias, tik konkrečiose bibliotekose nuspėtas sRNR pastebėjome, jog C+U bibliotekose, lyginant su N biblioteka, identifikuojami panašūs ar kiek didesni kiekiai visos grupėms priskiriamų sRNR, išskyrus iš 3'-UTR susidarančias sRNR. Pastarųjų net 3x daugiau nustatėme išskirtinai N bibliotekoje nei C+U bibliotekose – 22 ir 7 sRNR, o įtraukiant mišriai grupei priskirtas, bet taip pat iš 3'-UTR susidarančias sRNR – 37 ir 13 sRNR, atitinkamai (Pav. 3.26 C). Pasitelkę logistinės regresijos analizę palyginome tik N ir C+U bibliotekose randamas mažąsias RNR pagal keletą parametrų – ilgį, sudaromų antrinių struktūrų stabilumą ir laisvų nukleotidų 3'-gale kiekį. Atliktos analizės rezultatai parodė, jog tik N bibliotekoje identifikuojamos sRNR formuoja stabilesnes antrines struktūras ($p < 0,05$) ir turi trumpesnius

nestruktūrizuotus 3'-galus ($p < 0,001$) lyginant su C+U bibliotekose identifikuotomis sRNR.

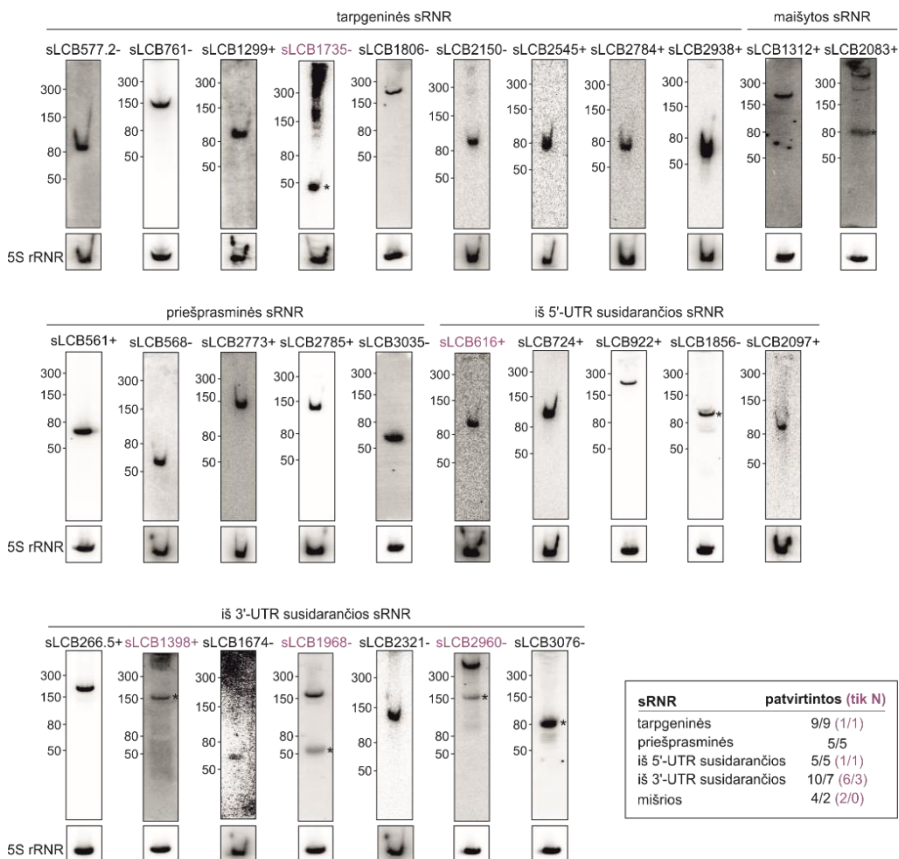


Pav. 3.26. C, U ir N bibliotekose identifikuotos *L. casei* BL23 sRNR. A. Trijose bibliotekose identifikuotų sRNR Veno diagrama. B. Trumpesnius 5'- ir 3'-galus turinčių sRNR kiekis skirtingose bibliotekose. C. Unikalių – tik C+U ir N bibliotekose identifikuojamų – sRNR pasiskirstymas pagal grupes.

Potencialių sRNR raišką ląstelėse patikrinome *Northern* hibridizacijos metodu (Pav. 3.27, eksperimentus atliko Raminta Mineikaitė). Mums pavyko patvirtinti visų analizuotų, visos trijose bibliotekose identifikuotų sRNR raišką. Tačiau tik 3 iš 8 iš 3'-UTR susidarantių ir tik N bibliotekose nuspėtų sRNR buvo patvirtintos *Northern* hibridizacijos metodu. Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, jog dauguma tik N bibliotekose aptinkamų iš 3'-UTR susidarantių transkriptų yra klaidingai priskiriami sRNR. mDOT-seq metodu paruoštos kDNR bibliotekos nepasižymi šiuo šališkumu.

Siekdami nustatyti nuspėtų sRNR funkcijas, atlikome jų paiešką Rfam RNR šeimų duomenų bazėje (220). Didžioji dalis nuspėtų *L. casei* BL23 sRNR pasirodė esančios ir nepanašios į nė vieną anksčiau aprašytą

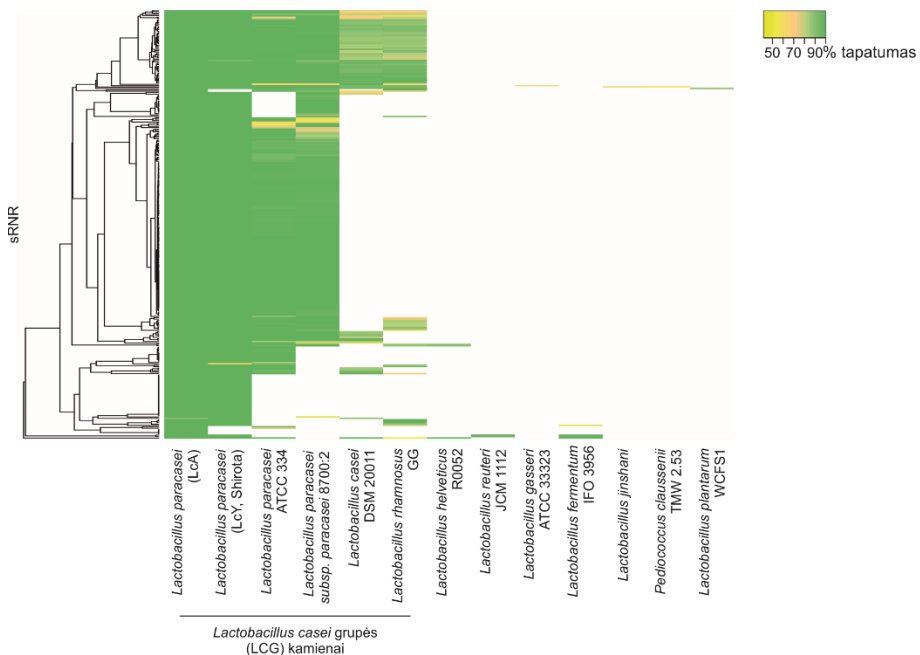
RNR šeimą. 3 potencialios sRNR buvo panašios ir detaliau charakterizuotas „namų ūkio“ (angl. *housekeeping*) sRNR, 14 buvo priskirta *cis* reguliaciniams elementams, 2 buvo homologiškos *Enterococcus* sRNR šeimų transkriptams (Lentelė p1, priedai).



Pav. 3.28. Potencialių sRNR patvirtinimas *Northern* hibridizacijos metodu. Tais atvejais, kai matomos kelios juostelės – žvaigždutėmis pažymėtos tikslinės RNR. 5S rRNR nurodo bendrą analizuotos RNR kiekį. 10 µg visuminės RNR buvo išracionuota 8% dPAG, pernešta ant nailono membranos, hibridizuota su ³²P pažymėtu, pasirinktai RNR komplementariu DNR oligonukleotidu ir vizualizuota radiacijai jautrių fotoekranų pagalba.

Siekdami įvertinti taksonominį nuspėtų sRNR konservatyvumą, atlikome BLAST paiešką šešiuose gimininguose *L. casei* grupės (LCG) bakterijų genomuose bei devyniuose evoliuciškai labiau nutolusių *Lactobacillaceae* šeimos bakterijų genomuose. Kaip ir buvo galima nuspėti, didžiausia dalis homologiškų sekų buvo identifikuota LCG bakterijose, konkrečiai *L. paracasei* LcA ir *L. paracasei* LcY, išskirtuose iš probiotikais praturtintų

Actimel ir Yakult produktų (Pav. 3.29). Visos *L. casei* BL23 identifikuotos sRNR buvo nustatytos ir *L. paracasei* LcA kamiene ir, išskyrus vieną, pasižymėjo > 99% tapatumu. Panašūs rezultatai buvo gauti ir analizuojant *L. paracasei* LcY genomą – tik dviejų *L. casei* BL23 sRNR sekos panašumas buvo mažesnis už 99% ir nė vienos panašios sekos nebuvo nustatyta analizuojant 8-ias sRNR (tikėtina, dėl nepilnos duomenų bazės esančio *L. paracasei* LcY genomo sekos). Šie rezultatai patvirtina didelį trijų kamienų giminingumą, rodantį, jog atliktos sRNR sekoskaitos metu gauti rezultatai galėtų būti pritaikomi ir šiems, plačiai naudojamiems probiotikams. Nuspėtų sRNR homologai taip pat buvo nustatyti ir *L. paracasei* ATCC 334 (246-ioms sRNR), *L. paracasei subsp. paracasei* 8700:2 (242), *L. rhamnosus* GG (81) ir *L. casei* DSM 20011 = JCM 1134 = ATCC 393 (76) kamienuose. Tačiau tik į 9-ias sRNR panašios sekos buvo identifikuotos kitose *Lactobacillaceae* šeimos kamienuose (dviejuose jų nenustatėme nė vienos didesniu nei 40% tapatumu pasižymėjusios sekos). Gauti rezultatai rodo, jog dauguma potencialių *L. casei* BL23 sRNR yra santykinai unikalios ir sutinkamos tik LCG grupės genomuose.



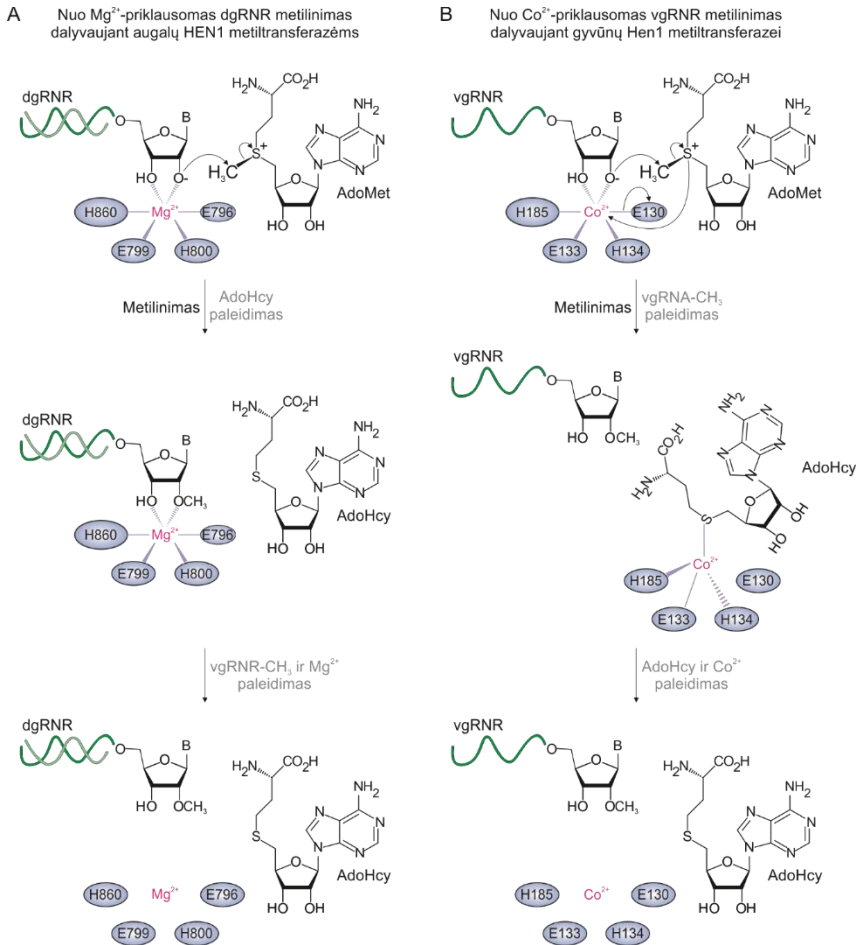
Pav. 3.29. *L. casei* BL23 identifikuotų potencialių sRNR pasiskirstymas *Lactobacillaceae* šeimos kamienuose. Tapačių sRNR paieška buvo atlikta BLASTN įrankiu, vizualizuota Heatmapper programa. Baltai pažymėtos sRNR, kurioms tapachios sekos atitinkamuose genomuose nebuvo nustatytos.

4. APTARIMAS

4.1 DmHen1 ir HsHen1 – *in vitro* nuo kobalto priklausomos RNR metiltransferazės

Nepaisant to, kad į keturias pošeimes pagal domenų išsidėstymą išskiriamos, specifinius RNR substratus modifikuojančios Hen1 metiltransferazės (Pav. 1.7) turi konservatyvius metalo jonus koordinuojančias aminorūgštis, jos pasižymi skirtingu metalo kofaktorių specifiškumu (3). Mg^{2+} jonai katalizuoja augalų AtHEN1 vykdomą reakciją (Huang et al. 2009), o Mn^{2+} užtikrina efektyvų bakterinės Hen1 katalizuojamą metilinimą (132). Mūsų atlikti eksperimentai netikėtai parodė, jog vaisinės muselės ir žmogaus Hen1 metiltransferazės gali būti priskirtos nedidelei, nuo kobalto jonų priklausomų fermentų grupei (221). Mes nustatėme, jog ir Co^{2+} , ir Co^{3+} jonai katalizuoja metiltransferazių vykdomas modifikacijos reakcijas. Vis dėlto, divalentė ar trivalentė kobalto forma užtikrina efektyvų modifikavimą, vienareikšmiškai atsakyti kol kas negalime. Tikėtina, jog nepaisant to, kokių druskų buvo pridėta į reakcijos mišinį, dėl cheminės konversijos tarp Co^{2+} ir Co^{3+} jonų vandeniniame, DTT (0,2 mM) turinčiame tirpale abiejų jų koncentracija galėjo būti pakankama fermentinės reakcijos katalizei. Kita vertus, negalime atmesti, jog reakcijas mėgintuvėliuose iš tiesų katalizavo Co^{3+} jonai, mat $[Co(NH_2)_6]^{3+}$ komplekse elektronų donoriniai ligandai sumažina teigiamą heksakoordinacinio centro krūvį ir elektroniškai jis tampa panašesnis į Co^{2+} . Vis dėlto, itin konservatyvius divalenčius metalo jonus koordinuojančios Hen1 metiltransferazių aminorūgštys (3) bei redukcinė citozolio aplinka (222) leidžia numanyti, jog tikrasis metalo kofaktorius galėtų būti būtent divalenčiai kobalto jonai.

Siekdami paaiškinti didesnę metilinimo efektyvumą reakciją katalizuojant kobalto, bet ne magnio ar mangano, jonams, pateikiame siūlomą nuo Co^{2+} priklausomą RNR metilinimo mechanizmą (Pav. 4.1). Mes manome, kad aktyviajame fermento centre Co^{2+} jonai galėtų ne tik koordinuoti reaguojančias grupes, bet ir pačios metilinimo reakcijos metu galėtų pereiti iš oktaedrinės į energetiškai palankesnę tetraedrinę konfigūraciją. Tetraedrinė Co^{2+} koordinacija vyrauja metalo jonams sąveikaujant su sieros atomu, šiuo atveju – iš demetilinto kofaktoriaus AdoHcy. Toks koordinacinės geometrijos pokytis paskatintų pagrindinio reakcijos produkto – metilintos vgRNR paleidimą, užtikrindamas didesnę fiksuojamą reakcijos efektyvumą.



Pav. 4.1. Siūlomas gyvūnų Hen1 metiltransferazių vykdomo RNR 2'-O-metilimo mechanizmas reakciją katalizuojant skirtingiems metalų kofaktoriams. A. Nuo Mg^{2+} priklausomas metilinimas galėtų vykti kaip pasiūlyta AtHEN1. Šiuo atveju pagrindinė metalo jonų funkcija būtų tikslus reaguojančių grupių išdėstymas fermento aktyviajame centre (4). B. Co^{2+} jonai galėtų paskatinti metilinimo reakciją palengvindami pagrindinio reakcijos produkto – metilintos viengrandinės RNR – paleidimą. Co^{2+} galėtų ne tik koordinuoti reaguojančias grupes aktyviajame fermento centre, bet ir aktyviai dalyvauti metilinimo reakcijoje po metilo grupės pernašos pereinami iš oktaedrinės ir tetraedrinę konfigūraciją, taip paleidžiant metilintą RNR ir vieną iš koordinuojančių glutamatų pakeičiant AdoHcy sieros atomu. Metalo jonus koordinuojančių aminorūgščių numeriai atitinka AtHEN1 ir DmHen1 ar. augalų ir gyvūnų metiltransferazėse, atitinkamai.

Tirtų gyvūnų Hen1 metiltransferazių vykdomos reakcijos gali būti katalizuojamos dalyvaujant ne tik kobalto, bet ir kitiems metalų kofaktoriams, pavyzdžiui Ca^{2+} DmHen1 atveju. Tokia situacija nėra neįprasta, mat yra parodyta, jog ir kiti nuo Co^{2+} priklausomi fermentai gali funkcionuoti su

papildomais metalų kofaktoriais. Pavyzdžiui, žiurkių DL-metilmalonil-KoA racemazė kaip kofaktorius mažėjančio efektyvumo tvarka be Co^{2+} naudoja ir Co^{3+} , Fe^{2+} ir Mn^{2+} jonus (223), žmogaus histonų deacetilazė 8 – Fe^{2+} , Zn^{2+} ir Ni^{2+} (224), o *Trypanosoma brucei* metionino aminopeptidazė 1 – Ni^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} ir Zn^{2+} (225).

4.2 Gyvūnų Hen1 metiltransferazės pasižymi plačiu substratiniu specifiškumu

Atliktų eksperimentų rezultatai atskleidė, jog HsHen1 ir DmHen1 metiltransferazės *in vitro* gali modifikuoti net tik trumpas, natūraliai metilinamas 21-32 nt ilgio RNR, bet ir kur kas ilgesnius 20-80 nt ar net visuminę RNR sudarančius substratus. Kadangi priešingai nei augalų metiltransferazėse (4) šių baltymų antrinėje struktūroje neišskiriami papildomi RNR surišantys domenai, gyvūnų Hen1 metiltransferazės nesudaro stabilių kompleksų su modifikuojama RNR ir, atrodo, neturi jokių papildomų apribojimų jos ilgio atžvilgiu. Iš tiesų, kompiuterinio modeliavimo pagalba parodyta, jog papildomų RNR surišančių domenų neturinti bakterinė CthHen1 metiltransferazė MTaziniu domenu galėtų sąveikauti su vos 3-4 modifikuojamo substrato nukleotidais, tolimesnei RNR sekai neturint įtakos substrato surišimui ir modifikavimui (130). Vis dėlto, tikėtina, kad gyvūnuose *in vivo* konkrečių RNR metilinimas yra užtikrinamas Hen1 metiltransferazėms sudarant kompleksus su PIWI pošeimio baltymais bei modifikuojant būtent jų surištas visiškai subrandintas ir ilgesnes pre-piRNR (5,7,117). Už funkcionalias piRNR ilgesnių (iki 40 nt) jų pirmtakų metilinimas yra nustatytas pelėse (135), *C. elegans* (134), *D. melanogaster* (116) ir tiriant šilkverpių piRNR biogenezės baltymų funkcijas. Pastaruoju atveju parodyta, jog metilinami piRNR pirmtakai negali viršyti tam tikro ilgio limitą (136), kas rodo, jog Hen1 modifikuojamų substratų dydį nulemia metiltransferazės-RNR surišančių baltymų sąveika, jos konformacinės galimybės. Svarbu pastebėti, jog įprastomis sąlygomis funkcionalių, reikiamo ilgio piRNR metilinimas papildomai yra užtikrinamas RNR brendime dalyvaujančiai 3'-5' egzonukleazei konkuruojant su Hen1 metiltransferaze (Wang et al. 2016).

Ankstesniuose antrai ir trečiai pošeimei priskiriamų Hen1 metiltransferazių tyrimuose, buvo nustatyta, jog jų metilinimo efektyvumas priklauso nuo galinio nukleotido (6,132). Iš tiesų ir mūsų tirta HsHen1 metiltransferazė pasižymėjo ryškiu polinkiu nevienodu efektyvumu modifikuoti skirtingus 3'-galinius nukleotidus. Kaip ir pelės mHen1 atveju, 3'-galiniai nukleotidai pagal modifikavimo efektyvumą pasiskirstė tokia eile $\text{A} > \text{C} > \text{U} > \text{G}$ (6). Kas nulemia skirtingą metiltransferazių polinkį netolygiai

modifikuoti konkrečius galinius nukleotidus, kol kas nėra žinoma. Stebimų šališkumą nepaaiškina ir turimi struktūriniai duomenys – metiltransferazei nesąveikaujat su modifikuojamo nukleotido baze, bet kuris galinis nukleotidas turėtų būti metilinamas panašiu efektyvumu (4). Kadangi šių metiltransferazių modifikuojamų mažųjų, dažniausiai piRNR, 3'-gale vienodu dažnumu sutinkami taip pat visi nukleotidai (226), tikėtina, jog *in vivo* papildomi faktoriai užtikrina tolygų skirtingų RNR substratų modifikavimą. Lyginant su HsHen1, DmHen1 pasižymėjo tik itin nedideliu modifikavimo netolygumu, tuo labiau primindamas atitinkamais šališkumais neišsiskiriančią AtHEN1 (52). Net menkiausi netolygumai buvo panaikinti reakcijoms pasitelkus sutrumpintą, C-galinės srities neturintį, DmHen1 variantą – DmHen1ΔC. DmHen1ΔC pasižymėjo ir bendru didesniu įvairios sekos bei ilgio substratų modifikavimo efektyvumu ir efektyviai modifikavo net iš $4,4 \times 10^{12}$ skirtingų sekų variantų sudarytą RNR rinkinį. Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, jog C-galinė DmHen1 dalis neigiamai veikia katalizinio domeno-RNR substrato sąveiką ir/ar pačią metilinimo reakciją.

Parodyta, jog iš kelių domenų sudarytų Hen1 metiltransferazių baziųjų katalizinių funkcijų užtikrinimui pakanka ir vieno metiltransferazinio domeno. AtHen1 MTazinis domenas, kaip ir pilno ilgio baltymas, išlaiko specifiškumą konkrečiai dgRNR, tačiau priklausomai nuo substrato pasižymi sumažėjusiu metilinimo efektyvumu (51). Bakterinio CthHen1 MTaziniam domenui būdingas didesnis aktyvumas lyginant su pilno ilgio baltymu, nors jie abu vienodai netolygiai modifikuoja skirtingus galinius nukleotidus turinčius substratus (130–132). Neseniai nustatyta, jog ir HsHen1 tik iš metiltransferazinio domeno sudarytas baltymas yra aktyvesnis už pilno ilgio metiltransferazę (10). Eksperimentai atlikti naudojant sutrumpintą DmHen1 metiltransferazės variantą, DmHen1ΔC, papildė aktyvų pavienį MTaziną domeną turinčių fermentų sąrašą bei sustiprina hipotezę, jog iš kelių domenų sudaryti Hen1 fermentai galėjo atsirasti MTazinį domeną koduojančiam genui susilieję su papildomų domenų genais, taip konkrečiai metiltransferazei prisitaikant prie specifinių funkcijų (3).

4.3 DmHen1 pritaikymas RNR žymėjimui mTAG metodu

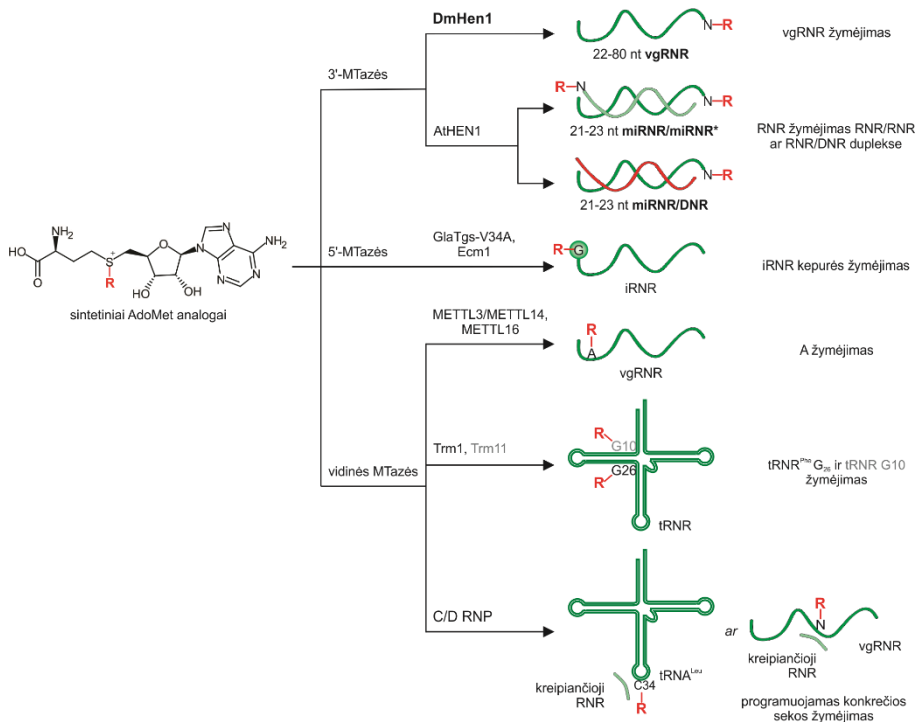
Kartu su dideliu DmHen1 modifikavimo efektyvumu naudojant Co^{2+} kaip metalo kofaktorių bei tolygiu skirtingos sekos ir ilgio RNR substratų modifikavimu, fermento geba pernešti ilgas šonines grandines nuo dvigubai aktyvuotų sintetinių AdoMet analogų leido pritaikyti šią metiltransferazę plačiam spektrui mTAG reakcijų. Dviejų žingsnių mTAG reakcijomis vgRNR modifikavome amino ir azido funkcinėmis grupėmis, kurioms sąveikaujant su

NHS esteriais pirminių aminių-NHS esterių reakcijoje ir galiniais alkiniais Cu(I) katalizuojamoje azidų-alikų 1,3-ciklo prijungimo reakcijoje (CuAAC), atitinkamai, RNR buvo pažymėta fluoroforais ir vizualizuota. Parodę, jog DmHen1 geba pernešti ir itin dideles šonines grandines, atlikome ir vieno žingsnio žymėjimo reakcijas – prie RNR prijungėme biotiną ir Cy3 fluoroforą bei panaudojome juos RNR žymėjimui ir grynimui, atitinkamai. Potencialų platesnį DmHen1 pritaikomumą, galbūt net ir RNR žymėjimui ląstelėse, parodėme nustatę, jog pirma, sintetiniai kofaktoriai neturi neigiamos įtakos metiltransferazės vykdomos RNR modifikacijos greičiui, kuris visais atvejais yra artimas metilnimui, ir antra, jog reakcijos mišinyje esantis AdoMet nesudaro konkurencijos RNR modifikavimui didesne pernešama grupe – reakcijoje su AdoMet ir Ado-6-azido kofaktoriais, azido funkcinę grupę turinčios modifikuotos RNR kiekis yra tiesiogiai proporcingas sintetinio kofaktoriaus daliai mišinyje.

Didelei mūsų nuostabai vieno žingsnio reakcijoje sutrumpintas DmHen1 metiltransferazės variantas, DmHen1 Δ C, lyginant su pilno ilgio baltymu, pasižymėjo kur kas didesniu RNR substrato modifikavimo naudojant Ado-14-Cy3 kofaktorių efektyvumu. Mes manome, kad taip galėtų būti dėl panaikintos inhibitorinės sąveikos tarp C-galinės baltymo dalies ir Cy3 fluoroforo indolo žiedo. Pasitelkę DmHen1 Δ C ir Ado-14-Cy3 kofaktorių mes pademonstravome, jog Cy3 fluoroforu žymėta RNR gali būti specifiskai vizualizuota reakcijos mišinyje ar visuminėje RNR ir Försterio rezonansinės energijos pernašos, FRET (angl. *Förster Resonance Energy Transfer*), metodu net ir nepašalinus nesureagavusio sintetinio kofaktoriaus analogo.

Šiuo metu RNR žymėjimas ir vizualizavimas yra atliekamas pasitelkiant dvi pagrindines strategijas: (I) hibridizaciją ar sintetinių arba pačiose ląstelėse koduojamų žymenų prisijungimą ir (II) tiesioginę cheminę arba fermentinę RNR modifikaciją RNR sintezės metu ar po jos. Iš jų antrojo tipo kovalentiniai fermentiniai RNR žymėjimo metodai išsiskiria stabilumu, biosuderinamumu, selektyvumu ir efektyvumu – savybėmis, įgalinančiomis RNR žymėjimą ne tik *in vitro*, bet ir pačiose ląstelėse (14). Būtent fermentiniam potranskripciniam RNR žymėjimui yra pritaikomos ir kelios grupės RNR metiltransferzių, pernešančių dvigubai aktyvuotas šonines grandines nuo sintetinių AdoMet analogų (Pav. 4.2). Tai iRNR 5'-gale modifikuojantis *Gardia lambia* trimetilguanozino sintetazės variantas GlaTgs2-V34A (20) ir *Encephalitozoon cuniculi* Ecm1 iRNR kepurės guanino N7 metiltransferazė (142), pritaikytos plataus spektro funkcinių grupių pernašai bei RNR vizualizavimą ir praturtinimą įgalinusių žymenų prijungimui (227). RNR sekos viduje konkrečioje pozicijoje modifikuojančios *Pyrococcus furiosus*

tRNR^{Phe}:m²G26 ir *P. abyssi* tRNR:m²G10 metiltransferazės Trm1 ir Trm11, atitinkamai (17), m⁶A metiltransferazės METTL3/METTL14 ir METTL16 (157) bei ribozę 2'-O-pozicijoje modifikuojantis programuojamas *P. abyssi* C/D dėžutės ribonukleoproteininis kompleksas (18), panaudoti dviejų žingsnių RNR žymėjimui fluoroforų ar biotino grupėmis. Ir trumpas dgRNR 3'-gale modifikuojanti *A. thaliana* AtHEN1 metiltransferazė, kurios pagrindu buvo sukurti adresuoto miRNR ir siRNR žymėjimo RNR/RNR bei RNR/DNR dupleksuose metodai (19). Šiame kontekste DmHen1 vykdomas vgRNR žymėjimas išsiskiria kaip vienintelis metiltransferaze paremtas vgRNR 3'-galinio nukleotido modifikavimo metodas, nepriklausantis nuo RNR kepurės modifikacijos, konkretaus nukleotido, nereikalaujantis papildomų nukreipiančių ar modifikuojamai RNR komplementarių oligonukleotidų.



Pav. 4.2. RNR žymėjimui pritaikytos RNR metiltransferazės.

4.4 Naujas kDNR bibliotekos paruošimo metodas – mDOT-seq

Šiame darbe DmHen1 gebą pažymėti vgRNR dviejų žingsnių mTAG metodu pritaikėme ne tik RNR praturtinimui ir vizualizavimui, bet ir 16-28 nt sintetinių miRNR bei 50-500 nt *L. casei* sRNR sekoskaitai. Mes parodėme, jog DmHen1ΔC gali būti panaudotas selektyviam nuo sekos nepriklausomam

RNR 3'-galo modifikavimui azido funkcinę grupę turinčia šonine grandine, po jo sekančiam alkilinto 3'-adapterio prijungimui CuAAC reakcijos metu, 5'-adapterio prisiuvimui, AT ir PGR reakcijoms, t. y. kDNR bibliotekos paruošimui mDOT-seq (angl. *methyltransferase-Directed Orthogonal Tagging and RNA sequencing*) metodu. Nuo sekos, o tuo pačiu ir RNR struktūros, nepriklausomas 3'-adapterio prijungimas mDOT-seq metodu yra puiki alternatyva mažųjų RNR sekoskaitai naudojamam T4 RNR ligazės 2 variantui – T4 trRnl2 K227Q. Parodyta, jog T4 RNR ligazių katalizuojamas adapterių prijungimas yra viena pagrindinių netolygaus RNR įtraukimo į ruošiamą kDNR biblioteką priežasčių. Naudojant T4 trRnl2 K227Q konkrečios RNR dalis kDNR bibliotekoje, taigi ir nuskaitymų kiekis, priklauso nuo RNR ir 3'-adapterio sekos, jų vidinių ir tarpusavyje sudaromų struktūrų (23–29,167). Iš tiesų, ir mūsų atliktos sekoskaitos metu, tik standartiniu, T4 RNR ligazę 2 naudojančiu protokolu, nuskaitytos potencialios *L. casei* sRNR, turėjo stabilesnes antrines struktūras ir trumpesnius nestruktūrizuotus 3'-galus, lyginant su sRNR nuskaitytomis mDOT-seq metodu paruoštose kDNR bibliotekose. Toks nuo struktūros priklausomas, netolygus RNR įtraukimas į kDNR biblioteką atitinkamai lėmė iš 3'-URT susidarančių fragmentų praturtinimą, dalies kurių kaupimosi ląstelėje nepavyko patvirtinti *Northern* hibridizacijos metodu. Svarbu pažymėti, kad tai, jog mDOT-seq metodu RNR įtraukimas į ruošiamą kDNR biblioteką nepriklauso ir nuo 3'-adapterio sekos, suteikia galimybę į šį adapterį įterpti mėginiui specifinę barkodo seką bei ankstyvose kDNR bibliotekos paruošimo stadijose apjungti keletą skirtingų mėginių. Tai leistų ne tik padidinti sekančių reakcijų efektyvumą dėl didesnės bendros reaguojančių molekulių koncentracijos, bet ir sumažintų sekoskaitos eksperimento kaštus.

Ruošiant kDNR biblioteką mDOT-seq metodu, RNR su 3'-adapteriu yra sujungiama iš 14 anglies atomų, įskaitant ir triazolo žiedą, sudaryta alifatine grandine, neišvengiamai interferuojančia su atvirkštinės transkripcijos reakcija. Vis dėlto, tiek abi šiame darbe tirtos, tiek papildomai laboratorijoje analizuotos atvirkštinės transkriptazės (tarp kurių ypatingu efektyvumu išsiskyrė RNazės H aktyvumo neturintys fermentai; rezultatai nepateikti), pasirodė sugebančios įveikti minėtą jungtį. Efektyvią kDNR sintezę, o kartu ir tiksliausią miRNR kiekybinį įvertinimą užtikrino antroje pozicijoje alkilinti 3'-adapteriai. Antroje pozicijoje alkilintas oligonukleotidas buvo pasitelktas ir sekos viduje esančio DNR 5-hidrioksimetilcitozino sekoskaitai hmTOP-seq metodu jungtį tarp hmC ir oligonukleotido įveikiant DNR polimerazei. Sumodeliavę galimą trinario komplekso struktūrą autoriai parodė, jog per antrą poziciją su matricine grandine sujungtas DNR

oligonukleotidas erdvėje išsidėsto taip, jog yra sudaroma stekinga sąveika tarp modifikuoto hmC ir 3'-galinio DNR adapterio nukleotido, taip užtikrinant būtent ties hmC prasidedančią komplementarios grandinės sintezę (228). Tikėtina, jog panaši kDNR sintezei palanki struktūra galėtų susidaryti ir RNR-3'-adapterio atveju. Tai, jog miRXplore sekoskaitos metu dalis RNR buvo nuskaityta ne nuo pirmo, o nuo antro ar trečio nukleotido nuo 3'-galo, tikėtina, bent dalinai nulėmė ne tikslaus pozicionavimo tarp RNR ir 3'-adapterio nebuvimas, bet nepilna šių RNR sintezė. Baroin-Tourancheau su kolegomis taip pat pastebėjo, jog apie 10% nuskaitymų po miRXplore sekoskaitos būna vienu ar dviem nukleotidais trumpesni (229). Tai, jog didžiąją dalį atvejų mDOT-seq metodu iš tiesų yra identifikuojami tikslūs RNR 3'-galai, patvirtina ir *L. casei* sRNR sekoskaitos rezultatai, rodantys, jog standartiniu metodu paruoštose kDNR bibliotekose nuskaitytų RNR 3'-galinės ribos pasižymi tokia pačia variacija.

Mes parodėme, jog efektyvus skirtingų RNR įtraukimas į kDNR biblioteką po alkilinto 3'-adapterio prijungimo sekančiose stadijose priklauso ne tik nuo alkilinto nukleotido pozicijos DNR grandinėje, bet ir nuo jo aplinkos, konkrečiai 5'-galinio 3'-adapterio nukleotido. C ir A galinius nukleotidus turėję 3'-adapteriai pasižymėjo didžiausiu miRNR nuskaitymų kiekiu. Tikėtina, jog į didįjį griovį nukreiptos egzociklinės amino grupės šiuo atveju galėjo sudaryti palankias sąveikas su triazolu žiedu, taip palengvindamos efektyvią kDNR sintezę užtikrinančią sąveiką tarp galinių RNR ir 3'-adapterio nukleotidų.

Kadangi miRNR ir bakterinių sRNR sekoskaitos rezultatai gauti naudojant 2U ir 2C alkilintus 3'-adapterius yra itin panašūs, bet kuris jų, o gal net abu galėtų būti naudojami sekančių mDOT-seq eksperimentų metu. Papildomai metodas galėtų būti optimizuotas pasirinkus efektyvesnę atvirkštinę transkriptazę. Kadangi prieš šią reakciją esančios kDNR paruošimo stadijos nepasižymėjo identifikuojamais šališkumais, tikėtina, kad pakeitus AT fermentą galėtų būti eliminuoti po miRNR sekoskaitos gauti netolygumai.

Nuo 2017 metų RNR sekoskaitai buvo pritaikytos ir m⁶A METTL3/METTL14 ir METTL16 metiltransferazės dviem žingsniais RNR pažymėjus atvirkštinę transkripciją blokuojančia (21,154), jos mutacijas sukeliančia (155) ar pačią RNR degraduojančia (156) grupe. Šiame kontekste mDOT-seq išsiskiria kaip pirmasis metodas panaudojantis RNR metiltransferazę 3'-adapterio prijungimui. Laboratorijoje atliktų eksperimentų metu alkilinto 3'-adapterio prijungimas mDOT-seq metodu buvo pademonstruotas ir su *A. thaliana* AtHEN1, taip parodant, jog šis metodas gali būti pritaikytas ir 21-24 nt dgRNR sekoskaitai. Mes manome, jog abi

metiltransferazės galėtų būti panaudotos transkriptomų analizei ir *in situ* ar, pasitelkus metabolinį žymėjimą, *in vivo* eksperimentuose, o šiame darbe sėkmingai pademonstruoti pagrindiniai mDOT-seq metodo principai galėtų būti pritaikyta ir kitoms RNR metiltransferazėms. Kadangi, išskyrus GlcTgs2-V34A, nė viena iki šiol ištirta aktyvuotas šonines grupes nuo sintetinių AdoMet analogų pernešanti metiltransferazė pastarosios reakcijos katalizei nereikalauja papildomų mutacijų (17,18,20,21,52,142), tikėtina, jog net kelios jų galėtų būti pritaikytos lygiagrečiam skirtingų RNR profiliavimui mDOT-seq metodu.

4.5 *Lactobacillus casei* BL23 sRNR sekoskaita mDOT-seq metodu

Pritaikius mDOT-seq metodą mūsų žiniomis šiame darbe pirmą kartą buvo detalai charakterizuotas *L. casei* BL23 mažųjų reguliacinių RNR transkriptomas, mat iki šiol tik vieno tyrimo metu buvo identifikuota keletas *Lactobacillus* genties sRNR fragmentų (230). Iš viso mes identifikavome 307 potencialias sRNR, iš kurių daugiau negu trečdalis buvo priskirtos iš 5'-netransliuojamos iRNR srities (UTR, angl. *UnTranslated Region*), 3'-UTR ir intrageninių sričių susidarančioms sRNR. Šie rezultatai sutampa su naujausiais kitų laboratorijų atliktais tyrimais, patvirtinančiais, jog iš tiesų didelė dalis potencialių sRNR yra koduojamos minėtuose geno regionuose (102,105,231)

Kadangi daugiau nei penktadalis *L. casei* BL23 identifikuotų potencialių sRNR pasirodė besančios konservatyvios analizuotuose *Lactobacillus casei* grupės (LCG) kamienuose, mes manome, jog šio tyrimo rezultatai galėtų pasitarnauti geresniam pačių LCG bakterijų fiziologijos supratimui ar net platesniam jų pritaikymui medicinoje ir maisto pramonėje. LCG – tai vienos plačiausiai tyrinėjamų bei sveikatos palaikymui ir gydymui pritaikomų probiotinių bakterijų. Parodyta, jog LCG vartojimas subalansuoja žarnyno mikrobiotą, teigiamai veikia psichinę sveikatą, sumažina alergijų riziką, padeda suvaldyti infekcinių ar net autoimuninių ligų, tarp jų ir vėžio, vystymąsi. Pačios LCG tiek jų paruošimo metu, tiek ir virškinamajame trakte susiduria su daugybe stresinių faktorių, į kuriuos reaguoja moduluodamos ląstelės sienelės sudėtį, metabolizmą, šaperonų raišką (217,232). Parodyta, jog kitose, detaliau ištirtose bakterijose atsaką į stresą reguliuoja mažosios RNR (33). Mes tikimės, jog šio tyrimo metu surinkti duomenys bus naudingi sRNR vaidmens LCG patiriamam stresui supratimui ir galbūt net platesniam šių bakterijų pritaikymui.

IŠVADOS

1. Nuo Co^{2+} ir Co^{3+} jonų priklausančios *Drosophila melanogaster* DmHen1 ir *Homo sapiens* HsHen1 RNR metiltransferazės *in vitro* gali pernešti ne tik metilo, bet ir didesnes šonines grandines nuo sintetinių AdoMet analogų ant gamtinių 22-28 nt ir ilgesnių viengrandinės RNR substratų.
2. DmHen1 metiltransferazė gali būti pritaikyta 22-80 nt ilgio RNR vieno ir dviejų žingsnių žymėjimui fluoroforais ir biotinu, kurie gali būti sėkmingai panaudoti RNR vizualizavimui ir praturtinimui.
3. C-galinės dalies neturintis DmHen1 variantas, DmHen1 Δ C, pasižymi didesniu RNR substratų modifikavimo efektyvumu ir mažesniu šališkumu skirtingų 3'-galinių nukleotidų atžvilgiu, bei gali būti pritaikytas RNR vizualizavimui FRET metodu visuminės RNR mėginyje.
4. Sukurtas naujas, viengrandinės RNR sekoskaitai skirtos kopijinės DNR bibliotekos paruošimo metodas mDOT-seq (angl. *methyltransferase-Directed Orthogonal Tagging and RNA sequencing*), panaudojantis DmHen1 Δ C gebą azido grupę turinčia pernešama grandine modifikuoti bet kokios sekos viengrandinę RNR. Nustatyta, jog mDOT-seq nepasižymi standartinei RNR sekoskaitai būdingu struktūrizuotų RNR 3'-galų nustatymo šališkumu.
5. Parodyta, jog mDOT-seq gali būti pritaikytas eukariotinių mikroRNR, miRNR, ir bakterinių mažųjų reguliacinių RNR, sRNR, identifikavimui sekoskaitos metu. Pasitelkus mDOT-seq pirmą kartą charakterizuotos probiotinės *Lactobacillus casei* BL23 bakterijos mažosios reguliacinės RNR.

SANTRAUKA

Gyvūnų Hen1 metiltransferazės – tai iš N-galinio metiltransferazinio (MTazinio) domeno ir variabilaus ilgio C-galinės srities sudaryti fermentai, katalizuojantys nuo *S*-adenozil-L-metionino (AdoMet) priklausomą dalies mažųjų nekoduojančių RNR 3'-galinio nukleotido 2'-O-ribozės metilinimą. Ši modifikacija apsaugo mažąsias RNR nuo uridilino ir degradacijos, o Hen1 baltymo trūkumas jo nesintetinančiuose organizmuose sukelia žalingus fenotipinius pokyčius. Vis dėlto, kokiomis fermentinėmis savybėmis pasižymi šie, gyvūnams itin svarbūs baltymai, kol kas nėra detalai iširta. Trūksta informacijos ir apie tai, kokią įtaką gyvūnų Hen1 metiltransferaziniui aktyvumui turi C-galinė baltymo sritis. Iki šiol nėra tirta ir galimybė pritaikyti gyvūnų Hen1 metiltransferazės kovalentiniam chemofermentiniam RNR žymėjimui reporterinėmis grupėmis pernešant už metilą didesnes, aktyvuotas šonines grandines nuo sintetinių AdoMet analogų ant modifikuojamos RNR. Kovalentinis chemofermentinis RNR žymėjimas išsiskiria stabilumu, biosuderinamumu, selektyvumu ir efektyvumu – savybėmis, įgalinančiomis RNR modifikavimą ne tik *in vitro*, bet ir pačiose ląstelėse. Ir nors šiuo metu kelios RNR metiltransferazių klasės jau yra pritaikytos RNR žymėjimui, tačiau kol kas nė viena jų neužtikrina nuo papildomų faktorių nepriklausomo, selektyvaus gausiausios RNR grupės – viengrandinių RNR – 3'-galo modifikavimo. Be to, chemofermentinis, gyvūnų Hen1 metiltransferazių kataliziniu aktyvumu paremtas, nuo sekos ir struktūros nepriklausantis viengrandinės RNR žymėjimas 3'-gale potencialiai galėtų būti pritaikytas ir mažųjų RNR sekoskaitai. Gyvūnų Hen1 metiltransferazės galėtų būti alternatyva šiuo metu mažųjų RNR kopijinės DNR (kDNR) bibliotekos paruošimui naudojamai T4 RNR ligazei 2, neužtikrinančiai tolygaus 3'-adapterio prijungimo prie skirtingos sekos ir struktūros RNR molekulių.

Taigi, šio darbo tikslas buvo charakterizuoti *Drosophila melanogaster* DmHen1 ir *Homo sapiens* HsHen1 metiltransferazių katalizuojamas fermentines reakcijas, ir pritaikyti gyvūnų Hen1 baltymą viengrandinių RNR žymėjimui reporterinėmis grupėmis ir sekoskaitai.

Pateikiamame darbe pirmą kartą išsamiai aprašėme gyvūnų Hen1 metiltransferazių vykdomas fermentines reakcijas: atradome, jog *D. melanogaster* DmHen1 ir *H. sapiens* HsHen1 metiltransferazės pasižymi nuo Co^{2+} ir Co^{3+} jonų priklausomu fermentiniu aktyvumu; parodėme, jog DmHen1 vykdomos reakcijos greitis ir efektyvumas tik nežymiai priklauso nuo konkretaus modifikuojamo nukleotido, o HsHen1 atveju išsidėsto $\text{A} \approx \text{C} > \text{U} > \text{G}$ eilė; nustatėme, jog *in vitro* sąlygomis tiriami baltymai modifikuoja ne tik

gamtinius 22-28 nt, bet ir ilgesnius RNR substratus; atradome, jog ir HsHen1, ir DmHen1 gali pernešti už metilo grupę didesnes šonines grandines su reporterinėmis ar funkcinėmis grupėmis nuo sintetinių kofaktoriaus analogų ant modifikuojamų RNR substratų. Taigi, gali būti pritaikyti vieno ir dviejų žingsnių RNR žymėjimo reakcijoms; parodėme, jog DmHen1 C-galinė sritis nėra būtina ir net slopina fermentinį baltymo aktyvumą. C-galinės srities neturintis metiltransferazės variantas, DmHen1 Δ C, neišskiria RNR substratų pagal 3'-galinį nukleotidą ir gali būti pasitelktas tolygiam RNR molekulių žymėjimui.

Atliktų tyrimų metu DmHen1 ir DmHen1 Δ C pirmą kartą pritaikėme viengrandinės RNR 3'-galo žymėjimui vieno ir dviejų žingsnių metodu. Fluoroforais modifikuotą RNR vizualizavome nustatę jų fluorescenciją ar Försterio rezonansinės energijos pernašos, FRET (angl. *Förster Resonance Energy Transfer*), signalą, biotilintą RNR išgryninome iš reakcijos mišinio pasitelkę biotino-streptavidino sąveiką, o prie azido grupę turinčios RNR prijungę oligonukleotidą, susintetinome kopijinę DNR. Remdamiesi pastarąja reakcija sukūrėme mDOT-seq (angl. *methyltransferase-Directed Orthogonal Tagging and RNA sequencing*) – viengrandinės RNR sekoskaitai skirtą kDNR paruošimo metodą. Parodėme, jog mDOT-seq gali būti pasitelktas mažųjų RNR, pavyzdžiui 21-24 nt ilgio mikroRNR (miRNR) sekoskaitai. Pritaikę mDOT-seq pirmą kartą detaliai charakterizavome ir ilgesnes, 50-500 nt, probiotinės *Lactobacillus casei* BL23 bakterijos mažąsias reguliacines RNR, sRNR (angl. *small*).

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Boccaletto P, Machnicka MA, Purta E, Piątkowski P, Bagiński B, Wirecki TK, ir kt. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Research*. 2018 m. sausio 4 d.;46(D1):D303–7.
2. Ayadi L, Galvanin A, Pichot F, Marchand V, Motorin Y. RNA ribose methylation (2'-O-methylation): Occurrence, biosynthesis and biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2019 m. kovas;1862(3):253–69.
3. Huang RH. Unique 2'-O-Methylation by Hen1 in Eukaryotic RNA Interference and Bacterial RNA Repair. *Biochemistry*. 2012 m. gegužės 22 d.;51(20):4087–95.
4. Huang Y, Ji L, Huang Q, Vassilyev DG, Chen X, Ma J-B. Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature*. 2009 m. spalio;461(7265):823–7.
5. Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Siomi H, Siomi MC. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev*. 2007 m. liepos 1 d.;21(13):1603–8.
6. Kirino Y, Mourelatos Z. The mouse homolog of HEN1 is a potential methylase for Piwi-interacting RNAs. *RNA*. 2007 m. liepos 13 d.;13(9):1397–401.
7. Horwich MD, Li C, Matranga C, Vagin V, Farley G, Wang P, ir kt. The *Drosophila* RNA Methyltransferase, DmHen1, Modifies Germline piRNAs and Single-Stranded siRNAs in RISC. *Current Biology*. 2007 m. liepa;17(14):1265–72.
8. Chan CM, Zhou C, Huang RH. Reconstituting Bacterial RNA Repair and Modification in Vitro. *Science*. 2009 m. spalio 9 d.;326(5950):247–247.
9. Abe M, Naqvi A, Hendriks G-J, Feltzin V, Zhu Y, Grigoriev A, ir kt. Impact of age-associated increase in 2'-O-methylation of miRNAs on aging and neurodegeneration in *Drosophila*. *Genes & Development*. 2014 m. sausio 1 d.;28(1):44–57.
10. Peng L, Zhang F, Shang R, Wang X, Chen J, Chou JJ, ir kt. Identification of substrates of the small RNA methyltransferase Hen1 in mouse spermatogonial stem cells and analysis of its methyl-transfer domain. *J Biol Chem*. 2018 m. birželio 29 d.;293(26):9981–94.
11. Kamminga LM, Luteijn MJ, den Broeder MJ, Redl S, Kaaij LJT, Roovers EF, ir kt. Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in zebrafish. *EMBO J*. 2010 m. lapkričio 3 d.;29(21):3688–700.

12. Mattay J, Dittmar M, Rentmeister A. Chemoenzymatic strategies for RNA modification and labeling. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2021 m. rugpjūčio 1 d.;63:46–56.
13. Muthmann N, Guez T, Vasseur J-J, Jaffrey SR, Debart F, Rentmeister A. Combining Chemical Synthesis and Enzymatic Methylation to Access Short RNAs with Various 5' Caps. *ChemBioChem*. 2019 m.;20(13):1693–700.
14. Anhäuser L, Rentmeister A. Enzyme-mediated tagging of RNA. *Current Opinion in Biotechnology*. 2017 m. gruodžio 1 d.;48:69–76.
15. George JT, Srivatsan SG. Bioorthogonal chemistry-based RNA labeling technologies: evolution and current state. *Chem Commun*. 2020 m. spalio 15 d.;56(82):12307–18.
16. Holstein JM, Stummer D, Rentmeister A. Engineering *Giardia lamblia* trimethylguanosine synthase (GlaTgs2) to transfer non-natural modifications to the RNA 5'-cap. *Protein Eng Des Sel*. 2015 m. birželis;28(6):179–86.
17. Motorin Y, Burhenne J, Teimer R, Koynov K, Willnow S, Weinhold E, ir kt. Expanding the chemical scope of RNA:methyltransferases to site-specific alkynylation of RNA for click labeling. *Nucleic Acids Research*. 2011 m. kovo 1 d.;39(5):1943–52.
18. Tomkuvienė M, Clouet-d'Orval B, Černiauskas I, Weinhold E, Klimašauskas S. Programmable sequence-specific click-labeling of RNA using archaeal box C/D RNP methyltransferases. *Nucleic Acids Research*. 2012 m. rugpjūčio 1 d.;40(14):6765–73.
19. Osipenko A, Plotnikova A, Nainytė M, Masevičius V, Klimašauskas S, Vilkaitis G. Oligonucleotide-Addressed Covalent 3'-Terminal Derivatization of Small RNA Strands for Enrichment and Visualization. *Angew Chem*. 2017 m. birželio 1 d.;129(23):6607–10.
20. Schulz D, Holstein JM, Rentmeister A. A Chemo-Enzymatic Approach for Site-Specific Modification of the RNA Cap. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013 m.;52(30):7874–8.
21. Shu X, Dai Q, Wu T, Bothwell IR, Yue Y, Zhang Z, ir kt. *N*⁶-Allyladenosine: A New Small Molecule for RNA Labeling Identified by Mutation Assay. *J Am Chem Soc*. 2017 m. gruodžio 6 d.;139(48):17213–6.
22. Viollet S, Fuchs RT, Munafo DB, Zhuang F, Robb GB. T4 RNA Ligase 2 truncated active site mutants: improved tools for RNA analysis. *BMC Biotechnol*. 2011 m. liepos 1 d.;11(1):72.
23. Hafner M, Renwick N, Brown M, Mihailovic A, Holoch D, Lin C, ir kt. RNA-ligase-dependent biases in miRNA representation in deep-sequenced small RNA cDNA libraries. *RNA*. 2011 m. rugsėjo 1 d.;17(9):1697–712.

24. Zhang Z, Lee JE, Riemondy K, Anderson EM, Yi R. High-efficiency RNA cloning enables accurate quantification of miRNA expression by deep sequencing. *Genome Biol.* 2013 m.;14(10):R109.
25. Heyer EE, Ozadam H, Ricci EP, Cenik C, Moore MJ. An optimized kit-free method for making strand-specific deep sequencing libraries from RNA fragments. *Nucleic Acids Research.* 2015 m. sausio 9 d.;43(1):e2–e2.
26. Jayaprakash AD, Jabado O, Brown BD, Sachidanandam R. Identification and remediation of biases in the activity of RNA ligases in small-RNA deep sequencing. *Nucleic Acids Research.* 2011 m. lapkričio 1 d.;39(21):e141–e141.
27. Zhuang F, Fuchs RT, Sun Z, Zheng Y, Robb GB. Structural bias in T4 RNA ligase-mediated 3'-adapter ligation. *Nucleic Acids Research.* 2012 m. balandžio 1 d.;40(7):e54–e54.
28. Fuchs RT, Sun Z, Zhuang F, Robb GB. Bias in Ligation-Based Small RNA Sequencing Library Construction Is Determined by Adaptor and RNA Structure. Zhang B, sudarytojas. *PLoS ONE.* 2015 m. gegužės 5 d.;10(5):e0126049.
29. Jackson TJ, Spriggs RV, Burgoyne NJ, Jones C, Willis AE. Evaluating bias-reducing protocols for RNA sequencing library preparation. *BMC Genomics.* 2014 m.;15(1):569.
30. Axtell MJ. Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annual Review of Plant Biology.* 2013 m.;64(1):137–59.
31. Soleimani S, Valizadeh Arshad Z, Moradi S, Ahmadi A, Davarpanah SJ, Azimzadeh Jamalkandi S. Small regulatory noncoding RNAs in *Drosophila melanogaster*: biogenesis and biological functions. *Briefings in Functional Genomics.* 2020 m. liepos 29 d.;19(4):309–23.
32. Carrier M-C, Lalaouna D, Massé E. Broadening the Definition of Bacterial Small RNAs: Characteristics and Mechanisms of Action. *Annual Review of Microbiology.* 2018 m.;72(1):141–61.
33. Holmqvist E, Wagner EGH. Impact of bacterial sRNAs in stress responses. *Biochemical Society Transactions.* 2017 m. lapkričio 3 d.;45(6):1203–12.
34. Borges F, Martienssen RA. The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 m. gruodis;16(12):727–41.
35. Sheu-Gruttadauria J, MacRae IJ. Structural Foundations of RNA Silencing by Argonaute. *Journal of Molecular Biology.* 2017 m. rugpjūčio 18 d.;429(17):2619–39.
36. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, ir kt. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004 m. spalio 13 d.;23(20):4051–60.

37. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 m. rugsējis;425(6956):415–9.
38. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004 m. lapkritis;432(7014):231–5.
39. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004 m. gruodžio 15 d.;18(24):3016–27.
40. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*. 2004 m. sausio 2 d.;303(5654):95–8.
41. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001 m. sausis;409(6818):363–6.
42. Kok KH, Ng M-HJ, Ching Y-P, Jin D-Y. Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with Dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *J Biol Chem*. 2007 m. birželio 15 d.;282(24):17649–57.
43. Ye X, Paroo Z, Liu Q. Functional anatomy of the Drosophila microRNA-generating enzyme. *J Biol Chem*. 2007 m. rugsėjo 28 d.;282(39):28373–8.
44. Seitz H, Tushir JS, Zamore PD. A 5'-uridine amplifies miRNA/miRNA* asymmetry in Drosophila by promoting RNA-induced silencing complex formation. *Silence*. 2011 m. birželio 7 d.;2:4.
45. Li Z, Xu R, Li N. MicroRNAs from plants to animals, do they define a new messenger for communication? *Nutrition & Metabolism*. 2018 m. spalio 1 d.;15(1):68.
46. Kurihara Y, Watanabe Y. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *PNAS*. 2004 m. rugpjūčio 24 d.;101(34):12753–8.
47. Song L, Han M-H, Lesicka J, Fedoroff N. Arabidopsis primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. *PNAS*. 2007 m. kovo 27 d.;104(13):5437–42.
48. Dong Z, Han M-H, Fedoroff N. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *PNAS*. 2008 m. liepos 22 d.;105(29):9970–5.
49. Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, et al. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*. 2005 m. vasario 11 d.;307(5711):932–5.

50. Baranauskė S, Mickutė M, Plotnikova A, Finke A, Venclovas Č, Klimašauskas S, ir kt. Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase: HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins. *Nucleic Acids Research*. 2015 m. kovo 11 d.;43(5):2802–12.
51. Vilkaitis G, Plotnikova A, Klimasauskas S. Kinetic and functional analysis of the small RNA methyltransferase HEN1: The catalytic domain is essential for preferential modification of duplex RNA. *RNA*. 2010 m. spalio 1 d.;16(10):1935–42.
52. Plotnikova A, Baranauskė S, Osipenko A, Auskas SK, Vilkaitis G. Mechanistic insights into small RNA recognition and modification by the HEN1 methyltransferase. 2013 m.;16.
53. Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS. Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *PNAS*. 2005 m. kovo 8 d.;102(10):3691–6.
54. Baumberger N, Baulcombe DC. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *PNAS*. 2005 m. rugpjūčio 16 d.;102(33):11928–33.
55. Chou C-H, Shrestha S, Yang C-D, Chang N-W, Lin Y-L, Liao K-W, ir kt. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. 2018 m. sausio 4 d.;46(D1):D296–302.
56. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol*. 2018 m.;9:402.
57. Yu Y, Jia T, Chen X. The 'how' and 'where' of plant microRNAs. *New Phytologist*. 2017 m.;216(4):1002–17.
58. Gasiulė S, Stankevičius V, Patamsytė V, Ražanskas R, Žukovas G, Kapustina Ž, ir kt. Tissue-Specific miRNAs Regulate the Development of Thoracic Aortic Aneurysm: The Emerging Role of KLF4 Network. *Journal of Clinical Medicine*. 2019 m. spalio;8(10):1609.
59. Czech B, Malone CD, Zhou R, Stark A, Schlingeheyde C, Dus M, ir kt. An endogenous small interfering RNA pathway in Drosophila. *Nature*. 2008 m. birželis;453(7196):798–802.
60. Soares ZG, Gonçalves ANA, de Oliveira KPV, Marques JT. Viral RNA recognition by the Drosophila small interfering RNA pathway. *Microbes and Infection*. 2014 m. gruodžio 1 d.;16(12):1013–21.
61. Okamura K, Chung W-J, Ruby JG, Guo H, Bartel DP, Lai EC. The Drosophila hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature*. 2008 m. birželis;453(7196):803–6.
62. Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing

- RNAi Enzyme Complexes. *Cell*. 2005 m. lapkričio 18 d.;123(4):607–20.
63. Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. Evidence that siRNAs Function as Guides, Not Primers, in the *Drosophila* and Human RNAi Pathways. *Molecular Cell*. 2002 m. rugsėjo 1 d.;10(3):537–48.
 64. Sala L, Chandrasekhar S, Vidigal JA. AGO unchained: Canonical and non-canonical roles of Argonaute proteins in mammals. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2020 m. sausio 1 d.;25:1–42.
 65. Yang Z. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Research*. 2006 m. sausio 30 d.;34(2):667–75.
 66. Mosher RA, Schwach F, Studholme D, Baulcombe DC. PolIVb influences RNA-directed DNA methylation independently of its role in siRNA biogenesis. *PNAS*. 2008 m. vasario 26 d.;105(8):3145–50.
 67. Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, ir kt. Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants. *PLOS Biology*. 2004 m. vasario 24 d.;2(5):e104.
 68. Martienssen R, Moazed D. RNAi and Heterochromatin Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 m. rugpjūčio 1 d.;7(8):a019323.
 69. Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu J-K. Endogenous siRNAs Derived from a Pair of Natural cis-Antisense Transcripts Regulate Salt Tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*. 2005 m. gruodžio 29 d.;123(7):1279–91.
 70. Zhan S, Lukens L. Protein-Coding cis-Natural Antisense Transcripts Have High and Broad Expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2013 m. balandžio 1 d.;161(4):2171–80.
 71. Zhang X, Xia J, Lii YE, Barrera-Figueroa BE, Zhou X, Gao S, ir kt. Genome-wide analysis of plant nat-siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. *Genome Biol*. 2012 m.;13(3):R20.
 72. Lee CH, Carroll BJ. Evolution and Diversification of Small RNA Pathways in Flowering Plants. *Plant and Cell Physiology*. 2018 m. lapkričio 1 d.;59(11):2169–87.
 73. Chen H-M, Li Y-H, Wu S-H. Bioinformatic prediction and experimental validation of a microRNA-directed tandem trans-acting siRNA cascade in *Arabidopsis*. *PNAS*. 2007 m. vasario 27 d.;104(9):3318–23.
 74. Howell MD, Fahlgren N, Chapman EJ, Cumbie JS, Sullivan CM, Givan SA, ir kt. Genome-Wide Analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 Pathway in *Arabidopsis*

- Reveals Dependency on miRNA- and tasiRNA-Directed Targeting. *The Plant Cell*. 2007 m. kovo 1 d.;19(3):926–42.
75. Deng P, Muhammad S, Cao M, Wu L. Biogenesis and regulatory hierarchy of phased small interfering RNAs in plants. *Plant Biotechnology Journal*. 2018 m.;16(5):965–75.
 76. Sanan-Mishra N, Abdul Kader Jailani A, Mandal B, Mukherjee SK. Secondary siRNAs in Plants: Biosynthesis, Various Functions, and Applications in Virology. *Front Plant Sci*. 2021 m.;12:110.
 77. Czech B, Munafò M, Ciabrelli F, Eastwood EL, Fabry MH, Kneuss E, ir kt. piRNA-Guided Genome Defense: From Biogenesis to Silencing. *Annual Review of Genetics*. 2018 m.;52(1):131–57.
 78. Sato K, Siomi MC. The piRNA pathway in *Drosophila* ovarian germ and somatic cells. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2020 m.;96(1):32–42.
 79. Mohn F, Handler D, Brennecke J. piRNA-guided slicing specifies transcripts for Zucchini-dependent, phased piRNA biogenesis. *Science*. 2015 m. gegužės 15 d.;348(6236):812–7.
 80. Yashiro R, Murota Y, Nishida KM, Yamashiro H, Fujii K, Ogai A, ir kt. Piwi Nuclear Localization and Its Regulatory Mechanism in *Drosophila* Ovarian Somatic Cells. *Cell Reports*. 2018 m. birželio 19 d.;23(12):3647–57.
 81. Yu Y, Gu J, Jin Y, Luo Y, Preall JB, Ma J, ir kt. Panoramix enforces piRNA-dependent cotranscriptional silencing. *Science*. 2015 m. spalio 16 d.;350(6258):339–42.
 82. Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, ir kt. Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell*. 2007 m. kovo 23 d.;128(6):1089–103.
 83. Hayashi R, Schnabl J, Handler D, Mohn F, Ameres SL, Brennecke J. Genetic and mechanistic diversity of piRNA 3'-end formation. *Nature*. 2016 m. lapkritis;539(7630):588–92.
 84. Senti K-A, Jurczak D, Sachidanandam R, Brennecke J. piRNA-guided slicing of transposon transcripts enforces their transcriptional silencing via specifying the nuclear piRNA repertoire. *Genes Dev*. 2015 m. rugpjūčio 15 d.;29(16):1747–62.
 85. Wu X, Pan Y, Fang Y, Zhang J, Xie M, Yang F, ir kt. The Biogenesis and Functions of piRNAs in Human Diseases. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2020 m. rugsėjis 4 d.;21:108–20.
 86. Chen S, Ben S, Xin J, Li S, Zheng R, Wang H, ir kt. The biogenesis and biological function of PIWI-interacting RNA in cancer. *J Hematol Oncol*. 2021 m. birželio 12 d.;14(1):93.
 87. Gimpel M, Brantl S. Dual-function small regulatory RNAs in bacteria. *Molecular Microbiology*. 2017 m.;103(3).

88. Hör J, Matera G, Vogel J, Gottesman S, Storz G. Trans-Acting Small RNAs and Their Effects on Gene Expression in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *EcoSal Plus*. 2020 m. kovas;9(1).
89. Melamed S, Peer A, Faigenbaum-Romm R, Gatt YE, Reiss N, Bar A, ir kt. Global Mapping of Small RNA-Target Interactions in Bacteria. *Molecular Cell*. 2016 m. rugsėjo 1 d.;63(5):884–97.
90. Wassarman KM. 6S RNA, A Global Regulator of Transcription. *Microbiol Spectr*. 2018 m. gegužė;6(3).
91. Quendera AP, Seixas AF, dos Santos RF, Santos I, Silva JPN, Arraiano CM, ir kt. RNA-Binding Proteins Driving the Regulatory Activity of Small Non-coding RNAs in Bacteria. *Front Mol Biosci*. 2020 m.;7:78.
92. Li W, Ying X, Lu Q, Chen L. Predicting sRNAs and their targets in bacteria. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2012 m. spalio;10(5):276–84.
93. Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell*. 2009 m. vasario 20 d.;136(4):615–28.
94. Dutta T, Srivastava S. Small RNA-mediated regulation in bacteria: A growing palette of diverse mechanisms. *Gene*. 2018 m. gegužės 20 d.;656:60–72.
95. Schu DJ, Zhang A, Gottesman S, Storz G. Alternative Hfq-sRNA interaction modes dictate alternative mRNA recognition. *The EMBO Journal*. 2015 m. spalio 14 d.;34(20):2557–73.
96. Barquist L, Vogel J. Accelerating Discovery and Functional Analysis of Small RNAs with New Technologies. *Annu Rev Genet*. 2015 m.;49:367–94.
97. Wagner EGH, Romby P. Chapter Three - Small RNAs in Bacteria and Archaea: Who They Are, What They Do, and How They Do It. *Adv Gen*. 2015 m.;90:133–208.
98. Feng L, Rutherford ST, Papenfort K, Bagert JD, van Kessel JC, Tirrell DA, ir kt. A Qrr non-coding RNA deploys four different regulatory mechanisms to optimize quorum-sensing dynamics. *Cell*. 2015 m. sausio 15 d.;160(0):228–40.
99. Chen J, Morita T, Gottesman S. Regulation of Transcription Termination of Small RNAs and by Small RNAs: Molecular Mechanisms and Biological Functions. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 m.;9:201.
100. Miyakoshi M, Chao Y, Vogel J. Cross talk between ABC transporter mRNAs via a target mRNA-derived sponge of the GcvB small RNA. *EMBO J*. 2015 m. birželio 3 d.;34(11):1478–92.
101. Haq IU, Müller P, Brantl S. SR7 – a dual-function antisense RNA from *Bacillus subtilis*. *RNA Biology*. 2021 m. sausio 2 d.;18(1):104–17.

102. Adams PP, Storz G. Prevalence of small base-pairing RNAs derived from diverse genomic loci. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2020 m. liepos 1 d.;1863(7):194524.
103. Fröhlich KS, Förstner KU, Gitai Z. Post-transcriptional gene regulation by an Hfq-independent small RNA in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res*. 2018 m. lapkričio 16 d.;46(20):10969–82.
104. Loh E, Dussurget O, Gripenland J, Vaitkevicius K, Tiensuu T, Mandin P, ir kt. A trans-Acting Riboswitch Controls Expression of the Virulence Regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell*. 2009 m. lapkričio 13 d.;139(4):770–9.
105. Adams PP, Baniulyte G, Esnault C, Chegireddy K, Singh N, Monge M, ir kt. Regulatory roles of *Escherichia coli* 5' UTR and ORF-internal RNAs detected by 3' end mapping. Westermann A, Struhl K, Westermann A, Miyakoshi M, sudarytojai. *eLife*. 2021 m. sausio 18 d.;10:e62438.
106. Chao Y, Vogel J. A 3' UTR-Derived Small RNA Provides the Regulatory Noncoding Arm of the Inner Membrane Stress Response. *Mol Cell*. 2016 m. vasario 4 d.;61(3):352–63.
107. Hoyos M, Huber M, Förstner KU, Papenfort K. Gene autoregulation by 3' UTR-derived bacterial small RNAs. Wade JT, Struhl K, Wade JT, sudarytojai. *eLife*. 2020 m. rugpjūčio 3 d.;9:e58836.
108. Lalaouna D, Carrier M-C, Semsey S, Brouard J-S, Wang J, Wade JT, ir kt. A 3' external transcribed spacer in a tRNA transcript acts as a sponge for small RNAs to prevent transcriptional noise. *Mol Cell*. 2015 m. gegužės 7 d.;58(3):393–405.
109. Koeppen K, Hampton TH, Jarek M, Scharfe M, Gerber SA, Mielcarz DW, ir kt. A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles. *PLoS Pathog*. 2016 m. birželis;12(6):e1005672.
110. Thomason MK, Bischler T, Eisenbart SK, Förstner KU, Zhang A, Herbig A, ir kt. Global Transcriptional Start Site Mapping Using Differential RNA Sequencing Reveals Novel Antisense RNAs in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2015 m. sausio 1 d.;197(1):18–28.
111. Zhao Y, Yu Y, Zhai J, Ramachandran V, Dinh TT, Meyers BC, ir kt. The Arabidopsis Nucleotidyl Transferase HESO1 Uridylates Unmethylated Small RNAs to Trigger Their Degradation. *Current Biology*. 2012 m. balandis;22(8):689–94.
112. Chen X, Liu J, Cheng Y, Jia D. HEN1 functions pleiotropically in Arabidopsis development and acts in C function in the flower. *Development*. 2002 m. kovo 1 d.;129(5):1085–94.
113. Abe M, Yoshikawa T, Nosaka M, Sakakibara H, Sato Y, Nagato Y, ir kt. *WAVY LEAF1*, an Ortholog of Arabidopsis *HEN1*, Regulates

- Shoot Development by Maintaining MicroRNA and Trans-Acting Small Interfering RNA Accumulation in Rice. *Plant Physiol.* 2010 m. lapkritis;154(3):1335–46.
114. Molnár A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, Baulcombe DC. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature.* 2007 m. birželio 28 d.;447(7148):1126–9.
 115. Kurth HM, Mochizuki K. 2'-O-methylation stabilizes Piwi-associated small RNAs and ensures DNA elimination in *Tetrahymena*. *RNA.* 2009 m. vasario 13 d.;15(4):675–85.
 116. Wang H, Ma Z, Niu K, Xiao Y, Wu X, Pan C, ir kt. Antagonistic roles of Nibbler and Hen1 in modulating piRNA 3' ends in *Drosophila*. *Development.* 2016 m. vasario 1 d.;143(3):530–9.
 117. Liang H, Jiao Z, Rong W, Qu S, Liao Z, Sun X, ir kt. 3'-Terminal 2'-O-methylation of lung cancer miR-21-5p enhances its stability and association with Argonaute 2. *Nucleic Acids Res.* 2020 m. liepos 27 d.;48(13):7027–40.
 118. Lim SL, Qu ZP, Kortschak RD, Lawrence DM, Geoghegan J, Hempfling A-L, ir kt. HENMT1 and piRNA Stability Are Required for Adult Male Germ Cell Transposon Repression and to Define the Spermatogenic Program in the Mouse. Frye M, sudarytojas. *PLoS Genet.* 2015 m. spalio 23 d.;11(10):e1005620.
 119. Gainetdinov I, Colpan C, Cecchini K, Albosta P, Jouravleva K, Vega-Badillo J, ir kt. Terminal Modification, Sequence, and Length Determine Small RNA Stability in Animals. *bioRxiv.* 2020 m. rugsėjo 8 d.;2020.09.08.287979.
 120. Billi AC, Alessi AF, Khivansara V, Han T, Freeberg M, Mitani S, ir kt. The *Caenorhabditis elegans* HEN1 Ortholog, HENN-1, Methylates and Stabilizes Select Subclasses of Germline Small RNAs. Kim SK, sudarytojas. *PLoS Genet.* 2012 m. balandžio 19 d.;8(4):e1002617.
 121. Montgomery TA, Rim Y-S, Zhang C, Dowen RH, Phillips CM, Fischer SEJ, ir kt. PIWI Associated siRNAs and piRNAs Specifically Require the *Caenorhabditis elegans* HEN1 Ortholog henn-1. Kim SK, sudarytojas. *PLoS Genet.* 2012 m. balandžio 19 d.;8(4):e1002616.
 122. Svendsen JM, Reed KJ, Vijayasarathy T, Montgomery BE, Tucci RM, Brown KC, ir kt. henn-1/HEN1 Promotes Germline Immortality in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Reports.* 2019 m. gruodžio 3 d.;29(10):3187-3199.e4.
 123. Modepalli V, Fridrich A, Agron M, Moran Y. The methyltransferase HEN1 is required in *Nematostella vectensis* for microRNA and piRNA stability as well as larval metamorphosis. *PLOS Genetics.* 2018 m. rugpjūčio 17 d.;14(8):e1007590.

124. Moran Y, Praher D, Fredman D, Technau U. The Evolution of MicroRNA Pathway Protein Components in Cnidaria. *Molecular Biology and Evolution*. 2013 m. gruodžio 1 d.;30(12):2541–52.
125. Shi H, Barnes RL, Carriero N, Atayde VD, Tschudi C, Ullu E. Role of the Trypanosoma brucei HEN1 Family Methyltransferase in Small Interfering RNA Modification. *Eukaryotic Cell*. 2014 m. sausio 1 d.;13(1):77–86.
126. Ameres SL, Horwich MD, Hung J-H, Xu J, Ghildiyal M, Weng Z, ir kt. Target RNA-Directed Trimming and Tailing of Small Silencing RNAs. *Science*. 2010 m. birželio 18 d.;328(5985):1534–9.
127. Kingston ER, Bartel DP. Ago2 protects Drosophila siRNAs and microRNAs from target-directed degradation, even in the absence of 2'-O-methylation. *RNA*. 2021 m. birželio 1 d.;27(6):710–24.
128. Wang P, Selvadurai K, Huang RH. Reconstitution and structure of a bacterial Pnkp1-Rnl-Hen1 RNA repair complex. *Nat Commun*. 2015 m. balandžio 17 d.;6:6876.
129. Wang P, Chan CM, Christensen D, Zhang C, Selvadurai K, Huang RH. Molecular basis of bacterial protein Hen1 activating the ligase activity of bacterial protein Pnkp for RNA repair. *PNAS*. 2012 m. rugpjūčio 14 d.;109(33):13248–53.
130. Mui Chan C, Zhou C, Brunzelle JS, Huang RH. Structural and biochemical insights into 2'-O-methylation at the 3'-terminal nucleotide of RNA by Hen1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 m. spalio 20 d.;106(42):17699–704.
131. Jain R, Shuman S. Bacterial Hen1 is a 3' terminal RNA ribose 2'-O-methyltransferase component of a bacterial RNA repair cassette. *RNA*. 2010 m. vasario 1 d.;16(2):316–23.
132. Jain R, Shuman S. Active site mapping and substrate specificity of bacterial Hen1, a manganese-dependent 3' terminal RNA ribose 2'-O-methyltransferase. *RNA*. 2011 m. kovas;17(3):429–38.
133. Zhang C, Chan CM, Wang P, Huang RH. Probing the substrate specificity of the bacterial Pnkp/Hen1 RNA repair system using synthetic RNAs. *RNA*. 2012 m. vasario 1 d.;18(2):335–44.
134. Tang W, Tu S, Lee H-C, Weng Z, Mello CC. The RNase PARN-1 Trims piRNA 3' Ends to Promote Transcriptome Surveillance in *C. elegans*. *Cell*. 2016 m. vasario 25 d.;164(5):974–84.
135. Nishimura T, Nagamori I, Nakatani T, Izumi N, Tomari Y, Kuramochi-Miyagawa S, ir kt. PNLDC1, mouse pre-piRNA Trimmer, is required for meiotic and post-meiotic male germ cell development. *EMBO reports*. 2018 m. kovo 1 d.;19(3):e44957.
136. Izumi N, Shoji K, Sakaguchi Y, Honda S, Kirino Y, Suzuki T, ir kt. Identification and Functional Analysis of the Pre-piRNA 3' Trimmer in Silkworms. *Cell*. 2016 m. vasario 25 d.;164(5):962–73.

137. Dalhoff C, Lukinavičius G, Klimašauskas S, Weinhold E. Direct transfer of extended groups from synthetic cofactors by DNA methyltransferases. *Nature Chemical Biology*. 2006 m. sausis;2(1):31–2.
138. Bothwell IR, Luo M. Large-Scale, Protection-Free Synthesis of *Se*-Adenosyl- L -selenomethionine Analogues and Their Application as Cofactor Surrogates of Methyltransferases. *Org Lett*. 2014 m. birželio 6 d.;16(11):3056–9.
139. Tomkuvienė M, Mickutė M, Vilkaitis G, Klimašauskas S. Repurposing enzymatic transferase reactions for targeted labeling and analysis of DNA and RNA. *Current Opinion in Biotechnology*. 2019 m. vasario 1 d.;55:114–23.
140. Winz M-L, Linder EC, André T, Becker J, Jäschke A. Nucleotidyl transferase assisted DNA labeling with different click chemistries. *Nucleic Acids Res*. 2015 m. rugsėjo 30 d.;43(17):e110.
141. Klöcker N, Weissenboeck FP, Rentmeister A. Covalent labeling of nucleic acids. *Chem Soc Rev*. 2020 m. gruodžio 7 d.;49(23):8749–73.
142. Holstein JM, Anhäuser L, Rentmeister A. Modifying the 5'-Cap for Click Reactions of Eukaryotic mRNA and To Tune Translation Efficiency in Living Cells. *Angewandte Chemie International Edition*. 2016 m.;55(36):10899–903.
143. Holstein JM, Schulz D, Rentmeister A. Bioorthogonal site-specific labeling of the 5'-cap structure in eukaryotic mRNAs. *Chem Commun*. 2014 m. balandžio 1 d.;50(34):4478–81.
144. Holstein JM, Stummer D, Rentmeister A. Enzymatic modification of 5'-capped RNA with a 4-vinylbenzyl group provides a platform for photoclick and inverse electron-demand Diels–Alder reaction. *Chem Sci*. 2015 m. sausio 19 d.;6(2):1362–9.
145. Muttach F, Rentmeister A. A Biocatalytic Cascade for Versatile One-Pot Modification of mRNA Starting from Methionine Analogues. *Angewandte Chemie International Edition*. 2016 m.;55(5):1917–20.
146. Muttach F, Muthmann N, Reichert D, Anhäuser L, Rentmeister A. A benzylic linker promotes methyltransferase catalyzed norbornene transfer for rapid bioorthogonal tetrazine ligation. *Chem Sci*. 2017 m. lapkričio 20 d.;8(12):7947–53.
147. Muttach F, Mäsing F, Studer A, Rentmeister A. New AdoMet Analogues as Tools for Enzymatic Transfer of Photo-Cross-Linkers and Capturing RNA–Protein Interactions. *Chemistry – A European Journal*. 2017 m.;23(25):5988–93.
148. Stummer D, Herrmann C, Rentmeister A. Quantum Chemical Calculations and Experimental Validation of the Photoclick Reaction for Fluorescent Labeling of the 5' cap of Eukaryotic mRNAs. *ChemistryOpen*. 2015 m.;4(3):295–301.

149. Holstein JM, Muttach F, Schiefelbein SHH, Rentmeister A. Dual 5' Cap Labeling Based on Regioselective RNA Methyltransferases and Bioorthogonal Reactions. *Chemistry – A European Journal*. 2017 m.;23(25):6165–73.
150. Muttach F, Muthmann N, Rentmeister A. Chemo-enzymatic modification of eukaryotic mRNA. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2017 m.;15(2):278–84.
151. Michailidou F, Klöcker N, Cornelissen NV, Singh RK, Peters A, Ovcharenko A, ir kt. Engineered SAM Synthetases for Enzymatic Generation of AdoMet Analogs with Photocaging Groups and Reversible DNA Modification in Cascade Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*. 2021 m.;60(1):480–5.
152. Anhäuser L, Klöcker N, Muttach F, Mäsing F, Špaček P, Studer A, ir kt. A Benzophenone-Based Photocaging Strategy for the N7 Position of Guanosine. *Angewandte Chemie International Edition*. 2020 m.;59(8):3161–5.
153. Reichert D, Mootz H, Rentmeister A. Light-control of cap methylation and mRNA translation via genetic code expansion of Ecm1. *Chemical Science*. 2021 m.;12(12):4383–8.
154. Shu X, Cao J, Cheng M, Xiang S, Gao M, Li T, ir kt. A metabolic labeling method detects m6A transcriptome-wide at single base resolution. *Nat Chem Biol*. 2020 m. rugpjūčio;16(8):887-95.
155. Hartstock K, Nilges BS, Ovcharenko A, Cornelissen NV, Püllen N, Lawrence-Dörner A-M, ir kt. Enzymatic or In Vivo Installation of Propargyl Groups in Combination with Click Chemistry for the Enrichment and Detection of Methyltransferase Target Sites in RNA. *Angewandte Chemie International Edition*. 2018 m.;57(21):6342–6.
156. Mikutis S, Gu M, Sendinc E, Hazemi ME, Kiely-Collins H, Aspris D, ir kt. meCLICK-Seq, a Substrate-Hijacking and RNA Degradation Strategy for the Study of RNA Methylation. *ACS Cent Sci*. 2020 m. gruodžio 23 d.;6(12):2196-208.
157. Ovcharenko A, Weissenboeck FP, Rentmeister A. Tag-Free Internal RNA Labeling and Photocaging Based on mRNA Methyltransferases. *Angewandte Chemie International Edition*. 2021 m.;60(8):4098–103.
158. Liu J, Yue Y, Han D, Wang X, Fu Y, Zhang L, ir kt. A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*. 2014 m. vasaris;10(2):93–5.
159. Alberti C, Manzenreither RA, Sowemimo I, Burkard TR, Wang J, Mahofsky K, ir kt. Cell-type specific sequencing of microRNAs from complex animal tissues. *Nat Methods*. 2018 m.;15(4):283–9.
160. Griffin BE. Separation of 32P-labelled ribonucleic acid components. The use of polyethylenimine-cellulose (TLC) as a second dimension in

- separating oligoribonucleotides of '4.5 S' and 5 S from *E. coli*. FEBS Letters. 1971 m. birželio 24 d.;15(3):165–8.
161. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell. 1993 m. gruodžio 3 d.;75(5):843–54.
 162. Lu C, Tej SS, Luo S, Haudenschild CD, Meyers BC, Green PJ. Elucidation of the Small RNA Component of the Transcriptome. Science. 2005 m. rugsėjo 2 d.;309(5740):1567–9.
 163. Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, ir kt. Deep Sequencing Analysis of Small Noncoding RNA and mRNA Targets of the Global Post-Transcriptional Regulator, Hfq. PLOS Genetics. 2008 m. rugpjūčio 22 d.;4(8):e1000163.
 164. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. Nucleic Acids Research. 2019 m. sausio 8 d.;47(D1):D155–62.
 165. Raabe CA, Tang T-H, Brosius J, Rozhdestvensky TS. Biases in small RNA deep sequencing data. Nucleic Acids Research. 2014 m. vasaris;42(3):1414–26.
 166. Song Y, Liu KJ, Wang T-H. Elimination of Ligation Dependent Artifacts in T4 RNA Ligase to Achieve High Efficiency and Low Bias MicroRNA Capture. Lin B, sudarytojas. PLoS ONE. 2014 m. balandžio 10 d.;9(4):e94619.
 167. Sorefan K, Pais H, Hall AE, Kozomara A, Griffiths-Jones S, Moulton V, ir kt. Reducing ligation bias of small RNAs in libraries for next generation sequencing. Silence. 2012 m.;3(1):4.
 168. Prezza G, Heckel T, Dietrich S, Homberger C, Westermann AJ, Vogel J. Improved bacterial RNA-seq by Cas9-based depletion of ribosomal RNA reads. RNA. 2020 m. balandžio 28 d.;rna.075945.120.
 169. Giannoukos G, Ciulla DM, Huang K, Haas BJ, Izard J, Levin JZ, ir kt. Efficient and robust RNA-seq process for cultured bacteria and complex community transcriptomes. Genome Biology. 2012 m. kovo 28 d.;13(3):r23.
 170. Kröger C, Dillon SC, Cameron ADS, Papenfort K, Sivasankaran SK, Hokamp K, ir kt. The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. PNAS. 2012 m. gegužės 15 d.;109(20):E1277–86.
 171. He S, Wurtzel O, Singh K, Froula JL, Yilmaz S, Tringe SG, ir kt. Validation of two ribosomal RNA removal methods for microbial metatranscriptomics. Nat Methods. 2010 m. spalio;7(10):807–12.
 172. Bhagwat AA, Ying ZI, Smith A. Evaluation of Ribosomal RNA Removal Protocols for *Salmonella* RNA-Seq Projects. AiM. 2014 m.; 04(01):25-32.

173. Liu JM, Livny J, Lawrence MS, Kimball MD, Waldor MK, Camilli A. Experimental discovery of sRNAs in *Vibrio cholerae* by direct cloning, 5S/tRNA depletion and parallel sequencing. *Nucleic Acids Research*. 2009 m. balandžio 1 d.;37(6):e46–e46.
174. Albrecht M, Sharma CM, Dittrich MT, Müller T, Reinhardt R, Vogel J, ir kt. The transcriptional landscape of *Chlamydia pneumoniae*. *Genome Biol*. 2011 m.;12(10):R98.
175. Morlan JD, Qu K, Sinicropi DV. Selective Depletion of rRNA Enables Whole Transcriptome Profiling of Archival Fixed Tissue. *PLOS ONE*. 2012 m. rugpjūčio 10 d.;7(8):e42882.
176. Archer SK, Shirokikh NE, Preiss T. Selective and flexible depletion of problematic sequences from RNA-seq libraries at the cDNA stage. *BMC Genomics*. 2014 m.;15(1):401.
177. Yi H, Cho Y-J, Won S, Lee J-E, Jin Yu H, Kim S, ir kt. Duplex-specific nuclease efficiently removes rRNA for prokaryotic RNA-seq. *Nucleic Acids Research*. 2011 m. lapkritis;39(20):e140–e140.
178. Chen YG, Kowtoniuk WE, Agarwal I, Shen Y, Liu DR. LC/MS analysis of cellular RNA reveals NAD-linked RNA. *Nat Chem Biol*. 2009 m. gruodis;5(12):879–81.
179. Kowtoniuk WE, Shen Y, Heemstra JM, Agarwal I, Liu DR. A chemical screen for biological small molecule–RNA conjugates reveals CoA-linked RNA. *PNAS*. 2009 m. gegužės 12 d.;106(19):7768–73.
180. Heidrich N, Dugar G, Vogel J, Sharma CM. Investigating CRISPR RNA Biogenesis and Function Using RNA-seq. Lundgren M, Charpentier E, Fineran PC, sudarytojai. *CRISPR: Methods and Protocols*. 2015 m.;1–21.
181. Sharma CM, Vogel J. Differential RNA-seq: the approach behind and the biological insight gained. *Current Opinion in Microbiology*. 2014 m. birželis;19:97–105.
182. Desgranges E, Caldeleri I, Marzi S, Lalaouna D. Navigation through the twists and turns of RNA sequencing technologies: Application to bacterial regulatory RNAs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2020 m. kovas;1863(3):194506.
183. Ettwiller L, Buswell J, Yigit E, Schildkraut I. A novel enrichment strategy reveals unprecedented number of novel transcription start sites at single base resolution in a model prokaryote and the gut microbiome. *BMC Genomics*. 2016 m. gruodis;17(1):199.
184. Innocenti N, Golumbeanu M, Fouquier d'Hérouël A, Lacoux C, Bonnin RA, Kennedy SP, ir kt. Whole-genome mapping of 5' RNA ends in bacteria by tagged sequencing: a comprehensive view in *Enterococcus faecalis*. *RNA*. 2015 m. gegužė;21(5):1018–30.
185. Vvedenskaya IO, Bird JG, Zhang Y, Zhang Y, Jiao X, Barvík I, ir kt. CapZyme-Seq Comprehensively Defines Promoter-Sequence

- Determinants for RNA 5' Capping with NAD⁺. *Molecular Cell*. 2018 m. gegužė;70(3):553-564.e9.
186. Cahová H, Winz M-L, Höfer K, Nübel G, Jäschke A. NAD captureSeq indicates NAD as a bacterial cap for a subset of regulatory RNAs. *Nature*. 2015 m. kovas;519(7543):374–7.
 187. Hu H, Flynn N, Zhang H, You C, Hang R, Wang X, ir kt. SPAAC-NAD-seq, a sensitive and accurate method to profile NAD⁺-capped transcripts. *PNAS*. 2021 m. kovo 30 d.;118(13):e2025595118.
 188. Zhang H, Zhong H, Wang X, Zhang S, Shao X, Hu H, ir kt. Use of NAD tagSeq II to identify growth phase-dependent alterations in *E. coli* RNA NAD⁺ capping. *PNAS*. 2021 m. balandžio 6 d.;118(14):e2026183118.
 189. Zhang H, Zhong H, Zhang S, Shao X, Ni M, Cai Z, ir kt. NAD tagSeq reveals that NAD⁺-capped RNAs are mostly produced from a large number of protein-coding genes in *Arabidopsis*. *PNAS*. 2019 m. birželio 11 d.;116(24):12072–7.
 190. Munafó DB, Robb GB. Optimization of enzymatic reaction conditions for generating representative pools of cDNA from small RNA. *RNA*. 2010 m. gruodžio 1 d.;16(12):2537–52.
 191. Shuman S, Lima CD. The polynucleotide ligase and RNA capping enzyme superfamily of covalent nucleotidyltransferases. *Current Opinion in Structural Biology*. 2004 m. gruodžio 1 d.;14(6):757–64.
 192. Hafner M, Landgraf P, Ludwig J, Rice A, Ojo T, Lin C, ir kt. Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods*. 2008 m. sausio 1 d.;44(1):3–12.
 193. Lama L, Cobo J, Buenaventura D, Ryan K. Small RNA-seq: The RNA 5'-end adapter ligation problem and how to circumvent it. *J Biol Methods*. 2019 m. vasario 20 d.;6(1):108.
 194. Giraldez MD, Spengler RM, Etheridge A, Godoy PM, Barczak AJ, Srinivasan S, ir kt. Comprehensive multi-center assessment of small RNA-seq methods for quantitative miRNA profiling. *Nat Biotechnol*. 2018 m. rugsėjis;36(8):746–57.
 195. Baran-Gale J, Kurtz CL, Erdos MR, Sison C, Young A, Fannin EE, ir kt. Addressing Bias in Small RNA Library Preparation for Sequencing: A New Protocol Recovers MicroRNAs that Evade Capture by Current Methods. *Front Genet*. 2015 m.;6:352.
 196. Wright C, Rajpurohit A, Burke EE, Williams C, Collado-Torres L, Kimos M, ir kt. Comprehensive assessment of multiple biases in small RNA sequencing reveals significant differences in the performance of widely used methods. *BMC Genomics*. 2019 m. gruodis;20(1):513.
 197. Heinicke F, Zhong X, Zucknick M, Breidenbach J, Sundaram AYM, Flåm ST, ir kt. An extension to: Systematic assessment of

- commercially available low-input miRNA library preparation kits. *RNA Biol.* 2020 rugsejis;17(9):1284-92.
198. Yeri A, Courtright A, Danielson K, Hutchins E, Alsop E, Carlson E, ir kt. Evaluation of commercially available small RNAseq library preparation kits using low input RNA. *BMC Genomics.* 2018 m. gruodis;19(1):331.
 199. Dard-Dascot C, Naquin D, d'Aubenton-Carafa Y, Alix K, Thermes C, van Dijk E. Systematic comparison of small RNA library preparation protocols for next-generation sequencing. *BMC Genomics.* 2018 m. gruodis;19(1):118.
 200. Xu H, Yao J, Wu DC, Lambowitz AM. Improved TGIRT-seq methods for comprehensive transcriptome profiling with decreased adapter dimer formation and bias correction. *Sci Rep.* 2019 m. gruodis;9(1):7953.
 201. Barberán-Soler S, Vo JM, Hogans RE, Dallas A, Johnston BH, Kazakov SA. Decreasing miRNA sequencing bias using a single adapter and circularization approach. *Genome Biol.* 2018 m. gruodis;19(1):105.
 202. Vivancos AP, Guell M, Dohm JC, Serrano L, Himmelbauer H. Strand-specific deep sequencing of the transcriptome. *Genome Research.* 2010 m. liepos 1 d.;20(7):989–99.
 203. Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JRS, Weissman JS. Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. *Science.* 2009 m. balandžio 10 d.;324(5924):218–23.
 204. Lamm AT, Stadler MR, Zhang H, Gent JI, Fire AZ. Multimodal RNA-seq using single-strand, double-strand, and CircLigase-based capture yields a refined and extended description of the *C. elegans* transcriptome. *Genome Research.* 2011 m. vasario 1 d.;21(2):265–75.
 205. Sterling CH, Veksler-Lublinsky I, Ambros V. An efficient and sensitive method for preparing cDNA libraries from scarce biological samples. *Nucleic Acids Research.* 2015 m. sausio 9 d.;43(1):e1–e1.
 206. Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert PD. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques.* 2001 m. balandis;30(4):892–7.
 207. Schurer H. A universal method to produce in vitro transcripts with homogeneous 3' ends. *Nucleic Acids Research.* 2002 m. birželio 15 d.;30(12):56e–56.
 208. Yang Z, Vilkaitis G, Yu B, Klimašauskas S, Chen X. Approaches for Studying MicroRNA and Small Interfering RNA Methylation In Vitro and In Vivo. *Methods Enzymol.* 2007 m.;427:139–54.

209. Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M, Brenner SE. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 2004 m. birželis;14(6):1188–90.
210. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 2013 m. kovas;14(2):178–92.
211. Leonard S, Meyer S, Lacour S, Nasser W, Hommais F, Reverchon S. APERO: a genome-wide approach for identifying bacterial small RNAs from RNA-Seq data. *Nucleic Acids Research.* 2019 m. rugsėjo 5 d.;47(15):e88–e88.
212. Carver T, Thomson N, Bleasby A, Berriman M, Parkhill J. DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics.* 2009 m. sausio 1 d.;25(1):119–20.
213. Hammer O. PAST: Paleontological L statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 2001 m.;4:1-9.
214. Patro LPP, Kumar A, Kolimi N, Rathinavelan T. 3D-NuS: A Web Server for Automated Modeling and Visualization of Non-Canonical 3-Dimensional Nucleic Acid Structures. *J Mol Biol.* 2017 m. rugpjūčio 4 d.;429(16):2438–48.
215. Mazé A, Boël G, Zúñiga M, Bourand A, Loux V, Yebra MJ, ir kt. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J Bacteriol.* 2010 m. gegužė;192(10):2647–8.
216. Jacouton E, Chain F, Sokol H, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. Probiotic Strain *Lactobacillus casei* BL23 Prevents Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Front Immunol.* 2017 m.;8:1553.
217. Hill D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C, Ross RP. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Front Microbiol.* 2018 m.;9:2017.
218. van der Meulen SB, de Jong A, Kok J. Transcriptome landscape of *Lactococcus lactis* reveals many novel RNAs including a small regulatory RNA involved in carbon uptake and metabolism. *RNA Biol.* 2016 m.;13(3):353–66.
219. Schroeder JW, Sankar TS, Wang JD, Simmons LA. The roles of replication-transcription conflict in mutagenesis and evolution of genome organization. *PLOS Genetics.* 2020 m. rugpjūčio 27 d.;16(8):e1008987.
220. Kalvari I, Nawrocki EP, Ontiveros-Palacios N, Argasinska J, Lamkiewicz K, Marz M, ir kt. Rfam 14: expanded coverage of metagenomic, viral and microRNA families. *Nucleic Acids Res.* 2021 m. sausio 8 d.;49(D1):D192-200.
221. Okamoto S, Eltis LD. The biological occurrence and trafficking of cobalt. *Metallomics.* 2011 m. spalio 1 d.;3(10):963–70.

222. López-Mirabal HR, Winther JR. Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2008 m. balandžio 1 d.;1783(4):629–40.
223. Stabler SP, Marcell PD, Allen RH. Isolation and characterization of dl-methylmalonyl-coenzyme A racemase from rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1985 m. rugpjūčio 15 d.;241(1):252–64.
224. Gantt SL, Gattis SG, Fierke CA. Catalytic Activity and Inhibition of Human Histone Deacetylase 8 Is Dependent on the Identity of the Active Site Metal Ion. *Biochemistry*. 2006 m. gegužės 1 d.;45(19):6170–8.
225. Marschner A, Klein CD. Metal promiscuity and metal-dependent substrate preferences of *Trypanosoma brucei* methionine aminopeptidase 1. *Biochimie*. 2015 m. rugpjūčio 1 d.;115:35–43.
226. Iwasaki YW, Siomi MC, Siomi H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu Rev Biochem*. 2015 m. birželio 2 d.;84(1):405–33.
227. Muthmann N, Hartstock K, Rentmeister A. Chemo-enzymatic treatment of RNA to facilitate analyses. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2020 m. sausis;11(1):e1561.
228. Gibas P, Narmontė M, Staševskij Z, Gordevičius J, Klimašauskas S, Kriukienė E. Precise genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine via covalent tether-directed sequencing. *PLoS Biol*. 2020 m.;18(4):e3000684.
229. Baroin-Tourancheau A, Jaszczyszyn Y, Benigni X, Amar L. Evaluating and Correcting Inherent Bias of microRNA Expression in Illumina Sequencing Analysis. *Front Mol Biosci*. 2019 m. balandžio 24 d.;6:17.
230. Nakashima Y, Shiiyama N, Urabe T, Yamashita H, Yasuda S, Igoshi K, ir kt. Functions of small RNAs in *Lactobacillus casei*-*Pediococcus* group of lactic acid bacteria using fragment analysis. *FEMS Microbiol Lett*. 2020 m. spalio 21 d.;367(19).
231. Dar D, Sorek R. Bacterial Noncoding RNAs Excised from within Protein-Coding Transcripts. *mBio* [Prieiga per internetą]. 2018 m. rugsėjo 25 d.;9(5):e01730-18.
232. Hori T, Matsuda K, Oishi K. Probiotics: A Dietary Factor to Modulate the Gut Microbiome, Host Immune System, and Gut–Brain Interaction. *Microorganisms*. 2020 m. rugsėjis;8(9):1401.

PRIEDAI

Lentelė p1. Potencialių sRNR sąrašas ir jų pagrindinės savybės. sRNR pavadinime "s" reiškia sRNR, "LCB" - *Lactobacillus casei* BL23, skaičiai - kilobazė, kurioje yra pirmasis sRNR nukleotidas (jei daugiau nei viena sRNR prasideda toje pačioje kilobazėje, po kilobazės yra padėtas taškas ir už jo nurodytas sRNR pradžios šimtas), "+" arba "-" – kurioje grandinėje koduojama sRNR. sRNR koduojamos keliose genomo vietose yra pavadintos pagal pirmąjį geną ir turi priedašą "a".

Pavadinimas	Grupė	5'	3'	nt	Rfam	Nustatyta bibliotekose		
						C	U	N
sLCB3+	iš 3'-UTR susidarančios	2717	2817	101		-	-	+
sLCB38+	iš 3'-UTR susidarančios	37449	37524	76		-	-	+
sLCB38-	priešprasminės	37565	37485	81		+	+	+
sLCB44-	priešprasminės	43917	43809	109		+	+	-
sLCB46-	tarpgeninės	45734	45275	460		+	+	+
sLCB47-	iš 3'-UTR susidarančios	46644	46485	160		-	-	+
sLCB48-	iš 3'-UTR susidarančios	47783	47710	74		+	-	-
sLCB72+	tarpgeninės	71177	71410	234		+	+	+
sLCB72-	tarpgeninės	71471	71376	96		+	+	+
sLCB77-	tarpgeninės	76470	76145	326		+	+	+
sLCB80-	tarpgeninės	79174	78844	331		+	+	+
sLCB100-	iš 5'-UTR susidarančios	99829	99589	241	+	+	+	+
sLCB100+	tarpgeninės	99854	99987	134		+	+	+
sLCB118-	iš 3'-UTR susidarančios/ priešprasminės	117183	117063	121		+	+	-
sLCB135+	priešprasminės	134543	134615	73		+	+	+
sLCB148a+	priešprasminės	147296	147367	72		+	+	+
sLCB164-	iš 3'-UTR susidarančios/ priešprasminės	163970	163877	94		+	+	-
sLCB221+	intrageninės	220359	220573	215		+	+	-
sLCB229+	iš 3'-UTR susidarančios	228999	229123	125		+	-	-
sLCB250-	tarpgeninės	249472	249188	285		+	+	+

sLCB261a+	iš 5'-UTR susidarančios	260533	260642	110	-	+	-
sLCB266.5+	iš 3'-UTR susidarančios	265486	265672	187	+	+	+
sLCB266.9+	tarpgeninės	265883	266096	214	+	+	+
sLCB273-	intrageninės	272596	272543	54	+	+	+
sLCB277+	intrageninės	276613	276716	104	+	+	+
sLCB293+	iš 5'-UTR susidarančios	292297	292426	130	-	-	+
sLCB316-	tarpgeninės	315803	315669	135	+	+	+
sLCB317-	tarpgeninės	316107	315976	132	+	+	+
sLCB317+	tarpgeninės	316266	316432	167	+	+	+
sLCB325+	iš 3'-UTR susidarančios	324957	325090	134	-	-	+
sLCB326+	iš 5'-UTR susidarančios	325375	325552	178	+	-	-
sLCB353+	iš 3'-UTR susidarančios	352422	352698	277	+	+	+
sLCB363+	tarpgeninės	362623	362723	101	+	+	+
sLCB379+	iš 3'-UTR susidarančios	378429	378687	259	+	+	+
sLCB383-	iš 3'-UTR susidarančios/ priešsprasminės	382677	382613	65	-	-	+
sLCB387+	iš 5'-UTR susidarančios	386349	386782	434	+	+	+
sLCB391+	tarpgeninės	390526	390587	62	+	-	-
sLCB411+	iš 3'-UTR susidarančios	410188	410376	189	-	-	+
sLCB413a-	priešsprasminės	412733	412656	78	+	+	+
sLCB421+	iš 3'-UTR susidarančios/ iš 5'-UTR susidarančios	420222	420368	147	-	-	+
sLCB445.5+	tarpgeninės	444402	444534	133	+	+	+
sLCB445.7+	tarpgeninės	444695	444828	134	+	+	+
sLCB457-	iš 5'-UTR susidarančios	456091	455806	286	+	+	+
sLCB462+	iš 3'-UTR susidarančios	461549	461624	76	-	-	+
sLCB468-	tarpgeninės	467834	467726	109	+	+	+
sLCB481.2-	tarpgeninės	480164	480002	163	-	-	+
sLCB481.7-	priešsprasminės	480612	480485	128	+	+	+
sLCB488-	iš 3'-UTR susidarančios	487426	487336	91	+	+	-
sLCB493-	priešsprasminės	492221	492148	74	+	+	-

	iš 3'-UTR						
sLCB518-	susidarančios	517567	517471	97	-	-	+
	iš 3'-UTR						
sLCB527+	susidarančios	526544	526624	81	+	+	+
sLCB561+	priešprasminės	560453	560529	77	+	+	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/ iš 5'-UTR						
sLCB562-	susidarančios	561864	561685	180	+	-	-
sLCB568-	priešprasminės	567710	567652	59	+	+	+
sLCB573.2-	priešprasminės	572199	572093	107	+	+	+
sLCB573.5-	tarpgeninės	572422	572227	196	+	+	+
sLCB573.6-	priešprasminės	572551	572435	117	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB574.1+	susidarančios	573065	573191	127	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB574.4+	susidarančios	573395	573523	129	+	+	+
sLCB577.1-	tarpgeninės	576011	575911	101	+	+	+
sLCB577+	tarpgeninės	576101	576185	85	+	+	+
sLCB577.2-	tarpgeninės	576126	576048	79	+	+	+
sLCB577.3-	priešprasminės	576248	576163	86	+	+	+
sLCB581-	priešprasminės	580178	579749	430	+	+	+
sLCB588+	intrageninės	587257	587522	266	-	-	+
sLCB603-	priešprasminės	602640	602528	113	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB615-	susidarančios	614362	614273	90	+	+	+
sLCB616-	priešprasminės	615633	615407	227	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB616+	susidarančios	615845	615939	95	-	-	+
sLCB626-	priešprasminės	625601	625527	75	-	-	+
sLCB638-	priešprasminės	637318	637252	67	+	+	+
sLCB644.5+	tarpgeninės	643489	643560	72	+	+	+
sLCB644.7+	tarpgeninės	643681	643871	191	+	+	+
sLCB648+	priešprasminės	647805	647942	138	+	+	+
sLCB649-	tarpgeninės	648171	647891	281	+	+	-
sLCB652-	tarpgeninės	651587	651321	267	+	+	+
sLCB657+	tarpgeninės	656325	656573	249	+	+	+
sLCB671-	tarpgeninės	670419	670135	285	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB691-	susidarančios	690595	690422	174	+	+	+
sLCB704+	priešprasminės	703968	704054	87	+	+	-
sLCB711+	tarpgeninės	710029	710162	134	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB724+	susidarančios	723792	723899	108	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB740+	susidarančios	739267	739454	188	-	-	+
sLCB761-	tarpgeninės	760766	760622	145	+	+	+

sLCB764-	priešprasminės	763836	763742	95	+	+	+
sLCB766+	tarpgeninės	765025	765235	211	+	+	+
sLCB773+	tarpgeninės	772472	772562	91	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB813-	susidarančios	812104	811913	192	+	-	-
sLCB829-	tarpgeninės	828882	828729	154	+	+	+
sLCB843+	tarpgeninės	842247	842431	185	+	+	+
sLCB868+	priešprasminės	867888	867955	68	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB884-	susidarančios	883047	882964	84	-	-	+
	iš 3'-UTR						
sLCB886+	susidarančios	885811	885908	98	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB899+	susidarančios	898766	898980	215	+	+	+
sLCB906-	priešprasminės	905157	905028	130	+	+	-
	iš 5'-UTR						
sLCB922+	susidarančios	921406	921626	221	+	+	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/ priešprasminės	927149	927074	76	+	-	-
sLCB928-	priešprasminės	927149	927074	76	+	-	-
sLCB930+	priešprasminės	929979	930066	88	-	-	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/ iš 5'-UTR						
sLCB932-	susidarančios	931232	931145	88	+	+	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/ iš 5'-UTR						
sLCB946+	susidarančios	945699	945814	116	+	+	+
sLCB963.1+	intrageninės	962058	962182	125	+	+	+
sLCB963.7+	tarpgeninės	962677	962923	247	+	+	+
sLCB970.5+	priešprasminės	969443	969494	52	+	+	+
sLCB970.7+	priešprasminės	969611	969665	55	+	+	+
sLCB975+	priešprasminės	974638	974719	82	-	+	-
	iš 5'-UTR						
sLCB976+	susidarančios	975582	975769	188	+	-	-
sLCB979+	priešprasminės	978783	979099	317	-	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB987+	susidarančios	986399	986518	120	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB988+	susidarančios	987813	987929	117	+	-	+
	intrageninės iš 5'-UTR						
sLCB1028+	susidarančios	1027149	1027279	131	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB1044+	susidarančios	1043259	1043320	62	+	-	+
sLCB1045+	priešprasminės	1044674	1044750	77	-	-	+

sLCB1051-	priešsprasminės iš 3'-UTR susidarančios/ iš 5'-UTR	1050284	1050220	65	+	+	+
sLCB1061+	susidarančios iš 3'-UTR	1060882	1060998	117	+	+	+
sLCB1131+	susidarančios iš 3'-UTR	1130544	1130676	133	+	-	+
sLCB1160+	susidarančios	1159414	1159519	106	+	+	+
sLCB1161-	tarpgeninės iš 3'-UTR susidarančios/ priešsprasminės	1160523	1160163	361	+	+	+
sLCB1185+	priešsprasminės iš 3'-UTR	1184572	1184816	245	-	-	+
sLCB1192-	susidarančios	1191343	1191253	91	-	-	+
sLCB1226-	tarpgeninės	1225591	1225493	99	+	+	+
sLCB1258-	priešsprasminės	1257789	1257735	55	+	+	+
sLCB1264.7-	priešsprasminės	1263609	1263499	111	+	-	-
sLCB1264+	tarpgeninės	1263693	1263855	163	+	+	+
sLCB1264.9-	priešsprasminės iš 3'-UTR	1263880	1263637	244	+	+	+
sLCB1265.4+	susidarančios iš 3'-UTR susidarančios/ iš 5'-UTR	1264395	1264522	128	-	-	+
sLCB1265.7+	susidarančios	1264657	1264818	162	+	+	+
sLCB1266+	tarpgeninės	1265679	1265770	92	+	+	+
sLCB1266.7-	tarpgeninės	1265699	1265637	63	+	+	+
sLCB1266.9-	priešsprasminės	1265810	1265736	75	+	+	+
sLCB1277-	priešsprasminės iš 3'-UTR	1276410	1276330	81	+	+	-
sLCB1292-	susidarančios	1291769	1291695	75	-	-	+
sLCB1296-	tarpgeninės	1295931	1295833	99	+	-	-
sLCB1299+	tarpgeninės	1298410	1298504	95	+	+	+
sLCB1299-	tarpgeninės iš 5'-UTR	1298700	1298412	289	+	-	+
sLCB1305+	susidarančios iš 3'-UTR susidarančios/ iš 5'-UTR	1304220	1304569	350	+	+	+
sLCB1312+	susidarančios iš 3'-UTR	1311774	1311948	175	+	+	+
sLCB1313+	susidarančios	1312860	1312978	119	+	-	-
sLCB1334+	tarpgeninės	1333186	1333471	286	+	+	+
sLCB1336+	tarpgeninės	1335089	1335355	267	+	+	+
sLCB1349-	tarpgeninės	1348341	1348108	234	+	+	+

sLCB1367+	iš 3'-UTR susidarančios/ priešprasminės	1366192	1366268	77	-	-	+
sLCB1371+	iš 3'-UTR susidarančios	1370532	1370648	117	+	+	+
sLCB1376-	iš 3'-UTR susidarančios/ iš 5'-UTR susidarančios	1375514	1375347	168	+	+	+
sLCB1378-	iš 3'-UTR susidarančios	1377448	1377191	258	-	-	+
sLCB1387a-	iš 5'-UTR susidarančios	1386528	1386425	104	+	+	+
sLCB1390-	iš 3'-UTR susidarančios	1389442	1389271	172	-	-	+
sLCB1398+	iš 3'-UTR susidarančios	1397018	1397168	151	-	-	+
sLCB1401+	iš 3'-UTR susidarančios	1400344	1400559	216	+	+	+
sLCB1404-	priešprasminės	1403384	1403214	171	+	+	-
sLCB1405+	tarpgeninės	1404259	1404480	222	+	+	+
sLCB1415+	tarpgeninės	1414499	1414761	263	+	+	+
sLCB1418+	iš 3'-UTR susidarančios	1417049	1417262	214	-	-	+
sLCB1434+	iš 3'-UTR susidarančios/ iš 5'-UTR susidarančios	1433338	1433525	188	-	-	+
sLCB1455-	iš 3'-UTR susidarančios/ priešprasminės	1454945	1454686	260	+	+	+
sLCB1467+	iš 3'-UTR susidarančios	1466873	1466977	105	-	+	+
sLCB1468+	iš 5'-UTR susidarančios	1467134	1467208	75	-	-	+
sLCB1483+	iš 3'-UTR susidarančios/ priešprasminės	1482531	1482636	106	-	+	+
sLCB1485+	iš 5'-UTR susidarančios	1484412	1484577	166	+	-	-
sLCB1528+	iš 5'-UTR susidarančios	1527885	1528084	200	+	+	+
sLCB1538-	priešprasminės	1537659	1537587	73	-	-	+
sLCB1552-	iš 3'-UTR susidarančios	1551794	1551671	124	+	+	-
sLCB1553.8+	priešprasminės	1552743	1552827	85	+	+	+
sLCB1553.9+	iš 5'-UTR susidarančios	1552862	1552956	95	+	+	+

	iš 3'-UTR							
sLCB1586-	susidarančios	1585198	1584937	262	-	-	-	+
sLCB1595-	tarpgeninės	1594908	1594611	298	+	+	+	+
	iš 3'-UTR							
sLCB1622-	susidarančios	1621254	1621096	159	+	+	-	+
sLCB1627-	tarpgeninės	1626264	1626177	88		+	+	-
sLCB1631+	tarpgeninės	1630132	1630204	73		+	+	+
sLCB1642-	priešprasminės	1641637	1641222	416	+	+	+	+
sLCB1660-	intrageninės	1659111	1659033	79		+	+	-
	intrageninės/ iš 5'-UTR							
sLCB1663+	susidarančios	1662319	1662419	101		+	+	+
	iš 3'-UTR							
sLCB1674-	susidarančios	1673762	1673700	63		+	+	+
	iš 5'-UTR							
sLCB1678-	susidarančios	1677015	1676815	201		+	+	+
	iš 3'-UTR							
sLCB1679-	susidarančios	1678023	1677826	198		+	+	+
sLCB1691-	tarpgeninės	1690472	1690290	183		+	+	+
	iš 3'-UTR							
sLCB1702-	susidarančios	1701604	1701451	154		+	+	+
	iš 5'-UTR							
sLCB1706-	susidarančios	1705851	1705801	51		-	-	+
sLCB1710+	priešprasminės	1709946	1710051	106		-	+	-
	iš 5'-UTR							
sLCB1713-	susidarančios	1712170	1712088	83		+	+	+
	iš 3'-UTR							
	susidarančios/ priešprasminės							
sLCB1718-	priešprasminės	1717251	1716977	275		-	-	+
sLCB1735-	tarpgeninės	1734351	1734303	49		-	-	+
sLCB1743+	priešprasminės	1742023	1742097	75		+	+	-
sLCB1794-	priešprasminės	1793928	1793836	93		+	-	-
sLCB1806-	tarpgeninės	1805754	1805542	213		+	+	+
sLCB1819-	tarpgeninės	1818506	1818431	76		+	+	+
sLCB1835-	tarpgeninės	1834137	1833891	247		+	+	+
	iš 5'-UTR							
sLCB1856-	susidarančios	1855113	1855005	109		+	+	+
	iš 3'-UTR							
sLCB1860-	susidarančios	1859315	1859095	221		+	+	+
	iš 5'-UTR							
sLCB1872-	susidarančios	1871408	1871186	223		+	-	-
	iš 5'-UTR							
sLCB1875-	susidarančios	1874793	1874657	137		+	-	-
	iš 5'-UTR							
sLCB1915-	susidarančios	1914489	1914332	158	+	+	+	+
sLCB1919+	priešprasminės	1918634	1918735	102		+	+	+

	iš 3'-UTR susidarančios/ priešsprasminės	1932945	1932803	143	-	-	+
sLCB1933-	priešsprasminės	1933586	1933731	146	-	-	+
sLCB1934+	priešsprasminės	1953544	1953356	189	+	+	+
sLCB1954-	tarpgeninės						
	iš 5'-UTR susidarančios	1957004	1956884	121	+	+	+
sLCB1958-	susidarančios						
	iš 3'-UTR susidarančios	1967504	1967446	59	-	-	+
sLCB1968-	susidarančios						
	iš 3'-UTR susidarančios	1970419	1970297	123	-	+	-
sLCB1971-	susidarančios						
	iš 5'-UTR susidarančios	1982612	1982559	54	+	-	-
sLCB1983-	susidarančios						
	iš 5'-UTR susidarančios	1993415	1993201	215	+	+	+
sLCB1994-	susidarančios						
sLCB1999-	tarpgeninės	1998846	1998602	245	+	+	+
	iš 3'-UTR susidarančios/ iš 5'-UTR susidarančios	2011307	2011249	59	+	+	+
sLCB2012-	susidarančios						
	iš 3'-UTR susidarančios/ priešsprasminės	2032530	2032363	168	+	+	-
sLCB2033-	priešsprasminės						
sLCB2037+	priešsprasminės	2036066	2036164	99	+	+	+
	iš 5'-UTR susidarančios	2042544	2042349	196	-	+	+
sLCB2043-	susidarančios						
sLCB2048-	tarpgeninės	2047831	2047640	192	+	+	+
	iš 3'-UTR susidarančios	2049047	2048801	247	-	-	+
sLCB2050-	susidarančios						
sLCB2059-	priešsprasminės	2058535	2058271	265	+	+	+
sLCB2060-	priešsprasminės	2059777	2059663	115	+	+	+
sLCB2064+	priešsprasminės	2063816	2063887	72	-	+	-
	iš 3'-UTR susidarančios/ iš 5'-UTR susidarančios	2066856	2066949	94	-	-	+
sLCB2067+	susidarančios						
	iš 3'-UTR susidarančios/ priešsprasminės	2082202	2082285	84	+	+	+
sLCB2083+	priešsprasminės						
sLCB2084-	tarpgeninės	2083961	2083837	125	+	+	+
	iš 3'-UTR susidarančios	2094284	2094091	194	+	-	+
sLCB2095-	susidarančios						
	iš 5'-UTR susidarančios	2096955	2097032	78	+	+	+
sLCB2097+	susidarančios						
	iš 3'-UTR susidarančios	2104504	2104327	178	+	+	+
sLCB2105-	susidarančios						
sLCB2126-	tarpgeninės	2125992	2125779	214	+	+	+
sLCB2142-	tarpgeninės	2141190	2141091	100	-	-	+

sLCB2150-	tarpgeninės	2149669	2149576	94	+	+	+
sLCB2157+	priešsprasminės	2156652	2156891	240	+	+	+
sLCB2189-	tarpgeninės	2188680	2188278	403	-	+	-
	iš 3'-UTR						
sLCB2213-	susidarančios	2212784	2212497	288	-	-	+
sLCB2227+	intrageninės	2226986	2227099	114	+	+	+
sLCB2236-	tarpgeninės	2235667	2235532	136	+	+	+
sLCB2253+	tarpgeninės	2252764	2252861	98	+	+	-
sLCB2253-	priešsprasminės	2252934	2252663	272	+	+	+
sLCB2279-	intrageninės	2278043	2277804	240	+	+	+
sLCB2288-	tarpgeninės	2287654	2287444	211	+	+	+
sLCB2292-	tarpgeninės	2291943	2291842	102	-	-	+
sLCB2294+	tarpgeninės	2293061	2293271	211	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB2317-	susidarančios	2316796	2316494	303	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB2321-	susidarančios	2320403	2320301	103	+	+	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/ priešsprasminės	2348211	2348091	121	+	+	-
sLCB2349.3-	priešsprasminės	2348211	2348091	121	+	+	-
sLCB2349.7-	intrageninės	2348652	2348574	79	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB2356-	susidarančios	2355690	2355578	113	-	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB2383+	susidarančios	2382473	2382679	207	-	-	+
sLCB2390+	tarpgeninės	2389856	2389931	76	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB2400-	susidarančios	2399246	2399173	74	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB2414-	susidarančios	2413762	2413652	111	+	+	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/ iš 5'-UTR						
sLCB2434-	susidarančios	2433526	2433453	74	-	-	+
sLCB2442+	tarpgeninės	2441292	2441341	50	+	+	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/ priešsprasminės	2444668	2444799	132	-	-	+
	iš 5'-UTR						
sLCB2451-	susidarančios	2450784	2450479	306	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB2499-	susidarančios	2498609	2498427	183	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB2502-	susidarančios	2501112	2500971	142	+	-	-
sLCB2515+	intrageninės	2514221	2514277	57	-	+	-
	iš 3'-UTR						
sLCB2533-	susidarančios	2532804	2532589	216	+	+	+

	iš 5'-UTR						
sLCB2543+	susidarančios	2542026	2542083	58	-	-	+
sLCB2543-	priešprasminės	2542212	2542107	106	+	+	-
sLCB2545+	tarpgeninės	2544843	2544923	81	+	+	+
sLCB2547-	intrageninės	2546714	2546549	166	+	+	+
sLCB2571-	tarpgeninės	2570801	2570724	78	+	+	+
sLCB2572+	priešprasminės	2571115	2571209	95	+	+	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/ iš 5'-UTR						
sLCB2574+	susidarančios	2573209	2573276	68	-	-	+
sLCB2601+	priešprasminės	2600014	2600192	179	+	+	-
sLCB2636-	tarpgeninės	2635362	2635251	112	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB2667-	susidarančios	2666012	2665871	142	+	+	+
sLCB2671-	priešprasminės	2670909	2670685	225	+	+	-
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/ priešprasminės						
sLCB2675-	priešprasminės	2674799	2674682	118	-	-	+
	iš 5'-UTR						
sLCB2689-	susidarančios	2688227	2688152	76	+	+	-
sLCB2691-	priešprasminės	2690434	2690194	241	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB2695-	susidarančios	2694392	2694323	70	+	+	+
sLCB2706+	priešprasminės	2705829	2705885	57	+	+	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/ priešprasminės						
sLCB2710+	priešprasminės	2709489	2709584	96	-	-	+
	iš 5'-UTR						
sLCB2715-	susidarančios	2714847	2714794	54	-	+	-
sLCB2747-	tarpgeninės	2746183	2745976	208	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB2749-	susidarančios	2748560	2748501	60	+	+	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/ priešprasminės						
sLCB2764+	priešprasminės	2763194	2763403	210	-	-	+
sLCB2773+	priešprasminės	2772058	2772195	138	+	+	+
sLCB2775-	priešprasminės	2774661	2774556	106	+	+	+
sLCB2779+	tarpgeninės	2778208	2778343	136	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB2779-	susidarančios	2778434	2778378	57	-	+	+
sLCB2784+	tarpgeninės	2783989	2784076	88	+	+	+
sLCB2785+	priešprasminės	2784137	2784260	124	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB2790+	susidarančios	2789603	2789687	85	+	+	+
sLCB2808+	tarpgeninės	2807494	2807637	144	+	+	+
sLCB2809.7+	tarpgeninės	2808687	2808842	156	+	+	+

sLCB2809.10+	tarpgeninės	2808944	2809066	123	+	+	+
sLCB2810+	priešprasminės	2809149	2809274	126	+	+	+
sLCB2826+	priešprasminės	2825802	2825874	73	-	-	+
	iš 3'-UTR						
sLCB2837-	susidarančios	2836897	2836776	122	-	-	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/						
sLCB2850-	priešprasminės	2849821	2849755	67	+	+	+
sLCB2852.4+	tarpgeninės	2851385	2851509	125	+	+	+
sLCB2852.6+	priešprasminės	2851570	2851693	124	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB2854-	susidarančios	2853587	2853440	148	+	+	+
sLCB2862+	priešprasminės	2861601	2861906	306	-	-	+
sLCB2877+	priešprasminės	2876667	2876752	86	+	+	+
sLCB2897.6-	tarpgeninės	2896572	2896472	101	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB2897.8-	susidarančios	2896717	2896586	132	+	-	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/						
sLCB2911-	susidarančios	2910578	2910333	246	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB2917+	susidarančios	2916124	2916263	140	-	+	-
sLCB2938+	tarpgeninės	2937601	2937668	68	+	+	+
sLCB2938-	tarpgeninės	2937844	2937626	219	+	+	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/						
	iš 5'-UTR						
sLCB2940-	susidarančios	2939008	2938918	91	+	+	+
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/						
	iš 5'-UTR						
sLCB2941-	susidarančios	2940669	2940481	189	+	+	+
sLCB2947-	intrageninės	2946708	2946585	124	+	+	+
	iš 5'-UTR						
sLCB2948+	susidarančios	2947561	2947648	88	-	+	+
sLCB2951+	tarpgeninės	2950709	2950778	70	+	+	+
sLCB2956-	tarpgeninės	2955300	2954987	314	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB2960-	susidarančios	2959281	2959133	149	-	-	+
sLCB2995-	priešprasminės	2994555	2994458	98	+	+	-
	iš 3'-UTR						
	susidarančios/						
sLCB3031-	priešprasminės	3030478	3030292	187	-	-	+
sLCB3035-	priešprasminės	3034551	3034491	61	+	+	+
	iš 3'-UTR						
sLCB3045+	susidarančios	3044292	3044533	242	+	+	+
sLCB3046+	tarpgeninės	3045664	3045731	68	+	+	-

sLCB3062+	iš 3'-UTR susidarančios	3061068	3061142	75	-	-	+
sLCB3076-	iš 3'-UTR susidarančios	3075838	3075754	85	+	+	+

SUMMARY OF DOCTORAL DISERTATION

LIST OF ABBREVIATIONS

- AdoMet – S-adenosyl-L-methionine
cDNA – copy DNA
dPAG – denaturing polyacrylamide gel
FRET – Förster Resonance Energy Transfer
LAB – Lactic Acid Bacteria
LCG – *Lactobacillus casei* group
mDOT-seq – methyltransferase-Directed Orthogonal Tagging and RNA sequencing
miRNA – microRNA
mTAG – methyltransferase-directed Transfer of Activated Groups
MTase – methyltransferase
piRNA – PIWI-interacting RNA
qPCR – quantitative PCR
siRNA – small interfering RNA
sRNA – small regulatory RNA
ssRNA – single-stranded RNA

INTRODUCTION

About 170 distinct modifications have been identified in RNA, that ensure the formation of a functional tertiary structure, stabilize and direct RNA to the particular cellular compartments (1). 2'-O-methylation is one of the most common RNA modifications, which is found in all life domains in rRNAs, tRNAs, mRNAs, small nuclear and nucleolar RNAs, as well as small non-coding RNAs. In general, RNA methylation is catalyzed by *S*-adenosyl-L-methionine (AdoMet)-dependent RNA methyltransferases (2). Hen1 methyltransferases are one class of such proteins as it transfers methyl group from AdoMet onto a 2'-O-ribose of a 3'-terminal nucleotide (3). Hen1 enzymes modify different RNA substrates and, based on the arrangement of their domains, are grouped into four subfamilies: (i) animal Hen1 proteins with a N-terminal methyltransferase (MTase) domain and a variable-length C-terminal region, (ii) multidomain Hen1 enzymes from plants with a C-terminal MTase domain, (iii) bacterial Hen1 methyltransferases containing a N-terminal ligase-activating and a C-terminal MTase domains and (iv) bacterial Hen1 proteins composed only of MTase domain (4–8). Animal Hen1 methyltransferases modify 23-30 nt long single-stranded PIWI-interacting RNAs (piRNAs) – a type of non-coding RNAs that associate with PIWI proteins and regulated the amount of active transposons – as well as small interfering RNAs (siRNAs), that mediate the silencing of endogenous and exogenous RNAs (5–7). It is demonstrated that methylation blocks the uridylation and degradation of these RNAs, and that the deficiency of Hen1 methyltransferase results in brain damage in fruit flies, male sterility in mice or impaired oocyte development in zebrafish (9–11). However, the enzymatic properties of these crucial animal proteins have not yet been studied in detail. In addition, there is a lack of information on the effect of the less conserved C-terminal region on the activity of animal Hen1 methyltransferases (5–7).

Methyltransferases that use the synthetic AdoMet analogues, that is transfer not only methyl, but also larger side chains, are applicable to covalent chemoenzymatic RNA labelling (12). RNA labelling is important for scientific and practical medical research as it enables the visualization, enrichment, characterization and even quantification of specific RNA molecules (13). Compared to non-covalent methods, such as hybridization to complementary oligonucleotides, covalent chemoenzymatic RNA labelling stands out for its stability, biocompatibility, selectivity and efficiency, properties that allow RNA modification not only *in vitro* but also in cells (14). Chemoenzymatic RNA labelling can be accomplished in one or two steps. In

the first case, a reporter molecule is attached directly to the RNA, in the second one, a functional group is first transferred to the RNA, to which the selected reporter is appended in the next step, often during the *click* reaction (15). Currently, three groups of RNA methyltransferases have been applied for RNA labelling: enzymes that modify the mRNA in the cap structure, within the RNA sequence, and at the 3'-end of the double-stranded RNA. The activity of these proteins depends on the specific modification of the RNA, the context of the sequence, the particular secondary structure or additional targeting oligonucleotides and their complementary to the modifiable RNA (16–21). However, so far no RNA methyltransferase has been adapted for additional factor-independent labelling of the 3'-end of the most abundant RNA group – the single-stranded RNAs (ssRNAs). It is for this purpose that animal Hen1 methyltransferases could be applied and methods for RNA visualization and enrichment could be developed.

In addition, chemoenzymatic labelling of the 3'-end of ssRNA based on the catalytic activity of animal Hen1 methyltransferase could potentially be adapted for sequencing of small RNAs. Currently the preparation a small RNA copy DNA (cDNA) library depends on the activity of truncated form of T4 RNA ligase 2, bearing a K227Q point mutation. T4 trRn12 K227Q catalyses the addition of the 3'-adapter to the 3'-end of RNA (22). Detailed studies of this particular reaction have shown that it depends on the sequence, secondary intra- and inter-molecular structure of both RNA and the 3'-adapter. The listed biases of T4 trRn12 K227Q impedes the even inclusion of RNAs of different sequence and structure to the cDNA library so that the number of reads obtained after the sequencing does not reflect the true level of RNA expression (23–29). RNA sequence and structure-independent addition of a 3'-adapter in part catalysed by the animal Hen1 methyltransferase could be one of the solutions ensuring more uniform inclusion of different RNAs in the cDNA library.

In pursuance to fill the existant knowledge gap related to animal Hen1 methyltransferases and their applicability THE AIM OF THIS STUDY was formulated in the following way – to characterize the enzymatic reactions catalysed by *Drosophila melanogaster* DmHen1 and *Homo sapiens* HsHen1 methyltransferases, and to apply the animal Hen1 protein for single-stranded RNA labelling with reporter groups and their sequencing.

THE MAIN TASKS OF THE STUDY:

1. To investigate the substrate and cofactor specificity of DmHen1 and HsHen1 methyltransferases and to determine the dependence of their reaction on bivalent metal ions.
2. To adapt DmHen1 methyltransferase for RNA visualization and enrichment using one-step and two-step RNA labelling reactions.
3. To determine the influence of C-terminal region of DmHen1 on the protein-catalysed reaction and to evaluate the possibility of RNA labelling using DmHen1 methyltransferase without the corresponding sequence, DmHen1 Δ C.
4. To develop the DmHen1 Δ C-based method for the preparation of a cDNA library for single-stranded RNA sequencing and to apply it for the study of small regulatory RNAs.

SCIENTIFIC NOVELTY OF THE STUDY

Current work presents the first detailed characterization of the enzymatic reactions catalysed by animal Hen1 methyltransferases: (i) it was found that the enzymatic activity of *Drosophila melanogaster* DmHen1 and *Homo sapiens* HsHen1 methyltransferases depends on Co^{2+} and Co^{3+} ions; (ii) it was shown that the rate and efficiency of the reaction performed by DmHen1 only slightly depends on the particular modifiable nucleotide, while in the case of HsHen1 the preference of modification of different 3'-terminal nucleotides falls into the following sequence $\text{A} \approx \text{C} > \text{U} > \text{G}$; (iii) *in vitro* analysed proteins were found to modify not only natural 22-28 nt but also longer RNA substrates; (iv) it was discovered that compared to methyl group, both HsHen1 and DmHen1 can carry larger side chains with reporter or functional groups from synthetic cofactor analogues onto modifiable RNA substrates, thus, they can be applied for one-step and two-step RNA labelling; (v) it was shown that C-terminal region of DmHen1 is unnecessary or even inhibits the enzymatic activity of the protein, implying that the enzyme without its C-terminal sequence, DmHen1 Δ C, that does not discriminate RNA substrates based on the identity of their 3'-terminal nucleotide, can be adapted for the uniform labelling of a wide spectrum of RNA molecules.

In the performed study, for the first time DmHen1 and DmHen1 Δ C were applied for the one-step and two-step labelling of the 3' end of ssRNAs. Fluorophore-modified RNAs were visualized by detecting their fluorescence or Förster Resonance Energy Transfer (FRET) signal. Biotinylated RNAs were purified from the reaction mixture by biotin-streptavidin interaction.

Oligonucleotides were attached to the RNA appended with azide group for the synthesis of copy DNA. Based on the latter reaction, mDOT-seq (methyltransferase-Directed Orthogonal Tagging and RNA sequencing) method was developed for the cDNA library preparation for ssRNA sequencing. It was shown that mDOT-seq can be applied for the identification of small eukaryotic RNAs, for example 21-24 nt long microRNAs (miRNAs). Additionally, mDOT-seq was adapted for the first characterization of the 50–500 nt small regulatory RNAs (sRNAs) from probiotic bacteria *Lactobacillus casei* BL23.

STATEMENTS TO BE DEFENDED

1. *In vitro*, *Drosophila melanogaster* DmHen1 and *Homo sapiens* HsHen1 methyltransferases modify single-stranded 22-80 nt long RNA substrates with methyl and larger transferable groups in the reactions catalyzed by Co^{2+} and Co^{3+} ions.
2. DmHen1 methyltransferase can be used to label single-stranded RNA with fluorophores and biotin, which in turn can be applied for RNA visualization and enrichment.
3. DmHen1 methyltransferase without the C-terminal region, DmHen1 Δ C, demonstrates the higher efficiency of modification of different RNA substrates and can be applied for the detection of RNA by FRET or for the coupling of a synthetic oligonucleotide to the modified RNA.
4. The mDOT-seq (methyltransferase-Directed Orthogonal Tagging and RNA sequencing) method for cDNA library preparation, that exploits the ability of DmHen1 Δ C to modify single-stranded RNAs of any sequence, was created.
5. mDOT-seq can be adapted for sequencing of eukaryotic microRNAs, miRNAs, and bacterial 50-500 nt small regulatory RNAs, sRNAs.

MATERIALS AND METHODS

Analyses of the enzymatic activity of Hen1 methyltransferases

0.02-0.2 μM ^{32}P -RNA was modified in the Modification reaction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 5% glycerol, 10 mM CoCl_2 , 0.2 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 0.04 μl /RiboLock RNase inhibitor (*Thermo Fisher Scientific*)), containing 1-2 μM of Hen1 methyltransferases, 0.1 mM AdoMet 1/Ado-6-amine 2/Ado-6-azide 3 or 0.05 mM Ado-13-biotin 4 for 30 min at 37°C. Where indicated, CoCl_2 was replaced with the corresponding chloride salts ($[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ was used for Co^{3+}) except for nickel sulfate. In cases where 3-6 μM of Ado-14-Cy3 5 was used, RNA was modified in the Cy3 reaction buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) 0.2 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 10 mM CoCl_2 , 50 μM tryptophan) for 1 h. Modification reactions were stopped by the addition of an equal volume of 2 mg/ml proteinase K (*Thermo Fisher Scientific*)-containing Quenching buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% SDS) and 20 min incubation at 55°C.

After the reactions with AdoMet 1, Ado-6-amine 2 and Ado-6-azide 3, the proportion of modified RNA was determined by IO_4^- oxidation/ β -elimination (30) and analysed on 10-13% dPAG. Dried gels were exposed to radiation-sensitive screens, which were later scanned with a Fujifilm FLA-5100 scanner using a 635 nm laser and an IP filter.

RNA modification reactions under the single-turnover conditions were performed with 0.2 μM ^{32}P -RNA, 2 μM Hen1 methyltransferases, 0.1 mM AdoMet 1/Ado-6-amine 2/Ado-6-azide 3 or 0.05 mM Ado-13-biotin 4 for 0-60 min. at 37 ° C. The rate constants of the modification reactions, k_{chem} , were determined by the single-exponential equation from at least two replicates.

The preference of DmHen1 for AdoMet 1 or Ado-6-azide 3 was evaluated in the reaction containing 0.2 μM ^{32}P -siR23, 2 μM DmHen1 and 0.1 mM of a cofactor mixture, composed of AdoMet 1 and Ado-6-azide 3, the proportion of which was changed from 0 to 100% in a 10 μM steps.

Application of Hen1 methyltransferases for RNA labelling

Two-step RNA labelling

0.2 μM of RNA were incubated with 1 μM DmHen1, 0.1 mM Ado-6-amine 2/Ado-6-azide 3 or AdoMet 1 (control reaction) for 30 min at 37°C. 4 μM of amine-modified RNA was mixed with Cy5-649/670-NHS-ester in 60 mM Borate buffer (pH 8.6) and incubated for 1 h at room temperature. 4 μM of azide-modified RNA was added to 0.5 mg/ml Cy5.5-673/707-alkyne and

incubated for 1 h at 40°C with 60% DMSO and 3.3 mM CuBr-TBTA. Modified RNA was analysed on 10% dPAG. The fluorescence of Cy5 and Cy5.5 was detected using a 635 or 670 nm laser and a LPR or LPFR filter, accordingly. The bulk RNA was visualized after the staining with ethidium bromide with a 473 nm laser and a LPB filter.

One-step RNA labelling

RNA labelling with biotin and affinity purification

0.05 mM Ado-13-biotin 4 (0.1 mM AdoMet in control samples) was used to label 0.01 μM ^{32}P -RNA in the presence of 1 μM DmHen1. After 30 min of incubation at 37°C, 5 μl of 0.2 μM biotinylated RNA was mixed with 0.1 mg Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (*Thermo Fisher Scientific*) magnetic beads resuspended in 10 μl of 2 \times B&W Buffer and blocked with 5 μl 0.4 mg/ml yeast tRNA. After 15 min of incubation at room temperature, 23 and 43 nt RNA-bound beads were washed according to the manufacturer's recommendations, while 60 and 80 nt RNA-bound ones were washed twice with 1 \times B&W Buffer, once with 4 \times SSC-50% formamide, pH 7.0 and once with 2 \times SSC-formamide. Biotinylated RNAs were eluted from and analysed on a 10–13% dPAG.

RNA analysis by the Förster resonance energy transfer (FRET)

1 μM DmHen1 ΔC was used to label 1 μM of siR23 or let-7a2 with 10.3 μM Ado-14-Cy3 5 or AdoMet 1 (control reaction) in a reaction with 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of total RNA from the HCT116 human colon cancer cell line for 1 h at 37°C. 0.2 μM of modified RNA was annealed to 0.2 μM of siR23 complementary DNA containing Cy5 modification at the fifth position (unmodified DNA in a control reaction). Fluorescence of RNA in solution was evaluated with a FluoroMax-3 (*Horiba*) spectrofluorometer with excitation set at 500 or 590 nm and the registration of the emission from 520 or 610 to 800 nm.

Application of DmHen1 ΔC for RNA sequencing

Modification of N21 RNA, CuAAC reaction and reverse transcription

0.2-10 μM of ^{32}P -N21 RNA was modified in the presence of 0.1-0.2 mM Ado-6-azide and 2 μM DmHen1 ΔC for 30-60 min at 37°C.

The CuAAC reaction was performed in a 55% DMSO in the presence of 0.025-0.2 μM ^{32}P -RNA-azide, 1.25-10 μM 3'-alkyne-adapter/RT primer and 3.3 mM CuBr-TBTA for 30 min at 45°C. For reverse transcription 20 μM of RNA-azide was incubated with 5 μM of 3'-alkyne-adapter/ ^{32}P -RT primer for 45 min.

cDNA was synthesized in a reaction mixture containing 10 nM RNA-3'-adapter/³²P-RT primer, 0.25 mM dNTP and 10 u/μl RevertAid reverse transcriptase (*Thermo Fisher Scientific*) for 2 h at 38°C.

Preparation of the miRXplore cDNA library

0.2 μM of miRXplore RNA was modified in the presence of 2 μM DmHen1ΔC and 0.1 mM Ado-6-azide for 30 min at 37°C. The CuAAC reaction was performed using 0.4 μM of RNA-azide and 10 μM 3'-alkyne-adapter/RT primer. 0.35 pmol of resulting RNA-3'-adapter/RT primer was used to prepare a cDNA library with NEXTFLEX Small RNA-seq Kit v3 (*PerkinElmer*), starting from Step B and applying the following modifications: adding 1/4 of NEXTFLEX 5'-4N adapter at Step D, performing 18 PCR cycles at Step G and both Step H1 and H2.

The size of the prepared cDNA library was estimated by capillary electrophoresis using Agilent High Sensitivity DNA kit (*Agilent technologies*) and the concentration was measured by a quantitative PCR (qPCR) with KAPA Library Quantification Kits - Complete Kit (universal) (*Roche*).

Pooled miRXplore cDNA libraries were sequenced at Lexogen facilities using the NextSeq 500/550 High Output Kit (*Illumina*) to obtain 1 × 75 nt single-end reads and the obtained data was analysed by K. Kvederavičiūtė.

Preparation of cDNA library of *Lactobacillus casei* BL23 sRNA

Extraction of total RNA

Total RNA from *L. casei* BL23 cells collected at six different growth points was extracted using RNazol RT (*Molecular Research Center, Inc.*) and its quality was evaluated with the Agilent RNA 600 Nano Kit (*Agilent Technologies*).

RNA preparation

Total RNA was treated with RNase-free DNase I (*Thermo Fisher Scientific*) and rRNAs were depleted using the Ribominus Transcriptome Isolation Kit, bacteria (*Thermo Fisher Scientific*) supplemented with custom designed probes. 50-500 nt long RNAs were purified from 8% dPAG and 5'-PPP-RNA was hydrolysed to 5'-P-RNA using RppH (*New England Biolabs*).

Preparation of cDNA libraries

For mDOT-seq, 0.2-0.3 μM of RNA was modified with an azide group and 0.2 μM RNA-azide was used for the CuAAC reaction. 2 pmol of RNA-3'-adapter was further processed according to the NEXTFLEX Small RNA-seq

Kit v3 (*Perkin Elmer*) starting from step B and applying the following modifications: adding $\frac{1}{4}$ of NEXTFLEX 5'-4N adapter in Step D, incubating for 60 min. at 42°C in Step E, performing 15 PCR cycles in Step G, and carrying out Steps F and H1 as described in the alternative protocol for Preparing Libraries without Size Selection.

N libraries were prepared using 2 pmol of RppH-treated RNA according to the NEXTFLEX Small RNA-seq Kit v3 (*Perkin Elmer*), with Steps E, F, and H1 modified in the same way as for mDOT-seq library preparation, except for 12 PCR cycles in Step G.

The concentration and quality of libraries prepared by both methods were assessed as described earlier. The pooled libraries were sequenced at Lexogen facilities using the NextSeq 500/550 Mid Output Kit (*Illumina*) to obtain 2×75 nt reads. Sequencing data analysis was performed by K. Kvederavičiūtė and the predicted sRNAs were crosschecked manually. Potential sRNAs were confirmed by R. Mineikaitė by *Northern* hybridization.

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of the enzymatic activity of Hen1 methyltransferases

At the beginning of this work almost no data was available on the enzymatic properties of animal Hen1 methyltransferases. To fill the existing knowledge gap, we started this study with the analysis of *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* proteins DmHen1 and HsHen1, respectively.

Bivalent metal ions and modifiable RNAs

Previously characterized Hen1 methyltransferases show different metal ion specificities (4,31) and varying preferences for the 3'-terminal nucleotides (6,32,33). The performed metal-screening experiments revealed that *in vitro* the enzymatic activity of DmHen1 and HsHen1 is uniquely dependent on Co^{2+} and Co^{3+} ions (Fig. 1 A).

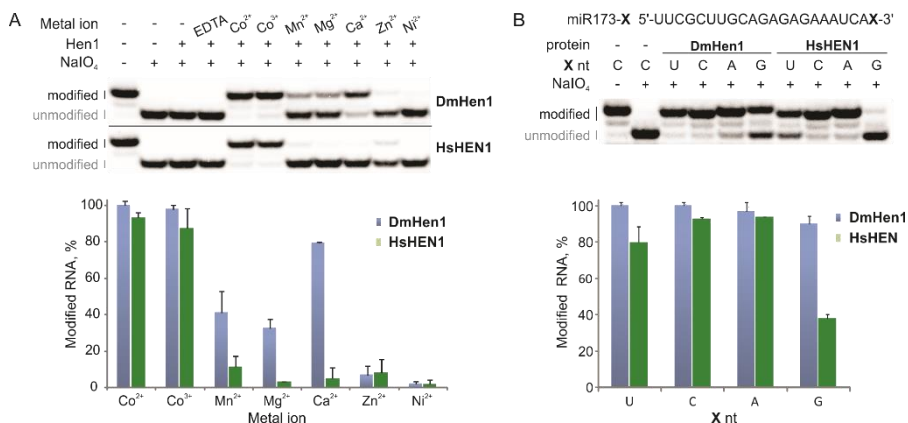


Fig. 1. Factors influencing the efficiency of DmHen1 and HsHen1 catalyzed ssRNA methylation. A. Co^{2+} and Co^{3+} ions ensure the efficient methylation of ssRNA. 0.2 μM of 22 nt ^{32}P -miR173 was modified in the reaction mixture containing 100 μM AdoMet 1, 10 mM of the indicated metal ion and 1 μM Hen1 methyltransferases. The proportion of modified RNA was determined by an IO_4^- oxidation/ β -elimination reaction (30) and evaluated on a 13% dPAG. B. Methylation of miR173 with different 3'-terminal nucleotides. Modification reactions were performed as described earlier with the exception that 2 μM of DmHen1 or HsHen1 was used.

Additionally, RNA methylation analysis of miR173 RNA bearing different 3'-terminal nucleotides showed that with Co^{2+} as a metal cofactor, the methylation efficiency of DmHen1 as well as the modification rate constant, k_{chem} , under the single-turnover conditions only slightly depends on the identity of the 3'-terminal nucleotide. All nucleotides were modified by DmHen1 with higher than 90% efficiency and k_{chem} varying from 0.80 ± 0.02

to $0.28 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$. Meanwhile, HsHen1 had a more pronounced modification bias with a variation in modification efficiency from 80 to 38% and k_{chem} of miR173-G modification reaching only $0.08 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ (Fig. 1 B, Table 1).

Table 1. Methylation rate constants, k_{chem} , of different 3'-terminal nucleotides. Reactions were performed as described in Figure 1 B.

3'-nt	DmHen1	HsHen1
	k_{chem} , (min^{-1})	k_{chem} , (min^{-1})
U	0.80 ± 0.02	0.16 ± 0.01
C	0.61 ± 0.04	0.33 ± 0.03
A	0.46 ± 0.02	0.68 ± 0.06
G	0.28 ± 0.02	0.08 ± 0.01

In cells, animal Hen1 methyltransferases modify RNA substrates of 23–30 nt in length (5–7). RNA methylation experiments performed with 23–80 nt long RNAs containing the identical sequence at the 3'-end, revealed that the efficiency of DmHen1 and HsHen1 reaction had no significant dependence on the length of the RNA substrate and reached 94–98% and 83–92%, respectively (Fig. 2).

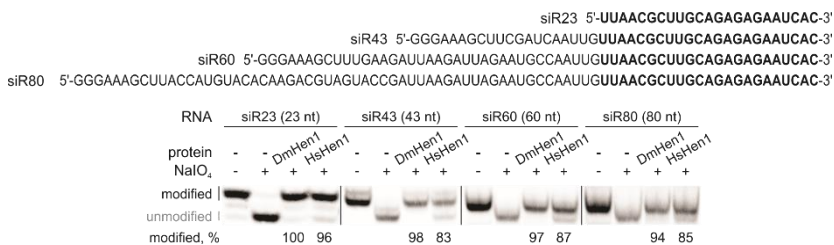


Fig. 2. Methylation of RNA substrates of different length. Reactions were performed as described in Fig. A1.

Synthetic AdoMet analogues

To test the applicability of Hen1 for the methyltransferase-directed Transfer of Activated Groups – mTAG reactions – we selected two synthetic AdoMet 1 analogues – Ado-6-amine 2 and Ado-6-azide 3, with primary amine and azide groups, respectively, in the transferable side chain (Fig. 3 A). After performing modification experiments, we found that both enzymes transferred the side chains with greater than 87% efficiency (Fig. 3 B). To our surprise, DmHen1 completely modified the RNA substrate. As HsHen1 displayed lower RNA modification efficiency, it was not considered for further mTAG applications.

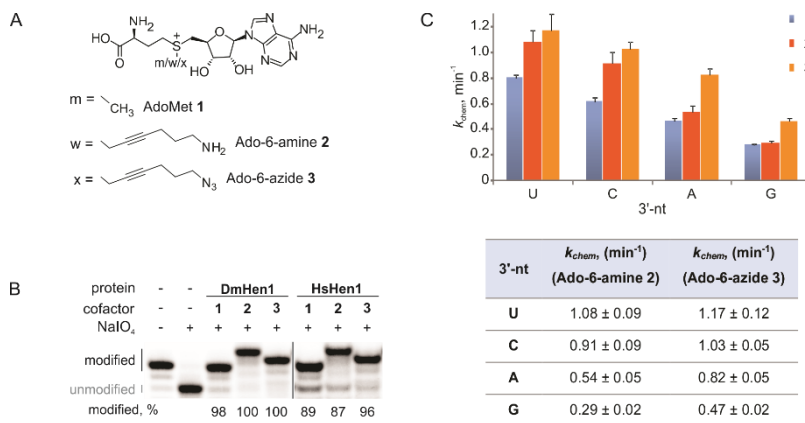


Fig. 3. Transfer of activated groups from synthetic AdoMet 1 analogues onto ssRNAs by animal Hen1 methyltransferases. **A.** Structure of AdoMet 1 and its synthetic analogues. **B.** DmHen1 and HsHen1 methyltransferase-catalyzed modification of miR173 with methyl and longer transferrable groups. **C.** Alkylation rate constants (k_{chem}) of miR173 measured under single-turnover conditions. Reactions were performed as described in Fig. 1 B.

To determine whether the synthetic AdoMet 1 analogues can alter the substrate specificity of DmHen1, we compared the rates of modification of RNA substrates with different terminal nucleotides with methyl and larger transferrable groups. Unexpectedly, the k_{chem} values identified under single-turnover conditions were similar or even slightly higher compared to the ones determined for RNA methylation of all four 3'-terminal nucleotides (Fig. 3 C, Table 1).

The ability of DmHen1 to alkylate substrates of different length was evaluated using a set of RNA molecules varying not only in length but also in sequence (Fig. 4).

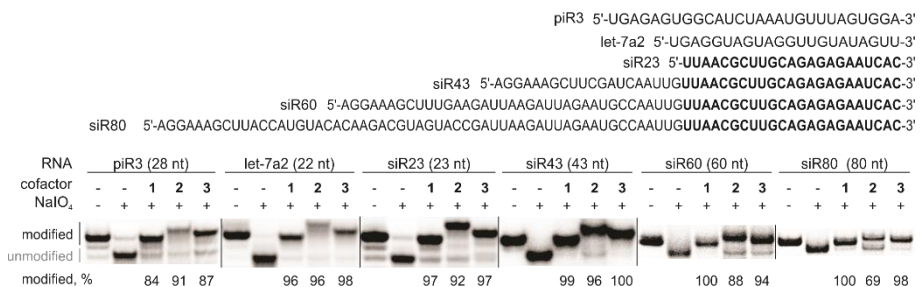


Fig. 4. DmHen1 catalyses the alkylation of RNAs of various sequence and length. Reactions were performed as described in Fig. 1 B.

In the presence of Ado-6-amine 2, different RNA substrates were modified with greater than 69% efficiency, while modification with Ado-6-azide 3

reached 87-100%, regardless of the length of the RNA modified (Fig. 4). In addition, the alkylation rate constants of siR23 and siR43 under single-turnover conditions showed no dependence on the length of the modified substrate or the size of the group transferred (Table 2).

Table 2. Alkylation rate constants, k_{chem} , measured under single-turnover conditions. Reactions were performed as described in Fig. 1 B.

<i>Cofactor</i>	$k_{chem} (min^{-1})$ (siR23, 23 nt)	$k_{chem} (min^{-1})$ (siR43, 43 nt)
<i>AdoMet 1</i>	0.78 ± 0.04	0.85 ± 0.05
<i>Ado-6-azide 3</i>	0.99 ± 0.05	0.66 ± 0.12

What is more, the performed cofactor selectivity assay with AdoMet 1 and Ado-6-azide 3 in the modification reaction, revealed that the amount of RNA modified with a longer transferable group directly correlated with the proportion of synthetic cofactor in the reaction mixture (Fig. 5). The results obtained demonstrate that DmHen1 has no preference for the natural cofactor and can be adapted for efficient modification of RNA substrates of various length and sequence not only *in vitro*, but even in complex samples containing AdoMet 1.

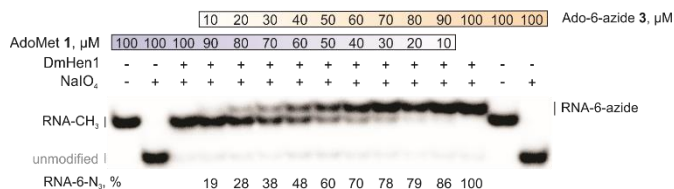


Fig. 5. Modification of siR23 in the reaction mixture with varying relative amount of AdoMet 1 and Ado-6-azide 3. Reactions were performed as described in Fig. 1 B.

Application of DmHen1 for RNA labelling

The applicability of DmHen1 for mTAG reactions prompted us to adapt this protein for one-step and two-step RNA labelling (Fig. 6). In one-step reactions, a side chain containing a reporter group is directly transferred from the double-activated synthetic cofactor analogue to the modified RNA, thus minimizing the amount of manipulations. In two-step labelling, RNA is first modified with a relatively small functional side chain, to which a reporter molecule is attached in a subsequent reaction. In this case, RNA can be labelled with different reporter groups with no limitations to the choice of the available synthetic AdoMet 1 analogues (33).

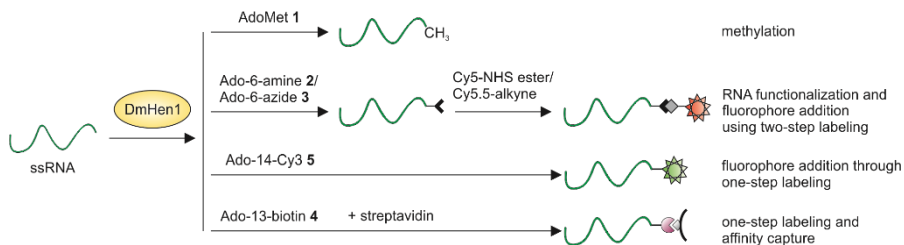


Fig. 6. Application of DmHen1 for one-step and two-step ssRNA labelling.

Two-step labelling

The ability to label RNA in two-step reactions was demonstrated using 23-80 nt RNA. After modifying the RNA substrates with transferable chains containing amine or azide terminal groups, the fluorophores were conjugated using NHS-ester or alkyne reagents, respectively (Fig. 7).

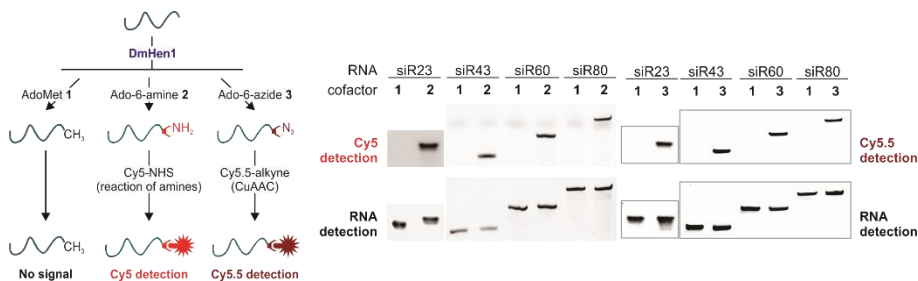


Fig. 7. Two-step labelling of ssRNAs. RNA was modified as described in Fig. 1 A, treated with Cy5-649/670-NHS ester or Cy5.5-673/707-alkyne and visualized on dPAG.

One-step labelling

For one-step labelling we decided to use Ado-13-biotin 4 and Ado-14-Cy3 5, the latter of which was synthesized specifically for this experiment by prof. V. Masevičius (Fig. 8 A). Both of their side chains were efficiently transferred onto RNA substrates of different length (Fig. 8 B, C). The proportion of biotinylated ssRNA exceeded 90% in all cases. While the efficiency of RNA modification with the Cy3-containing transferable group was slightly lower (> 55%), it was sufficient to detect the fluorescence of labelled RNAs.

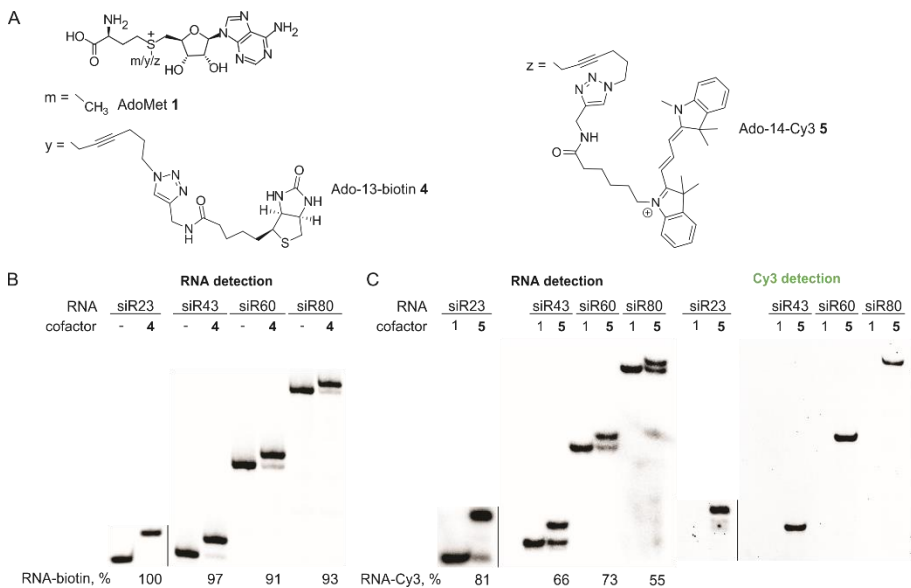


Fig. 8. Single-step labelling of ssRNAs of various lengths. A. Chemical structure of Ado-13-biotin 4 and Ado-14-Cy3 5. B. ssRNA labelling using Ado-13-biotin 4 and C. Ado-14-Cy3 5. RNA was modified as described in Fig. 1 B with the exception that 0.1 μM of ^{32}P -RNA and 50 μM Ado-13-biotin 4 or 6 μM Ado-14-Cy3 was used.

The functionality of the transferred biotin group was confirmed by purifying the RNA from the reaction mixture as 23-80 nt long biotinylated RNA was efficiently bound to streptavidin-coated magnetic beads (Fig. 9).

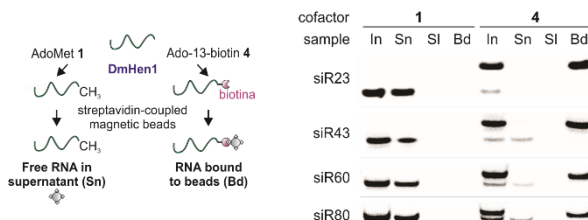


Fig. 9. One-step RNA labelling and purification. RNA modification was performed as described in Fig. 1 A except that 0.01 μM of ^{32}P -RNA and 100 μM AdoMet 1 or 50 μM Ado-13-biotin 4 was used. In – the initial mixture of modified RNA, Sn – free RNA in the supernatant, SI – washed RNA, Bd – streptavidin-bound RNA.

Thus, the experiments performed showed that DmHen1 can be used for RNA labelling in one-step and two-step approaches, which in turn enable its visualization and purification.

Application of DmHen1 ΔC for RNA labelling

Since for a wider application of DmHen1 it would be convenient to have a protein of the lowest possible molecular weight, we decided to purify a shorter

variant of DmHen1, DmHen1 Δ C (Fig. 10 A). We were interested in assessing if the C-terminal region of yet unknown function (3) is required for the activity of DmHen1 and whether the truncated protein can be adapted for RNA labelling.

Enzymatic activity of DmHen1 Δ C

The results of RNA modification experiments revealed that DmHen1 Δ C had even higher methylation efficiency compared to the full-length protein (Fig. 10 A), was equally effective in modifying different 3'-terminal nucleotides (Fig. 10 B) and showed more efficient transfer of activated side chains to the RNA substrate (Fig. 10 C). Indeed, $\geq 98\%$ of RNA was modified with functional amino and azide groups applicable for two-step RNA labelling, while 87% of miR173 was biotinylated in a single-step reaction.

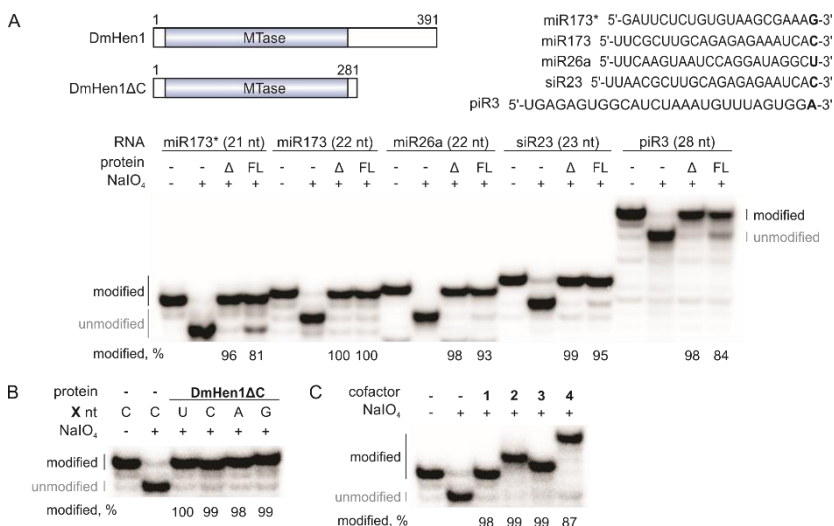


Fig. 10. Analysis of DmHen1 Δ C-catalyzed ssRNA modification. A. Methylation of RNA substrates of different length and sequence. FL – DmHen1, Δ – DmHen1 Δ C. B. Modification of RNA with different 3'-terminal nucleotides. C. Transfer of side chains of various lengths from synthetic AdoMet 1 analogues onto miR173. Reactions were performed as described in Fig. 1B, except that 100 μ M AdoMet 1, Ado-6-amine 2, Ado-6-azide 3 and 50 μ M Ado-13-biotin 4 were used.

The largest improvement in the alkylation reaction was observed with Ado-14-Cy3 5 as DmHen1 Δ C catalysed the modification of RNA with greater than 83% efficiency (Fig. 11) compared to 55–81% determined for the full-length protein (Fig. 8).

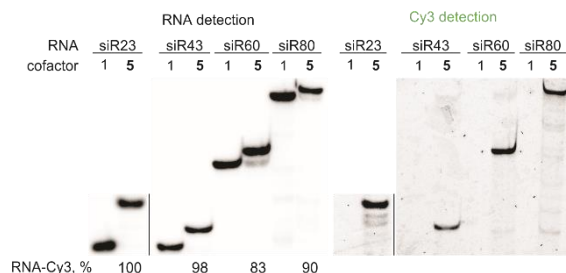


Fig. 11. Labelling of RNA substrates of different length with Cy3 fluorophore in a one-step reaction. Reactions were performed as described in Fig. 1 A.

Thus, we discovered that the C-terminal region of DmHen1 is not necessary and, in some cases, even negatively affects the efficiency and uniformity of RNA modification, indicating that the protein composed of only the methyltransferase domain is well suited for chemoenzymatic RNA labelling.

Application of DmHen1 Δ C for RNA detection by FRET

To test whether DmHen1 Δ C could be applied for the specific detection of particular RNA by Förster Resonance Energy Transfer (FRET), a mixture of total RNA with siR23 and *let7a2* RNAs in it was modified with Cy3 fluorophore, and annealed to the Cy5 labelled DNA complementary only to the siR23 RNA (Fig. 12 A).

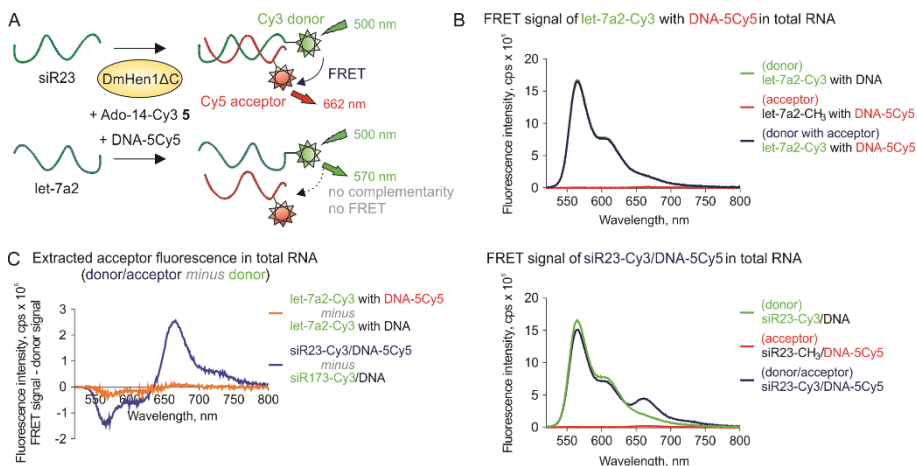


Fig. 12. Specific detection of DmHen1 Δ C-labelled ssRNA by FRET. A. The scheme of the experiment. B. The specific detection of DmHen1 Δ C-labelled siR23 by FRET in the mixture of total RNA. 1 μ M siR23 was modified in the presence of 100 μ M AdoMet 1 or 10.3 μ M of Ado-14-Cy3 5, 1 μ M DmHen1 Δ C, 0.5 mg/ml of total RNA and annealed to the siR23 complementary DNA. cps – count of registered photon units per second. C. The extracted acceptor fluorescence of both samples.

Even though the DmHen1 Δ C efficiently modified both RNA samples, as a clear donor fluorescence with a peak at 570 nm was detected in both cases (Fig. 12 B), FRET signal – the decreased and increased fluorescence at 570 and 662 nm, respectively, was registered only in the sample containing siR23 RNA (Fig. 12 B, C). Thus, the results obtained confirm that DmHen1 Δ C can be applied for the detection of specific RNA molecules in a complex sample of total RNA.

Application of DmHen1 Δ C for RNA sequencing

In the past decade, RNA sequencing has become one of the major tools in the transcriptome studies of eukaryotic and bacterial small regulatory RNAs (34–37). The preparation of small RNA for sequencing usually starts with the addition of the 3' adapter to the 3'-end of RNA by the truncated variant of T4 RNA ligase 2, T4 trRnl2 K227Q (22). However this reaction is strongly impacted by the sequence and structure of particular RNAs, thus compromising their detection and quantification (23,25–29).

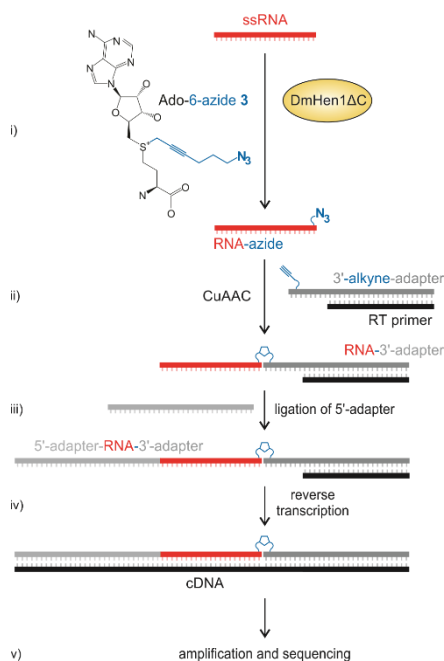


Fig. 13. The principal scheme of mDOT-seq.

To bypass this limitation, we decided to develop the new T4 trRnl2 K227Q free cDNA library preparation method mOTD-seq (methyltransferase-Directed Orthogonal Tagging and RNA sequencing), which would include the DmHen1 Δ C catalysed RNA functionalization with the azide group and the

attachment of the 3'-alkyne-adapter/RT primer through CuAAC reaction (Fig. 13).

Development of the mDOT-seq

In order to apply DmHen1ΔC for RNA sequencing, we first evaluated and optimized the unique steps of the mDOT-seq.

(i) The applicability of DmHen1 to modify RNA substrates of any sequence and structure with an azide containing transferable group was demonstrated after enzyme modified the RNA pool consisting of 4.4×10^{12} sequence variants of 21 nt with 96% efficiency (Fig. 14 A).

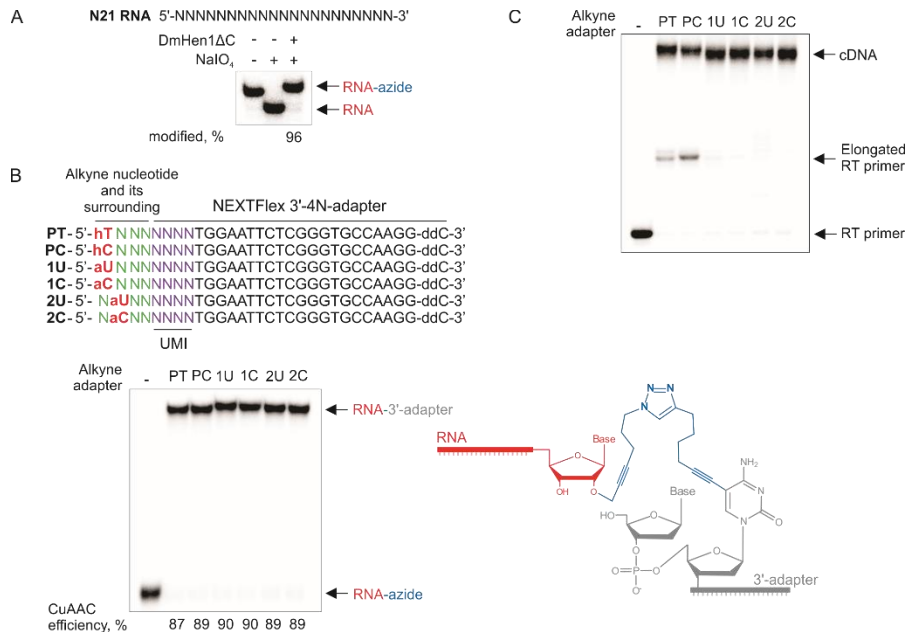


Fig. 14. Application of DmHen1ΔC for RNA sequencing. A. Alkylation of randomised 21 nt RNA substrate, N21 RNA, by DmHen1ΔC using Addo-6-azide 3. Reaction was performed as described in Fig. 1B. B. Coupling of 3'-alkyne-adapters to RNA-azide by CuAAC. hT/C – hexynyl-T/C, aU/C – C8 alkylated dU/dC, UMI – unique molecular identifiers. On the right – the linker between the RNA and the 2C 3'-adapter formed after the CuAAC reaction for which 0.2 μM ³²P-RNA-azide and 10 μM 3'-alkyne-adapter/RT primer was used. C. Reverse transcription from different RNA-3'-adapter templates. For the reverse transcription, the CuAAC reaction was performed using 20 μM RNA-azide and 5 μM 3'-alkyne-adapter/³²P-RT primer and 10 nM of the resulting compound was mixed with 10 u/μl RevertAid reverse transcriptase.

(ii) Hypothesizing that the position of the alkyl group in the 3'-adapter, the alkylated nucleotide and its surrounding may influence the efficiency of 3'-adapter attachment and/or cDNA synthesis, we chose to test six 3'-alkyne-

adapters differing by indicated parameters for the next step of cDNA library preparation (Fig. 14 B). The CuAAC reaction appeared to be independent of these factors as excellent yields (87-90%) of RNA-DNA conjugates were obtained in all cases.

(iv) The CuAAC reaction between RNA and DNA results in the formation of a linker of 14 carbon atoms (Fig. 12 B, right), which must be traversed by the reverse transcriptase during the cDNA synthesis. After optimizing the conditions of RT reaction, we showed that RevertAid reverse transcriptase (*Thermo Fisher Scientific*) could bypass this linker and synthesize a full-length cDNA (Fig. 12 C). This reaction was particularly efficient with 1U, 1C, 2U and 2C 3'-adapters, which were selected for the further analysis.

Evaluation of the mDOT-seq with the miRXplore RNA

To evaluate the suitability of the mDOT-seq for a high-throughput small RNA sequencing, we decided to test it with the miRXplore (*Miltenyi Biotec*) RNA pool composed of 1005 16-28 nt long miRNAs of equimolar concentration. Using mDOT-seq and applying the NEXTFLEX Small RNA-seq Kit v3 (*PerkinElmer*) from the 5'-adapter ligation step, we prepared 8 cDNA libraries – 2 experimental replicates for each of the selected 3'-alkyne-adapters. A comparison of the amount of miRNAs identified after Illumina sequencing revealed, that in 2U and 2C libraries (for simplicity henceforth cDNA libraries are referred by the 3'-alkyne-adapter used for their preparation) 98.3-98.7% of miRNAs were detected by at least one read, while in 1C and 1U libraries this number was smaller and reached 97.3% (Fig. 15, A, 3'-cropped nt = 0). Hypothesizing that DNA-RNA linker could impact the precision of cDNA synthesis from the 3'-end of RNA, we quantified the amount of shorter reads in each library. Indeed, the inclusion of RNAs lacking up to two nucleotides at the 3'-end increased the portion of miRNAs detected in all libraries to 99.0–99.1% (Fig. 15 A). Thus, the results obtained indicated that some miRNAs in mDOT-seq library were read without the last or penultimate nucleotide especially in 1C and 1U libraries. Then the accuracy of miRNA quantification was evaluated again 2U and 2C libraries showed the largest number of precisely measured miRNAs (Fig. 15 B). Thus, judging by the diversity of identifiable miRNAs and the accuracy of their quantification – the best results were obtained with mDOT-seq using 2C and 2U 3' alkyne-adapters.

In order to select the optimal sequence surrounding the alkylated nucleotide, we determined the amount of reads obtained with each of 2C and 2U 3'-alkyne-adapters. We found that in both libraries, the ACTC and CUCC adapters, generated the highest amount of reads (Fig. 15 C). It was these

particular 3'-alkyne-adapters that were selected for the cDNA library preparation and sequencing by the new mDOT-seq technique.

Hence, miRXplore sequencing by mDOT-seq showed that the method we developed can be used for miRNA sequencing and helped us to select the 3'-alkyne-adapters for wider application of mDOT-seq.

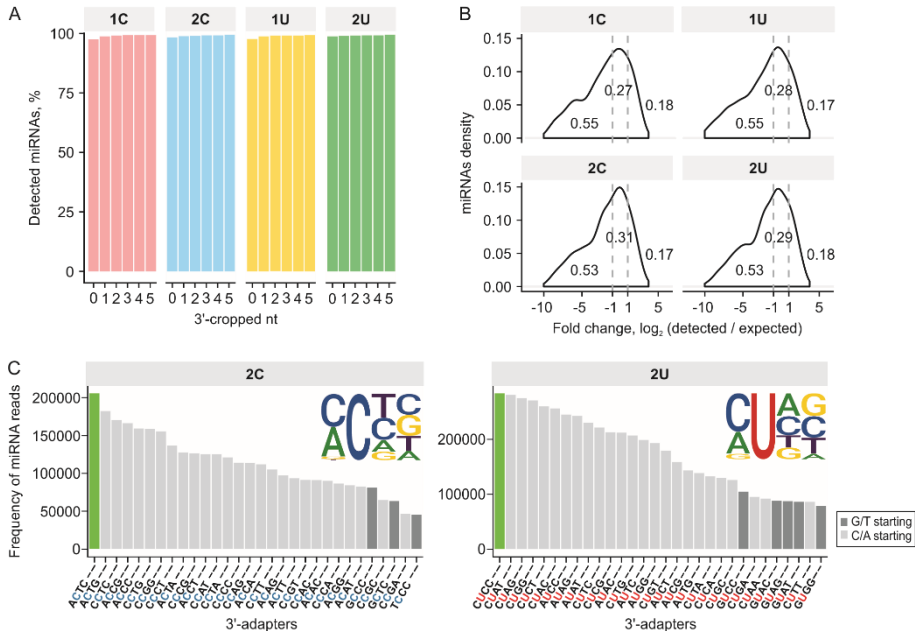


Fig. 15. miRXplore RNA sequencing by mDOT-seq. A. The amount of miRNAs with at least one read in each library. B. Quantitative evaluation of miRNA reads. miRNAs with at least 1 count per million. and regardless of their last two nucleotides were analysed. Vertical dotted lines indicate two times the deviation from the theoretical value. C. 2C and 2U 3'-alkyne-adapters with the highest number of miRNA reads. Embedded are the LOGOs of the most abundant adapter sequences.

Application of mDOT-seq for *L. casei* sRNA sequencing

In order to evaluate whether mDOT-seq could be adapted for the sequencing of longer biological RNAs, we decided to identify the small regulatory RNAs, sRNAs, of the probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) *Lactobacillus casei* BL23 widely applied in the food and biomedical industry (38).

sRNAs expressed throughout the whole growth cycle of *L. casei* BL23 were used to prepare 9 cDNA libraries – 3 biological replicates with each of 3 different methods: the C and U libraries, prepared by mDOT-seq with 3'-alkyne-adapters bearing ACTC and CUCC nucleotides at the 5'-ends,

respectively, and the N library prepared using the standard protocol of NEXTflex Small RNA-seq Kit v3 (PerkinElmer) (Fig. 16 A).

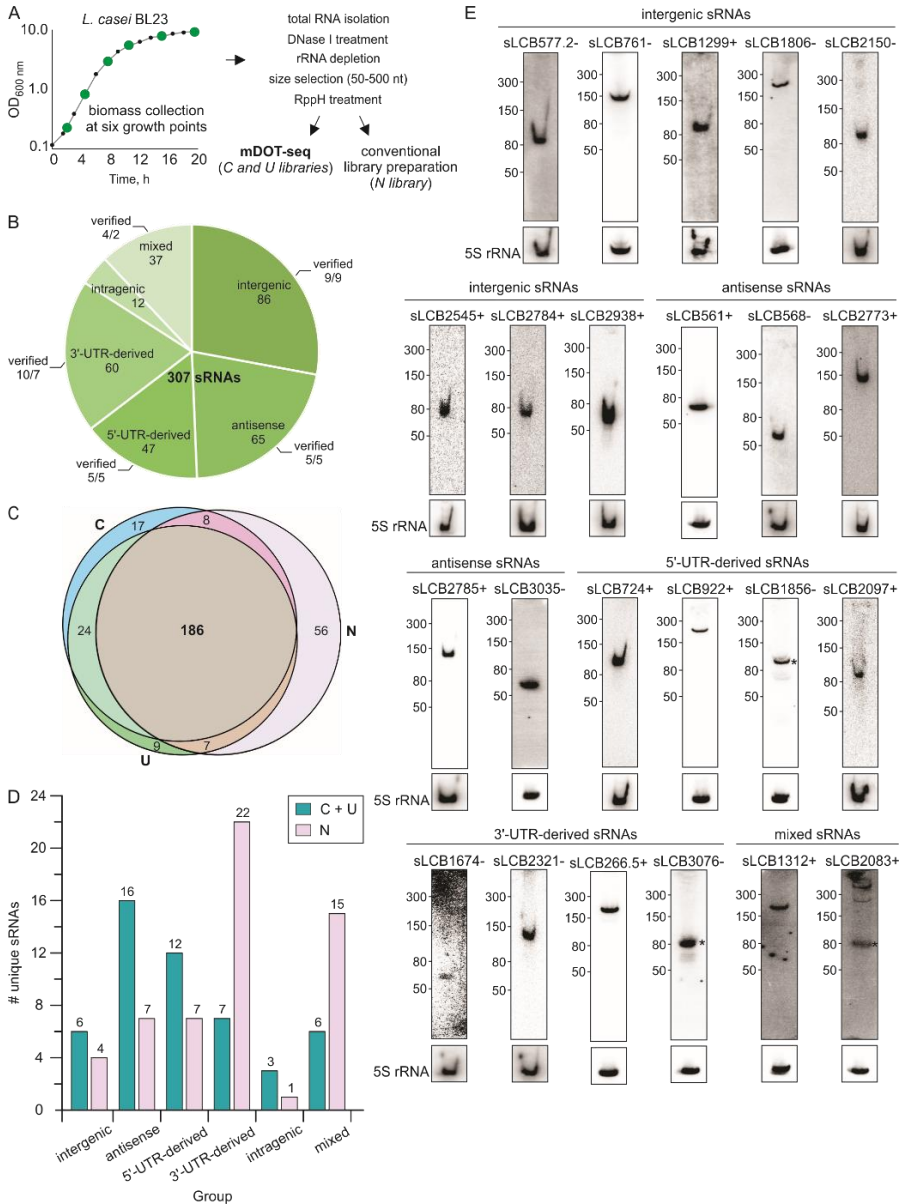


Fig. 16. Sequencing of *L. casei* BL23 sRNAs by mDOT-seq. **A.** Workflow of cDNA library preparation. **B.** Group distribution of predicted sRNAs. The portion of sRNAs verified by *Northern* hybridization is indicated. **C.** Venn diagram of sRNAs identified in three libraries. **D.** Group distribution of unique sRNAs, identified only in C + U and N libraries. **E.** Confirmation of potential sRNAs by *Northern* hybridization. Asterisk marks sRNAs where multiple bands are visible.

After Illumina sequencing a total of 307 potential sRNAs were identified, which were divided into six groups based on their genomic context (Fig. 16 B). 186 sRNAs were detected in all cDNA libraries (Fig. 16 C). 26-32% of them lacked 1, less often several nucleotides at the 3'-end. However, it is important to note, that similar amount of shorter sRNAs were identified in all libraries, regardless of their preparation technique.

201 sRNAs overlapped then N library prepared by the conventional method was compared to both C and U libraries (C + U) prepared by the mDOT-seq (Fig. 16 C). Meanwhile, 56 and 50 sRNAs were identified only in N and C + U libraries. Among them, 3 times more sRNAs derived from the 3'-UTRs were detected exclusively in the N library (Fig. 16 D).

Using *Northern* hybridization, we were able to confirm the expression of 23 sRNAs predicted in all three libraries (Fig. 16 E, experiments were performed by R. Mineikaitė). However, only 3 out of 8 of the 3'-UTR-derived sRNAs, that were detected only in the N library, were confirmed, suggesting that most of the transcripts derived from the 3' UTRs identified exclusively in the N library were incorrectly assigned to sRNAs. cDNA libraries prepared by mDOT-seq did not exhibit this particular bias.

To assess the taxonomic conservatism of predicted sRNA, we performed a BLAST search on 6 related genomes of *Lactobacillus casei* group (LCG) and 9 genomes of evolutionarily more distant *Lactobacillaceae* strains. The majority of the homologous sequences (76-307) were identified in LCG bacteria, suggesting that the results obtained from the *L. casei* BL23 sRNA sequencing could be applied to these widely used probiotics. However, sequences similar to only 9 sRNAs were detected in other strains of the *Lactobacillaceae* family, demonstrating that most of the potential *L. casei* BL23 sRNAs are relatively unique and found only in the genomes of the LCG bacteria.

CONCLUSIONS

1. *Drosophila melanogaster* DmHen1 and *Homo sapiens* HsHen1 RNA methyltransferases are Co^{2+} and Co^{3+} dependent enzymes which *in vitro* can transfer not only methyl, but also larger side chains from synthetic AdoMet analogues onto natural 22-28 nt and longer substrates of single-stranded RNA.
2. DmHen1 methyltransferase can be adapted for the single-step and two-step labelling of 22-80 nt long RNA with fluorophores and biotin, which in turn can be successfully applied for RNA visualization and enrichment.
3. The variant of DmHen1 without the C-terminal region, DmHen1 Δ C, has a higher RNA modification efficiency, does not discriminate RNA substrates based on the 3'-terminal nucleotide and can be adapted for RNA visualization by FRET in a sample of total RNA.
4. mDOT-seq (methyltransferase-Directed Orthogonal Tagging and RNA sequencing) – the new method for cDNA library preparation for single-stranded RNA sequencing – was created. mDOT-seq exploits the ability of DmHen1 Δ C to modify the single-stranded RNAs of any sequence with an azide group containing transferable chain resulting in reduced bias in the detection of structured 3'-ends of RNA molecules as compared to the standard technique.
5. It was shown that mDOT-seq can be applied for the identification of eukaryotic microRNAs, miRNAs, and bacterial small regulatory RNAs, sRNAs as potential sRNAs in the probiotic *Lactobacillus casei* BL23 was characterized for the first time.

REFERENCES

1. Boccaletto P, Machnicka MA, Purta E, Piątkowski P, Bagiński B, Wirecki TK, et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Research*. 2018 01 04;46(D1):D303–7.
2. Ayadi L, Galvanin A, Pichot F, Marchand V, Motorin Y. RNA ribose methylation (2'-O-methylation): Occurrence, biosynthesis and biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2019 03;1862(3):253–69.
3. Huang RH. Unique 2'-O-Methylation by Hen1 in Eukaryotic RNA Interference and Bacterial RNA Repair. *Biochemistry*. 2012 05 22;51(20):4087–95.
4. Huang Y, Ji L, Huang Q, Vassilyev DG, Chen X, Ma J-B. Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature*. 2009 10;461(7265):823–7.
5. Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Siomi H, Siomi MC. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev*. 2007 07 01;21(13):1603–8.
6. Kirino Y, Mourelatos Z. The mouse homolog of HEN1 is a potential methylase for Piwi-interacting RNAs. *RNA*. 2007 07 13;13(9):1397–401.
7. Horwich MD, Li C, Matranga C, Vagin V, Farley G, Wang P, et al. The *Drosophila* RNA Methyltransferase, DmHen1, Modifies Germline piRNAs and Single-Stranded siRNAs in RISC. *Current Biology*. 2007 07;17(14):1265–72.
8. Chan CM, Zhou C, Huang RH. Reconstituting Bacterial RNA Repair and Modification in Vitro. *Science*. 2009 10 09;326(5950):247–247.
9. Abe M, Naqvi A, Hendriks G-J, Feltzin V, Zhu Y, Grigoriev A, et al. Impact of age-associated increase in 2'-O-methylation of miRNAs on aging and neurodegeneration in *Drosophila*. *Genes & Development*. 2014 01 01;28(1):44–57.
10. Peng L, Zhang F, Shang R, Wang X, Chen J, Chou JJ, et al. Identification of substrates of the small RNA methyltransferase Hen1 in mouse spermatogonial stem cells and analysis of its methyl-transfer domain. *J Biol Chem*. 2018 06 29;293(26):9981–94.
11. Kamminga LM, Luteijn MJ, den Broeder MJ, Redl S, Kaaij LJT, Roovers EF, et al. Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in zebrafish. *EMBO J*. 2010 11 03;29(21):3688–700.
12. Mattay J, Dittmar M, Rentmeister A. Chemoenzymatic strategies for RNA modification and labeling. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2021 08 01;63:46–56.

13. Muthmann N, Guez T, Vasseur J-J, Jaffrey SR, Debart F, Rentmeister A. Combining Chemical Synthesis and Enzymatic Methylation to Access Short RNAs with Various 5' Caps. *ChemBioChem*. 2019;20(13):1693–700.
14. Anhäuser L, Rentmeister A. Enzyme-mediated tagging of RNA. *Current Opinion in Biotechnology*. 2017 12 01;48:69–76.
15. George JT, Srivatsan SG. Bioorthogonal chemistry-based RNA labeling technologies: evolution and current state. *Chem Commun*. 2020 10 15;56(82):12307–18.
16. Holstein JM, Stummer D, Rentmeister A. Engineering *Giardia lamblia* trimethylguanosine synthase (GlaTgs2) to transfer non-natural modifications to the RNA 5'-cap. *Protein Eng Des Sel*. 2015 06;28(6):179–86.
17. Motorin Y, Burhenne J, Teimer R, Koynov K, Willnow S, Weinhold E, et al. Expanding the chemical scope of RNA:methyltransferases to site-specific alkynylation of RNA for click labeling. *Nucleic Acids Research*. 2011 03 01;39(5):1943–52.
18. Tomkuvienė M, Clouet-d'Orval B, Černiauskas I, Weinhold E, Klimašauskas S. Programmable sequence-specific click-labeling of RNA using archaeal box C/D RNP methyltransferases. *Nucleic Acids Research*. 2012 08 01;40(14):6765–73.
19. Osipenko A, Plotnikova A, Nainytė M, Masevičius V, Klimašauskas S, Vilkaitis G. Oligonucleotide-Addressed Covalent 3'-Terminal Derivatization of Small RNA Strands for Enrichment and Visualization. *Angew Chem*. 2017 06 01;129(23):6607–10.
20. Schulz D, Holstein JM, Rentmeister A. A Chemo-Enzymatic Approach for Site-Specific Modification of the RNA Cap. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013;52(30):7874–8.
21. Shu X, Dai Q, Wu T, Bothwell IR, Yue Y, Zhang Z, et al. *N*⁶-Allyl adenosine: A New Small Molecule for RNA Labeling Identified by Mutation Assay. *J Am Chem Soc*. 2017 12 06;139(48):17213–6.
22. Viollet S, Fuchs RT, Munafo DB, Zhuang F, Robb GB. T4 RNA Ligase 2 truncated active site mutants: improved tools for RNA analysis. *BMC Biotechnol*. 2011 07 01;11(1):72.
23. Hafner M, Renwick N, Brown M, Mihailovic A, Holoch D, Lin C, et al. RNA-ligase-dependent biases in miRNA representation in deep-sequenced small RNA cDNA libraries. *RNA*. 2011 11 01;17(9):1697–712.
24. Zhang Z, Lee JE, Riemondy K, Anderson EM, Yi R. High-efficiency RNA cloning enables accurate quantification of miRNA expression by deep sequencing. *Genome Biol*. 2013;14(10):R109.

25. Heyer EE, Ozadam H, Ricci EP, Cenik C, Moore MJ. An optimized kit-free method for making strand-specific deep sequencing libraries from RNA fragments. *Nucleic Acids Research*. 2015 01 09;43(1):e2.
26. Jayaprakash AD, Jabado O, Brown BD, Sachidanandam R. Identification and remediation of biases in the activity of RNA ligases in small-RNA deep sequencing. *Nucleic Acids Research*. 2011 11 01;39(21):e141–e141.
27. Zhuang F, Fuchs RT, Sun Z, Zheng Y, Robb GB. Structural bias in T4 RNA ligase-mediated 3'-adapter ligation. *Nucleic Acids Research*. 2012 04 01;40(7):e54–e54.
28. Fuchs RT, Sun Z, Zhuang F, Robb GB. Bias in Ligation-Based Small RNA Sequencing Library Construction Is Determined by Adaptor and RNA Structure. Zhang B, sudarytojas. *PLoS ONE*. 2015 05 05;10(5):e0126049.
29. Jackson TJ, Spriggs RV, Burgoyne NJ, Jones C, Willis AE. Evaluating bias-reducing protocols for RNA sequencing library preparation. *BMC Genomics*. 2014;15(1):569.
30. Yang Z, Vilkaitis G, Yu B, Klimašauskas S, Chen X. Approaches for Studying MicroRNA and Small Interfering RNA Methylation In Vitro and In Vivo. *Methods Enzymol*. 2007;427:139-54.
31. Jain R, Shuman S. Bacterial Hen1 is a 3' terminal RNA ribose 2'-O-methyltransferase component of a bacterial RNA repair cassette. *RNA*. 2010 02 01;16(2):316–23.
32. Jain R, Shuman S. Active site mapping and substrate specificity of bacterial Hen1, a manganese-dependent 3' terminal RNA ribose 2' O-methyltransferase. *RNA*. 2011 03;17(3):429–38.
33. Plotnikova A, Baranauske S, Osipenko A, Auskas SK, Vilkaitis G. Mechanistic insights into small RNA recognition and modification by the HEN1 methyltransferase. 2013;16.
34. Lu C, Tej SS, Luo S, Haudenschield CD, Meyers BC, Green PJ. Elucidation of the Small RNA Component of the Transcriptome. *Science*. 2005 09 02;309(5740):1567–9.
35. Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, et al. Deep Sequencing Analysis of Small Noncoding RNA and mRNA Targets of the Global Post-Transcriptional Regulator, Hfq. *PLOS Genetics*. 2008 08 22;4(8):e1000163.
36. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*. 2019 01 08;47(D1):D155–62.
37. Hör J, Matera G, Vogel J, Gottesman S, Storz G. Trans-Acting Small RNAs and Their Effects on Gene Expression in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *EcoSal Plus*. 2020 03;9(1).

38. Hill D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C, Ross RP. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Front Microbiol.* 2018;9:2017.

CURRICULUM VITAE

Milda Mickutė

Department of Biological DNA Modification
Institute of Biotechnology, Life Sciences Centre, Vilnius University
Saulėtekio Ave. 7, LT-10257 Vilnius
Phone no. +370 623 79436; e-mail: milda.mickute@bti.vu.lt

EDUCATION:

2007-2011 – Bachelor's degree in Molecular biology, Vilnius University, Lithuania; **2011-2013** – Master's degree in Biochemistry, Vilnius University, Lithuania; **2012** – Erasmus exchange student for 5 months at Copenhagen University, Denmark; **2013-2017** – PhD student in Biochemistry, Vilnius University, Lithuania.

SCIENTIFIC WORK EXPERIENCE:

Centre for Innovative Medicine, Department of Experimental and Clinic Medicine, Lithuania: **2009-2010** – Laboratory Technician; Vilnius University, Institute of Biotechnology, Department of Biological DNA Modification, Lithuania: **2011-2014** – Laboratory Technician; **2013-2017** – Biologist-Researcher; **since 2017** – Junior Research Scientist.

INTERNSHIP/TRAINING:

2013 – short-term visiting scientist, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Germany; **2014** – trainee, Life Technologies Client Teaching Center, Germany; short-term visiting scientist INRA/Micalis, Jouy en Josas, France; **2016** – trainee, COST action CM1303 "Systems Biocatalysis" training school, Italy.

PUBLISHED SCIENTIFIC RESEARCH:

Patent – Klimašauskas S, Vilkaitis G, Mickutė M. "Analysis of single-stranded RNA". EP3271478B1, US11008605B2, WO2016148556A1.

Publications: (i) Baranauskė S*, Mickutė M*, Plotnikova A, Finke A, Venclovas Č, Klimašauskas S, Vilkaitis G. Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase: HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins. *Nucleic Acids Research*. 2015 03 11;43(5):2802–12. (IF – 16,97). *These authors contributed equally to the paper as first authors; (ii) Mickutė M, Nainytė M, Vasiliauskaitė L, Plotnikova A, Masevičius V, Klimašauskas S, Vilkaitis G. Animal Hen1 2'-O-methyltransferases as tools for 3'-terminal functionalization and labeling of

single-stranded RNAs. *Nucleic Acids Research*. 2018 09 28;46(17):e104–e104. (IF – 16,97); (iii) Tomkuvienė M, Mickutė M, Vilkaitis G, Klimašauskas S. Repurposing enzymatic transferase reactions for targeted labeling and analysis of DNA and RNA. *Current Opinion in Biotechnology*. 2019 02 1;55:114–23. (IF – 9,74); (iv) Mickutė M, Kvederavičiūtė K, Osipenko A, Mineikaitė R, Klimašauskas S, Vilkaitis G. Methyltransferase-directed orthogonal tagging and sequencing of miRNAs and bacterial small RNAs. *BMC Biology*. 2021 06 22;19(1):129. (IF – 7,43).

INTERNATIONAL CONFERENCES:

2013 – FEBS Congress „Mechanisms in Biology“, Saint Petersburg, Russia. **2015** – „7th New England Biolabs Meeting on DNA Restriction and Modification“, Gdansk, Poland; “The Non-Coding Genome”, Heidelberg, Germany; **2016** – “Vita Scientia”, Vilnius, Lithuania; „81st Harden Conference: RNA and Disease“, Winchester, UK; **2017** – „The Non-Coding Genome“, Heidelberg, Germany; **2020** – „The complex life of RNA“, on line; **2021** – „The 26th Annual Meeting of the RNA Society“, on line; “13th LAB Symposium“, on line.

MAIN RESEARCH INTEREST:

Small non-coding RNAs, their biogenesis and functions; RNA methyltransferases and their application.

TEACHING:

Supervision on 6 Bachelor’s and consulting on 3 Master’s degree research projects. Assistance on student’s laboratory training.

AWARDS AND DISTINCTIONS:

2008, 2009, 2010 – Research Council’s of Lithuania Student’s Scientific Research Project participant; **2013** – FEBS scholarship for participation in FEBS Congress; **2015** – Research Council’s of Lithuania grant for Academic mobility; **2016** – Lithuanian Biochemical Society’s (LBS) grant for participation in the LBS conference; **2021** – Vilnius University award for significant scientific achievements in 2020 in the category of Best applied work.

CURRICULUM VITAE

Milda Mickutė

DNR modifikacijos tyrimų skyrius

Biotechnologijos institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas
Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius

Tel. nr.: +370 623 79436; el. adresas: milda.mickute@bti.vu.lt

IŠSILAVINIMAS:

2007-2011 m. – bakalauro studijos Vilniaus universitete (biomedicinos mokslai, Molekulinė biologija); **2011-2013 m.** – magistro studijos Vilniaus universitete (fiziniai mokslai, Biochemija); **2012 m.** – 5 mėnesių trukmės studijos Kopenhagos universitete (Danija) pagal Erasmus mainų programą; **2013-2017 m.** – biochemijos doktorantūros studijos Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute.

DARBINĖ VEIKLA:

Valstybinis mokslinių tyrimų institutas, Inovatyvios medicinos centro, Eksperimentinės ir klinikinės medicinos departamentas: **2009-2010 m.** – laborantė; Vilniaus universitetas, Biotechnologijos institutas, DNR modifikacijos tyrimų skyrius: **2011-2014 m.** – laborantė; **2013-2017 m.** – biologė tyrėja; **nuo 2017 m.** – jaunesnioji mokslo darbuotoja.

STAŽUOTĖS:

2013 m. – Makso Planko augalų selekcijos institutas, Vokietija; **2014 m.** – Life Technologies klientų mokymo centras, Vokietija; **2014 m.** – INRA institutas, Prancūzija; **2016 m.** – COST veiklos CM1303 „Systems Biocatalysis“ mokykla, Italija.

PASKELBTI MOKSLINIAI DARBAI:

Patentas – Klimašauskas S, Vilkaitis G, Mickutė M. “Analysis of single-stranded RNA”. EP3271478B1, US11008605B2, WO2016148556A1.

Publikacijos: (i) Baranauskė S*, Mickutė M*, Plotnikova A, Finke A, Venclovas Č, Klimašauskas S, ir Vilkaitis G. Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase: HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins. *Nucleic Acids Research*. 2015 m. kovo 11 d.;43(5):2802–12. (Cituojamumo rodiklis – 16,97). *Abi autorės vienodai prisidėjo prie straipsnio paruošimo; (ii) Mickutė M, Nainytė M, Vasiliauskaitė L, Plotnikova A, Masevičius V, Klimašauskas S, Vilkaitis G. Animal Hen1 2'-O-methyltransferases as tools for 3'-terminal functionalization and labeling

of single-stranded RNAs. *Nucleic Acids Research*. 2018 m. rugsėjo 28 d.;46(17):e104–e104. (Cituojamumo rodiklis – 16,97); (iii) Tomkuvienė M, Mickutė M, Vilkaitis G, Klimašauskas S. Repurposing enzymatic transferase reactions for targeted labeling and analysis of DNA and RNA. *Current Opinion in Biotechnology*. 2019 m. vasario 1 d.;55:114–23. (Cituojamumo rodiklis – 9,74); (iv) Mickutė M, Kvederavičiūtė K, Osipenko A, Mineikaitė R, Klimašauskas S, Vilkaitis G. Methyltransferase-directed orthogonal tagging and sequencing of miRNAs and bacterial small RNAs. *BMC Biology*. 2021 m. birželio 22 d.;19(1):129. (Cituojamumo rodiklis – 7,43).

TARPTAUTINĖS KONFERENCIJOS:

2013 m. – FEBS kongresas „Mechanisms in Biology“, Sankt Peterburgas, Rusija. **2015 m.** – „7th New England Biolabs Meeting on DNA Restriction and Modification“, Gdanskas, Lenkija; “The Non-Coding Genome”, Heidelbergas, Vokietija; **2016 m.** – “Vita Scientia”, Vilnius, Lietuva; „81st Harden Conference: RNA and Disease“, Vinčesteris, Jungtinė Karalystė; **2017 m.** – „The Non-Coding Genome“, Heidelbergas, Vokietija; **2020 m.** – „The complex life of RNA“, virtuali; **2021 m.** – „The 26th Annual Meeting of the RNA Society“, virtuali; “13th LAB Symposium“, virtuali.

PAGRINDINIAI MOKSLINIAI INTERESAI:

Mažosios reguliacinės RNR, jų biogenezė ir funkcijos; RNR metiltransferazės ir jų pritaikymas RNR žymėjimui.

MOKYMAS:

Vadovavimas ruošiant 6 baigiamuosius bakalauro darbus; konsultavimas ruošiant 3 baigiamuosius magistro darbus; laboratorinių darbų vedimas.

APDOVANOJIMAI:

2008, 2009 m. – LMT Studentų mokslinė praktika; **2010 m.** – LMT Studentų moksliniai tyrimai; **2013 m.** – FEBS stipendijos dalyvauti tarptautiniame kongrese; **2015 m.** – LMT stipendija dalyvauti tarptautinėje konferencijoje; **2016 m.** – Lietuvos biochemikų draugijos stipendija dalyvauti tarptautinėje konferencijoje; **2021 m.** – Vilniaus universiteto apdovanojimas už reikšmingus mokslinius pasiekimus 2020 m. geriausio taikomojo darbo kategorijoje.

DALYVAVIMAS MOKSLINIUOSE PROJEKTUOSE

1. „Biotechnologija ir biofarmacija: fundamentiniai ir taikomieji tyrimai“, VP1-3.1-ŠMM-08-K-01-005/KS-560000-1757. Žmogiškųjų išteklių plėtros veiksmų programos projektas, finansuotas iš ES struktūrinės paramos lėšų. Projekto vadovas – prof. dr. K. Sasnauskas, veiklos vadovas – prof. dr. G. Vilkaitis. Tyrėja – 2013 m., jaunesnioji mokslo darbuotoja – 2014-2015 m.
2. “Molekulinės įrankinės epigenomikai ir RNomikai”, VP1-3.1-ŠMM-07-K-01-105. Visuotinės dotacijos projektas iš ES struktūrinių fondų lėšų. Projekto vadovas – prof. habil. dr. S. Klimašauskas. Jaunesnioji mokslo darbuotoja 2013-2015 m.
3. „Mažųjų nekoduojančių RNR, reguliuojančių Gram-teigiamų pienarūgščių bakterijų atsaką į antimikrobinių veiksmų poveikį, nustatymas ir analizė“, MIP-059/2015. LMT Mokslinių grupių projektas. Projekto vadovas – prof. dr. G. Vilkaitis. Biologė tyrėja 2015-2016 m., jaunesnioji mokslo darbuotoja – 2017-2018 m.
4. Advanced Grant „Single-cell temporal tracking of epigenetic DNA marks - Epitrack“. ES programos "Horizontas 2020" Europos mokslo tarybos dotacijų programa patyrusiems mokslininkams. Projekto vadovas prof. habil. dr. S. Klimašauskas. Jaunesnioji mokslo darbuotoja nuo 2018 m.
5. “5'-gale modifikuotų RNR ir jas moduliuojančių baltymų tyrimas E. coli ir probiotinėse pienarūgštėse bakterijose”, S-MIP-19-31. LMT Jaunesnioji mokslo darbuotoja nuo 2019 m.

PEDAGOGINĖ IR MOKSLO POPULIARINIMO VEIKLA

1. Vadovavimas ruošiant bakalauro baigiamuosius darbus: Dominyka Grigaitė (genetika) – 2013-2014 m., Indrė Kirilauskaitė (biochemija) – 2015-2016 m., Monika Jazdauskaitė (molekulinė biologija) – 2016-2018 m., Oskaras Safinas (biochemija), Gytė Tupikaitė (genetika) – 2019-2021 m., Gabrielė Olendraitė (molekulinė biologija) – nuo 2020 m.
2. Konsultavimas ruošiant magistro baigiamuosius darbus: Gabrielė Trečiokaitė (genetika) – 2016-2018 m., Monika Jazdauskaitė (biochemija) – 2018-2020 m., Raminta Mineikaitė (molekulinė biologija) – nuo 2020 m.
3. Molekulinės Biotechnologijos laboratorinių darbų vedimas Medicinos genetikos magistro studijų studentams – 2014-2017 m.
4. Ekskursijų vedimas mokiniams ir mokytojams Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto DNR modifikacijos tyrimų skyriuje – 2018-2019 m.
5. Savanoriavimas organizuojant XIII-ąją tarptautinę Lietuvos biochemikų draugijos konferenciją, 2014 birželio 17-20 d., Birštonas, Lietuva.

DISERTACIJOS TEMA PARENGTI MOKSLINIAI DARBAI

Paskelbti moksliniai straipsniai:

Mickutė M, Kvederavičiūtė K, Osipenko A,
Mineikaitė R, Klimašauskas S, Vilkaitis G

Methyltransferase-directed orthogonal tagging and sequencing of miRNAs and bacterial small RNAs

BMC Biology

2021 10 22;19(1):129

doi:10.1186/s12915-021-01053-w

(Cituojamumo rodiklis – 7,43)

Mickutė M, Nainytė M, Vasiliauskaitė L, Plotnikova A,
Masevičius V, Klimašauskas S, Vilkaitis G

**Animal Hen1 2'-O-methyltransferases as tools for 3'-terminal
functionalization and labeling of single-stranded RNAs**

Nucleic Acids Research

2018 09 28;46(17):e104–e104
doi: 10.1093/nar/gky514

(Cituojamumo rodiklis – 16,97)

Tarptautinis patentas – Klimašauskas S, Vilkaitis G, **Mickutė M.** “Analysis of single-stranded RNA”. EP3271478B1, US11008605B2, WO2016148556A1.

Pristatyti pranešimai:

1. **Mickutė M**, Osipenko A, Masevičius V, Klimašauskas S, Vilkaitis G. Application of small RNA methyltransferases for diverse RNA labeling, 7th New England Biolabs Meeting on DNA Restriction and Modification, 2015 m. rugpjūčio 24-29 d., Gdanskas, Lenkija (stendinis pranešimas).
2. **Mickutė M**, Osipenko A, Masevičius V, Klimašauskas S, Vilkaitis G. Small non-coding RNA methyltransferases as a tool for diverse RNA labeling, The Non-Coding Genome, 2015 m. spalio 18-21 d., Heidelbergas, Vokietija (stendinis pranešimas).
3. **Mickutė M**, Osipenko A, Masevičius V, Klimašauskas S, Vilkaitis G. mTAG labeling of single and double-stranded RNAs using HEN1 methyltransferases, Vita Scientia, 2016 m. sausio 4 d., Vilnius, Lietuva (stendinis pranešimas).
4. **Mickutė M**, Osipenko A, Masevičius V, Klimašauskas S, Vilkaitis G. mTAG as an efficient molecular tool for selective small RNA labeling, 81st Harden Conference: RNA and Disease, 2016 m. rugsėjo 4-7 d., Vinčesteris, Jungtinė Karalystė (trumpas žodinis ir stendinis pranešimai).
5. **Mickutė M**, Osipenko A, Masevičius V, Klimašauskas S, Vilkaitis G. mTAG as an efficient molecular tool for selective small RNA labeling, COST action CM1303 "Systems Biocatalysis" Training School, 2016 m. balandžio 27 d. – gegužės 1 d., Siena, Italija (trumpas žodinis ir stendinis pranešimai).
6. **Mickutė M**, Osipenko A, Jazdauskaitė M, Grigaitytė S, Masevičius V, Klimašauskas S, Vilkaitis G. Functionalization of small RNAs through covalent 3' end labelling – the case of HEN1 methyltransferases, The Non-Coding Genome, 2017 m. rugsėjo 13-16 d., Heidelbergas, Vokietija (stendinis pranešimas).
7. **Mickutė M**, Mineikaitė R, Grigaitytė S, Kvederavičiūtė K, Safinas O, Kulakauskas S, Vilkaitis G. The identification and functional analysis of small non-coding RNAs in probiotic *Lactobacillus casei*. The Complex Life of RNA, 2020 m. spalio 7-9 d., virtuali (stendinis pranešimas).

8. **Mickutė M**, Kvederavičiūtė K, Osipenko A, Mineikaitė R, Olendraitė G, Tupikaitė G, Kulakauskas S, Vilkaitis G. Application of Hen1 2'-O-methyltransferase for sequencing of bacterial small non-coding RNAs in probiotic *Lactobacillus casei*. The 26th Annual Meeting of the RNA Society, 2021 m. gegužės 25 d. – birželio 4 d., virtuali (stendinis pranešimas).

PADĖKA

Dėkoju darbo vadovui prof. dr. Giedriui Vilkaičiui už pasiūlytą darbo temą, pagalbą planuojant eksperimentus, interpretuojant jų rezultatus ir neišsenkančią idėjų galybę. Dėkoju už pasitikėjimą ir paramą kritiniais momentais. Dėkoju už sudarytas sąlygas visapusiškam mano, kaip mokslininkės, tobulėjimui.

Dėkoju prof. habil. dr. Sauliui Klimašauskui už suteiktą galimybę vykdyti mokslinius tyrimus jo vadovaujamoje laboratorijoje, už visas išvalgas ir patarimus įgyvendinant mokslines idėjas.

Dėkoju disertacijos tema rengtų publikacijų koautoriams: dr. Linai Vasiliauskaitei ir Alexandrai Plotnikovai, pradėjusioms gyvūnų Hen1 metiltransferazių tyrimus ir svariai prisidėjusioms prie jų fermentinių savybių nustatymo; dr. Aleksandr Osipenko, kurio darbai ir patirtis tiriant baltažiedžio vairotenio AtHEN1 metiltransferazę buvo tvirtas kelrodis atliekant gyvūnų baltymų tyrimus; už sintetinius AdoMet analogus, be kurių taikomoji šio darbo dalis būtų tiesiog neįmanoma; dėkoju dr. Mildai Nainytei ir prof. dr. Viktorui Masevičiui, kuriam esu dėkinga ir už suteiktas konsultacijas bei patarimus perprantant cheminius šio darbo aspektus; Kotrynai Kvederavičiūtei už atliktą bioinformatinę analizę ir produktyvų bei konstruktyvų bendradarbiavimą; Ramintai Mineikaitei už atliktus *Norther* hibridizacijos eksperimentus.

Dėkoju Audronei Rukšėnaitei už atliktas HPLC-MS analizes, dr. Viliui Kurauskui už suklonuotą HsHen1 metiltransferazę, dr. Sauliui Kulakauskui už *L. casei* BL23 kamieną.

Dėkoju savo pirmajai vadovei dr. Simonai Baranauskei už suteiktas žinias ir išugdytus darbo įgūdžius.

Dėkoju visiems laboratorijos kolegoms, ypač Janinai Ličytei, dr. Liepai Gasiulei, Giedrei Urbanavičiūtei, dr. Vaidotui Stankevičiui už vertingas mokslines diskusijas ir patarimus.

Dėkoju savo buvusiems ir esamiems studentams, kurių dėka augu ne tik kaip mokslininkė, bet ir kaip vadovė.

Dėkoju draugams ir šeimai už nuolatinį palaikymą. Ačiū močiutei, tėvams ir broliams, atlaikiusiems ilgas mano mokymosi valandas dar mokykloje. Ačiū vyrui už paramą visų studijų universitete metu. Ačiū už rodomą pavyzdį, į kurį norisi lygiuotis.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 15 egz.