

VILNIAUS UNIVERSITETAS

SIMONA BARANAUSKĖ

AUGALŲ MAŽŪJŲ NEKODUOJANČIŲ RNR
METILTRANSFERAZĖS HEN1 STRUKTŪRINIS-
FUNKCINIS TYRIMAS

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2016

Disertacija rengta 2008–2015 m. Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute.

Mokslinis vadovas - dr. **Giedrius Vilkaitis** (Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija– 04 P).

TURINYS

SANTRUMPOS	6
ĮVADAS	9
LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. miRNR – mažosios nekoduojančios RNR, dalyvaujančios RNR nutildyme ..	13
1.1.1. Mažųjų nekoduojančių RNR atradimas	13
1.1.2. Trijų mažųjų nekoduojančių RNR klasių apibūdinimas	14
1.1.3. Kanoninių miRNR susidarymas gyvūnuose ir augaluose	23
1.1.4. Iš Ago ir viengrandinės, kreipiančiosios miRNR grandinės sudaryto miRISC susiformavimas	29
1.1.4.1. Selektivi mnkRNR/mnkRNR* duplekso sąveika su Ago	31
1.1.4.2. Ago ir miRNR/miRNR* duplekso sąveika	32
1.1.4.3. miRNR/miRNR* duplekso lydinčiosios miRNR* grandinės iš pre-miRISC pašalinimas	33
1.1.5. miRNR/miRNR* duplekso kreipiančiosios grandinės pasirinkimo principai.....	34
1.1.6. Efektorinių miRISC kompleksų atliekamos funkcijos.....	40
1.2. Augalų miRNR/miRNR* duplekso iškirpimo ir modifikavimo baltymai.....	45
1.2.1. SERRATE ir jo homologai	45
1.2.1.1. Vairenio SERRATE homologas gyvūnuose Ars2.....	45
1.2.1.2. Augalų SERRATE struktūra	46
1.2.1.3. SE vaidmuo miRNR biogenezeje	47
1.2.2. HYL1 ir kiti dgRNR surišantys baltymai, dalyvaujantys mažųjų RNR biogenezeje.....	48
1.2.2.1. Kiti į HYL1 panašūs, miRNR bei siRNR biogenezeje dalyvaujantys, baltymai	49
1.2.2.2. HYL1 struktūra.....	55
1.2.2.3. HYL1 vaidmuo miRNR biogenezeje	56
1.2.3. Dicer baltymų šeima ir jai priklausanti <i>A. thaliana</i> DCL1 ribonukleazė.....	57
1.2.3.1. Dicer struktūra ir funkcinis mechanizmas.....	58
1.2.3.2. <i>A. thaliana</i> DCL1 vaidmuo miRNR biogenezeje.....	64
1.2.4. HEN1 ir jo homologai	65
1.2.4.1. <i>A. thaliana</i> HEN1 domenų funkcijos tyrimai.....	66
1.2.4.2. Vairenio HEN1 substratų metilinimas.....	71
1.2.4.3. HEN1 šeimos baltymų suskirstymas ir jų atliekamų modifikacijų svarba.....	73
MEDŽIAGOS IR METODAI	79
2.1. Medžiagos	79
2.1.1. Reagentai	79
2.1.2. Sistema, rinkiniai ir priemonės.....	80
2.1.3. Nukleorūgščių preparatai	80
2.1.4. Baltymų preparatai	84
2.1.5. Ląstelės.....	84
2.1.6. Mitybinės terpės ir joms skirti tirpalai	85

2.1.7. Tirpalai	87
2.1.8. Prietaisai	90
2.2. Metodai	91
2.2.1. Plazmidžių konstravimas.....	91
2.2.1.1. HEN1 ir jo mutantinių baltymų koduojančias sekas turinčių plazmidžių konstravimas	92
2.2.1.2. HYL1 ir jo domenų koduojančias sekas turinčių plazmidžių konstravimas.....	95
2.2.1.3. SERRATE, jo centrinės dalies SE-core ir DCL1 domenų koduojančias sekas turinčių plazmidžių konstravimas.....	95
2.2.2. <i>E. coli</i> imlių ląstelių transformacija	97
2.2.3. Bakterijų auginimas ir rekombinantinių baltymų sintezės indukcija	97
2.2.4. Rekombinantinių baltymų gryninimas	98
2.2.4.1. <i>E. coli</i> ląstelių biomasės paruošimas gryninimui	98
2.2.4.2. Šešių histidinių inkarų turinčių rekombinantinių baltymų gryninimas	98
2.2.4.3. Su glutationo S-transferaze (GST) sulietų rekombinantinių baltymų gryninimas	99
2.2.4.4. Išgrynintų rekombinantinių baltymų paruošimas ilgalaikiam saugojimui	99
2.2.5. Baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (NDS-PAAG).....	100
2.2.6. Baltymų poliakrilamido gelio dažymas.....	100
2.2.7. Baltymų koncentracijos nustatymas.....	101
2.2.8. Rekombinantinio baltymo kirpimas trombino proteaze.....	101
2.2.9. Radioaktyviu fosforu žymėtų viengrandinių, dvigrandinių RNR ir DNR substratų bei neradioaktyvaus miR173/miR173* duplekso paruošimas.....	101
2.2.10. Pilno ilgio HEN1 ir jo mutantinių baltymų pernešamų nuo tričiu žymėto kofaktoriaus AdoMet ant miR173/miR173* metilgrupei palyginimas.....	102
2.2.11. Pilno ilgio HEN1 ir jo mutantinių baltymų abiejų miR173/miR173* duplekso grandinių modifikacijos palyginimas.....	103
2.2.12. Metilintos miRNR/miRNR* duplekso grandinės nustatymas denatūruojančiame poliakrilamido gelyje atlikus IO ₄ ⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakciją	103
2.2.13. HEN1 ir jo mutantinių baltymų vykdomo miRNR/miRNR* duplekso individualių grandinių metilinimo greičio konstantų nustatymas esant fermento pertekliui.....	105
2.2.14. HEN1, jo mutantinių baltymų ir HYL1 sutrumpintų baltymų sąveikos su DNR, RNR tyrimas nukleorūgšties elektroforetinio judrumo pokyčio poliakrilamido gelyje metodu (EMSA-PAAG).....	107
2.2.15. HEN1, jo mutantinių ir HYL1 baltymų afiniškumo dvigrandinėms mažosioms nekoduojančioms RNR įvertinimas nukleorūgšties elektroforetinio judrumo pokyčio poliakrilamido gelyje metodu (EMSA-PAAG)	109
2.2.16. HYL1 ir HEN1 bei jo mutantinių baltymų dvinarių ir trinarių kompleksų stabilumo tyrimai nukleorūgšties elektroforetinio judrumo pokyčio poliakrilamido gelyje metodu (EMSA-PAAG).....	111
2.2.17. HEN1 ir HYL1 sąveikos tyrimas nukleorūgšties elektroforetinio judrumo pokyčio poliakrilamido gelyje metodu	115
2.2.18. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EGY48 ląstelių transformacija ir mielių kolonijų paruošimas analizei	116

2.2.19. Tarpbaltyminių sąveikų tyrimai „DupLex-A“ mielių dviejų hibridų sistema.....	117
2.2.20. Mielų ląstelių lizatų paruošimas.....	122
2.2.21. Glutationo S-transferazės (GST) ištraukimo metodas	122
2.2.22. Imunoblotas	125
REZULTATAI	127
3.1. HEN1 fermentinių savybių tyrimas	128
3.1.1. Mutantinių HEN1 baltymų aktyvumas modifikuojant nemetilintą substratą.....	128
3.1.2. HEN1 surišami substratai.....	130
3.1.3. Metiltransferazės HEN1 sąveikos su nemetilintais miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleksais tyrimas	132
3.1.4. HEN1 sąveikos su modifikuotais miRNR/miRNR* substratais tyrimas	133
3.1.5. Nemetilinto ir hemimetilinto miRNR/miRNR* duplekso individualių grandinių metilinimas.....	140
3.2. HEN1 R ¹ ir R ² domenų vaidmuo mnkRNR/mnkRNR* duplekso surišime ir metiliniame	145
3.2.1. HEN1 R ¹ domeno funkcinis tyrimas.....	146
3.2.2. R ¹ domeno antros dgRNR surišančios srities vaidmuo HEN1 katalizėje	151
3.2.3. HEN1 antro dgRNR surišančio domeno funkcinis tyrimas	157
3.3. HEN1 sąveikos su augalų miRNR biogenezėje dalyvaujančiais HYL1, SERRATE ir DCL1 baltymais tyrimas.....	162
3.3.1. HEN1 sąveikos su HYL1 tyrimas	164
3.3.2. HEN1 sąveikos su mikroprocesoriaus komplekso baltymais SERRATE ir DCL1 tyrimas.....	176
REZULTATŲ APTARIMAS.....	182
4.1. HEN1 sąveika su dgRNR substratais.....	183
4.2. HEN1 vykdomas miR173/miR173* duplekso individualių grandinių metilinimas.....	193
4.3. Tarpbaltyminės HEN1 sąveikos	195
IŠVADOS.....	201
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS.....	203
CURRICULUM VITAE.....	205
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	206
PRIEDAI.....	218
PADĖKA	226

SANTRUMPOS

AD	88 ar. <i>Escherichia coli</i> peptidas B42, kuris „DupLex-A“ mielių dviejų hibridų sistemoje su DSD sudaręs hibridinį transkripcijos veiksnį veikia kaip reporterinių genų transkripciją aktyvinantis domenas
AdoHcy	S-adenozil-L-homocisteinas
AdoMet	S-adenozil-L-metioninas
Ago	Argonaute šeimos baltymas; Ago pošeimio baltymas
APS	amonio persulfatas
ar.	aminorūgštis
Ars2	cinko pirštų motyvą turintis arsenito atsparumo baltymas 2
CBC	5' m7Gppp kepurę surišantis baltyminis kompleksas
CBP20, CBP80	CBC kompleksą sudarantys 20 kDa, 80 kDa dydžio 5' m7Gppp kepurę surišantys baltymai
CPL1	augalų fosfatazė C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 1
DCL	Dicer homologiška augalų ribonukleazė
Dcr	<i>Drosophila</i> Dicer ribonukleazė
DDL	su viengrandinėmis pri-miRNR, pre-miRNR dalimis sąveikaujantis baltymas DAWDLE
DEPC	dietilpirokarbonatas
DGCR8	stuburinių gyvūnų dgRNR surišantis baltymas
dgDNR	dvigrandinė deoksiribonukleorūgštis
dgRNR	dvigrandinė ribonukleorūgštis
DRB	augalų dgRNR surišančių DRB baltymų šeimos atstovas
DSD	prokariotinis LexA baltymas, kuris „DupLex-A“ mielių dviejų hibridų sistemoje su AD sudaręs hibridinį transkripcijos veiksnį veikia kaip DNR surišantis domenas
DTT	ditiotreitolis
DUF283	nežinomos funkcijos domenas 283
EDTA	etilendiamintetraacto rūgštis
Egzo-siRNR	egzogeninė siRNR
EMSA-PAAG	nukleorūgštis elektroforetinio judrumo pokytis poliakrilamido gelyje
Endo-siRNR	endogeninė siRNR
FK506	takrolimas, imunosupresorinis vaistas
Gal/+Leu	mielių agarizuota minimali galaktozinė terpė su Leu, neturinti Ura, His ir Trp
Gal/-Leu	mielių agarizuota minimali galaktozinė terpė, neturinti Leu bei Ura, His ir Trp
GSH	redukuotas glutationas
GST	glutationo S-transferazė
GW182	182 kDa glicino ir triptofano pasikartojimus turintis baltymas

HA	hemaglutininas, žmogaus gripo viruso apvalkalo baltymas
hc-siRNR	<i>Arabidopsis</i> heterochromatininė siRNR
HEN1	metiltransferazė HUA ENHANCER 1
HESO1	<i>Arabidopsis</i> nemetilintų mnkRNR ir iRNR 5' skėlimo produktų uridililtransferazė
Hsp90	šaperonas HEAT-SHOCK PROTEIN 90
HST	nuo RanGTP priklausantis nukleoplazminio transporto receptorių HASTY
HYL1	<i>Arabidopsis</i> dgRNR surišantis baltymas HYPONASTIC LEAVES 1, dar vadinamas DRB1
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas
ir-siRNR	<i>Arabidopsis</i> iš invertuoto pasikartojimo kilusi siRNR
JSA	jaučio serumo albuminas
L	La motyvą turintis HEN1 domenas
LB	Luria-Bertani
Loqs	<i>Drosophila</i> dgRNR surišančių Loquacious baltymų šeimos atstovas
M	HEN1 metiltransferazinis domenas
MID	Ago baltymo domeninėje struktūroje ties viduriu išsidėstantis domenas
miRISC	miRNR indukuotas genų raiškos slopinimo kompleksas
miRNR	mikroRNR; kreipiančioji miRNR/miRNR* duplekso grandinė
miRNR*	lydinčioji miRNR/miRNR* duplekso grandinė
mnkRNR	mažoji nekoduojanti ribonukleorūgštis
nat-siRNR	<i>Arabidopsis</i> iš natūralių antiprasminių transkriptų kilusi siRNR
NDS	natrio dodecilsulfatas
NDS-PAAG	baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis
NLS	branduolio lokalizacijos signalas
nt	nukleotidas
P	į peptidil-prolino <i>cis-trans</i> izomerazę panašus HEN1 domenas
PAAG	poliakrilamido gelis
PABP	prie iRNR poli(A) sekos prisijungiantis baltymas
PACT	nuo interferono priklausantis, dgRNR indukuojamas baltymų kinazės aktyvatorius; žinduolių dgRNR surišantis baltymas
PAZ	Piwi-Argonaute-Zwille domenas, pirmiausiai nustatytas Piwi, Argonaute, Zwille baltymuose
PGR	polimerazės grandininė reakcija
piRISC	piRNR indukuotas genų raiškos slopinimo kompleksas
piRNR	su Piwi baltymu sąveikaujanti RNR
Piwi	Ago baltymų pošeimis
PIWI	ribonukleazei H būdingą struktūrą turintis bei kai kuriuose Ago endonukleaziniu aktyvumu pasižymintis domenas

PMSF	fenilmetilsulfonilfluoridas
pre-miRNR	miRNR pirmtakas
pri-miRNR	pirminis miRNR transkriptas
R	dvigrandinę RNR surišantis domenas
R2D2	<i>Drosophila</i> siRNR/siRNR* dupleksą surišantis baltymas
RDR	<i>Arabidopsis</i> nuo RNR priklausanti RNR polimerazė
RISC	mažosios nekoduojančios RNR indukuotas genų raiškos slopinimo kompleksas
RLC	RISC pakraunantis kompleksas
RNazė III	III tipo ribonukleazių katalizinis domenas
SDN1	<i>Arabidopsis</i> viengrandinių miRNR 3'-5' egzozonukleazė
SE	cinko pirštų motyvą turintis augalų baltymas SERRATE
SE-core	struktūrizuotą, centrinę SE dalį apimantis baltymas
siRISC	siRNR indukuotas genų raiškos slopinimo kompleksas
siRNR	maža interferuojanti RNR
ta-siRNR	<i>Arabidopsis</i> „trans“ veikianti siRNR
TEMED	tetrametiletildiaminas
TGH	viengrandines pri-miRNR, pre-miRNR sritis surišantis baltymas TOUGH
TRBP	TAR ribonukleorūgštį surišantis baltymas; žinduolių dgRNR surišantis baltymas
URT1	<i>Arabidopsis</i> nemetilintų miRNR ir tam tikrų ta-siRNR uridililtransferazė
UTR	iRNR netransliuojama sritis
vgDNR	viengrandinė deoksiribonukleorūgštis
vgRNR	viengrandinė ribonukleorūgštis
HEN1-wt	rekombinantinė pilno ilgio HEN1 metiltransferazė
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozidas
XRN	5'-3' egzozonukleazių šeimos atstovas
YNB	vitaminų, mikroelementų ir druskų rinkinys minimaliai mielių terpei
YPD terpė	mielių turtinga mitybinė terpė

Tekste naudojamos aminorūgščių pavadinimų trijų raidžių santrumpos (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>).

ĮVADAS

Eukariotuose yra išskiriamos trys mažųjų nekoduojančių RNR (mnkRNR) klasės – tai miRNR, siRNR ir piRNR, kurios su Ago šeimos baltymais sudaro efektorinius, mnkRNR indukuotus genų raiškos slopinimo kompleksus RISC (angl. *RNA-induced silencing complex*) (Kim et al., 2014). Efektoriniame miRISC komplekse esančiai miRNR jungiantis su komplementaria iRNR sekos dalimi, prie jos pritraukiamas visas kompleksas, kurio Ago baltymas vykdo RNR taikinio kirpimą arba inicijuoja iRNR transliacijos slopinimą ar/ir suardymą. Žmogaus miRNR, kurios kontroliuoja daugiau nei 60 % baltymus koduojančių genų raišką, dalyvauja reguliuojant audinių ir organų diferenciaciją, lipidų metabolizmą, hormonų išskyrimą, imuninės sistemos funkcijas, apsisaugojimą nuo virusų ir kt. (Elton et Yalowich, 2015). Augaluose miRNR valdo organizmo vystymąsi, morfologiją, lytinę reprodukciją, atsaką į infekciją bei reakciją ir prisitaikymą prie pakitusių, stresą sukeliančių aplinkos sąlygų (Sun, 2012). Todėl nenuostabu, kad specifiniai miRNR profilio pokyčiai nustatomi aukštesniųjų eukariotinių organizmų organuose, audiniuose, skysčiuose esant stresinėms sąlygoms, infekcijoms ar susirgus (Valinezhad Orang et al., 2014).

Šiuo metu yra tobulinami būdai, kurie padėtų nustatyti įvairias ligas, įvertinus miRNR kiekybinius ir kokybinius pokyčius. Iš kitos pusės, yra kuriami inovatyvūs metodai, kurie leistų gydyti ligas ar užtikrintų augalų atsparumą biotiniams bei abiotiniams stresams pakeičiant specifinių endogeninių miRNR kiekį ir jų funkcijas (Li et al., 2014; Younis et al., 2014). Tačiau norint miRNR paremtas technologijas efektyviai pritaikyti biotechnologijoje ir biomedicinoje, būtina gerai suprasti miRNR brendimo kelio molekulinį mechanizmą: nustatyti biogenezėje dalyvaujančius baltymus, jų veikimo principus ir struktūriniuose domenuose „užkoduotas“ funkcijas bei apibūdinti kitus procesus, įtakojančius miRNR profilį. Nors šiuo metu yra

sukaupta daugybė žinių apie miRNR biogenezę, tačiau pilnas jos mechanizmas nėra iki galo išaiškintas.

Augalų ir gyvūnų miRNR biogenezėje išskiriamos dvi pagrindinės stadijos. Pirmoji, tai miRNR/miRNR* dupleksų iškirpimas iš pirmtakų (iš pri-miRNR, o po to iš pre-miRNR) vykdomas mikroprocesoriaus komplekso, kurį augaluose sudaro ribonukleazė DCL1 (angl. *Dicer-like protein 1*), cinko pirštų motyvą turintis SERRATE ir dgRNR surišantis HYL1 (angl. *Hyponastic leaves 1*) baltymai. Antrojoje stadijoje, dupleksui patekus į Ago baltymą, lydinčioji miRNR* grandinė pašalinama, o kreipiančioji miRNR grandinė išlieka ir formuojasi miRISC. Tik augalams būdinga tarpinė stadija – tai miRNR/miRNR* dupleksų 3' galinių nukleotidų metilinimas, katalizuojamas 2'-O-metiltransferazės HEN1, kuris apsaugo mnkRNR nuo papildomo 3' galo uridilinio ir/ar degradacijos (Bologna et Voinnet, 2014; Ha et Kim, 2014; Sanei et Chen, 2015). HEN1 šeimai priklausantys, konservatyvų metiltransferazinį domeną turintys baltymai yra randami ir gyvūnuose, grybuose, pirmuonyse, tačiau, priešingai nei miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleksus modifikuojančios augalų ir žaliadumblių metiltransferazės, jie metilina viengrandinius RNR substratus – piRNR ir siRNR molekules (Huang, 2012; Vilkaitis et al., 2010; Yang et al., 2006b; Yu et al., 2005). Išskirtinė augalų metiltransferazių savybė – daugiadomeninė struktūra. Remiantis aminorūgščių sekos analize ir tretine struktūra, šio darbo objekte – *Arabidopsis thaliana* HEN1 baltyme be metiltransferazinio domeno nustatyti keturi papildomi, gyvūnų HEN1 metiltransferazėms nebūdingi domenai. Tai nežinomos funkcijos, į peptidil-prolino *cis-trans* izomerazę panašus P domenas, du R¹ ir R² domenai, kuriuose randamos dgRNR surišančios sritys, bei tarp pastarųjų išsidėstęs La motyvą turintis L domenas (Huang et al., 2009; Tkaczuk et al., 2006). Nepaisant to, kad ši metiltransferazė yra tiriama įvairiose pasaulio laboratorijose, HEN1 biologinė reikšmė ir detalus veikimo mechanizmas nėra iki galo išaiškintas.

Šio darbo tikslas - ištirti *Arabidopsis thaliana* mažųjų nekoduojančių RNR metiltransferazės HEN1 veikimo mechanizmą, domenų funkcijas bei sąveiką su kitais augalų miRNR biogenezeje dalyvaujančiais baltymais.

Šiam tikslui įgyvendinti iškelti uždaviniai:

1. įvertinus HEN1 sąveiką su įvairiais RNR ir DNR substratais, nustatyti, ar metiltransferazė specifiskai rišasi su miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* klasės substratais;
2. palyginus pilno ilgio metiltransferazės ir sutrumpintų bei mutantinių HEN1 baltymų afiniškumą dvigrandinėms mažosioms nekoduojančioms RNR, nustatyti domenų, dalyvaujančius substrato surišime;
3. nustatyti nežinomos funkcijos HEN1 į peptidil-prolino *cis-trans* izomerazę panašaus domeno P vaidmenį;
4. nustatyti, ar HEN1 sudaro kompleksus su kitais *Arabidopsis thaliana* miRNR biogenezeje dalyvaujančiais baltymais dvigrandinę RNR surišančiu baltymu HYL1, cinko pirštų motyvą turinčiu SERRATE ir trečio tipo ribonukleaze DCL1 bei identifikuoti tarpbaltyminėse sąveikose dalyvaujančias baltymų sritis.

Mokslinis naujumas. Šiame darbe:

- ištirta mažųjų nekoduojančių RNR (mnkRNR) metiltransferazės HEN1 sąveika su viengrandiniais ir dvigrandiniais DNR bei RNR substratais ir nustatyta, kad metiltransferazės specifiskumas dvigrandinėms siRNR ir miRNR molekulėms yra nulemiamas substrato surišimo stadijoje, bei parodyta, kad *in vitro* fermentas panašiu stiprumu suriša pirmine ir antrine struktūra besiskiriančius miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* klasės substratus;
- atlikta detali HEN1 domenų funkcinė analizė, kuri parodė, kad fermento metiltransferazinis bei dvigrandinę RNR surišančios domenai R¹ ir R² dalyvauja dvigrandinio mnkRNR substrato surišime, o į peptidil-prolino *cis-trans* izomerazę panašus P, La motyvą turintis L ir R² domenai

sudaro kontaktus su mikroprocesoriaus komplekso dvigrandinę RNR surišančiu baltymu HYL1;

- nustatyta, kad HEN1 nesąveikauja su mikroprocesoriaus komplekso cinko pirštų motyvą turinčiu baltymu SERRATE, tačiau sudaro kontaktus su šio komplekso ribonukleazės DCL1 helikaziniu, Piwi-Argonaute-Zwille ir dvigrandinę RNR surišančiais domenais.
- pasiūlytas vėlyvosios *A. thaliana* miRNR brendimo stadijos modelis.

Darbo reikšmė. Šis darbas yra svarbus tiek teoriniu, tiek praktiniu požiūriu. Detaliai išanalizavus *A. thaliana* HEN1 domenų atliekamas funkcijas ir ištyrus fermento sąveiką su pradiniais (nemetilintais) substratais, tarpiniais (hemimetilintais) bei galutiniu (pilnai metilintu) reakcijos produktais, pasiūlytas HEN1•mnkRNR/mnkRNR* komplekso susidarymo modelis. Gauti rezultatai yra svarbūs ne tik *A. thaliana* HEN1, bet ir bendram augalų ir žaliadumblių ar net mažiau analizuotų gyvūnų mnkRNR metiltransferazių veikimo principo išaiškinimui. Be to, detalus HEN1 modifikavimo mechanizmo supratimas yra vertingas siekiant metiltransferazę panaudoti naujų miRNR ir siRNR analizės metodų, tokių kaip mTAG (angl. *methyltransferase-directed Transfer of Activated Groups*) technologija, sukūrimui, kurie biochemijos, nanodiagnostikos, biomedicinos specialistams padėtų įvaizdinti arba iš įvairių biologinių mišinių išgryninti mnkRNR molekules tolimesniems eksperimentiniams ar diagnostiniams tikslams. Nustačius HEN1 sąveikas su dviem iš trijų mikroprocesoriaus komplekso baltymų, dvigrandinę RNR surišančiu baltymu HYL1 ir ribonukleaze DCL1, bei išanalizavus tarpbaltyminėse sąveikose dalyvaujančias baltymų sritis, pasiūlytas vėlyvosios augalų miRNR brendimo stadijos modelis, kuris ne tik užpildo spragą miRNR biogenezeje, bet ir suteikia jai vientisumo.

LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. miRNR – mažosios nekoduojančios RNR, dalyvaujančios RNR nutildyme

1.1.1. Mažųjų nekoduojančių RNR atradimas

RNR molekulės galima suskirstyti į du tipus: iRNR ir nekoduojančias RNR (nkRNR, angl. *non-coding RNA*) (Santosh et al., 2015). Eukariotinės nkRNR pagal dydį yra skirstomos į: ilgąsias (>200 nt), vidutinio dydžio (~30-200 nt) ir mažąsias (~20-30 nt) (Hirose et al., 2014). Atsižvelgus į mažųjų nekoduojančių RNR (mnkRNR, angl. *small non-coding RNA*) ilgį, biogenezę ir efektorinį baltymą, su kuriuo sudaro kompleksą, yra išskiriamos trys jų klasės (1.1 pav.; 1.2 pav.) (Lucas et Raikhel, 2013; Patil et al., 2014):

- piRNR (angl. *Piwi-interacting RNA*) - su Ago šeimos Piwi pošeimio baltymais sąveikaujančios RNR;
- siRNR (angl. *small interfering RNA*) - mažos interferuojančios RNR;
- miRNR (angl. *microRNA*) - mikroRNR.

Mažųjų nekoduojančių RNR era prasidėjo 1993 m., kai kirmėlėse *Caenorhabditis elegans* buvo atrasta pirmoji miRNR lin-4 (Lee et al., 1993; Morris et Mattick, 2014). Tuo metu buvo nustatyta, kad *lin-4* koduoja 22 nt ilgio lin-4 RNR, kuri slopina *lin-14* iRNR translaciją prisijungus kelioms lin-4 molekulėms jos 3' netransliuojamoje srityje. Po penkių metų A. Fire ir C. C. Mello išaiškino mnkRNR veikimo principą (Fire et al., 1998). Jie parodė, kad į kirmėles *C. elegans* įvesta dgRNR efektyviai slopina geno-taikinio raišką, jei ji turi iRNR komplementarių sričių. Šį mechanizmą mokslininkai pavadino RNR interferencija (angl. *RNA interference*). Po metų parodyta, kad įvedus egzogeninę, dvigrandinę RNR susidaro ~25 nt ilgio RNR molekulės, kurios dalyvauja posttranskripciniame genų raiškos slopinime (Hamilton et Baulcombe, 1999). Šiuo metu RNR interferencija yra įvardijama kaip genų reguliavimo mechanizmas, kuris naudoja siRNR ir Ago šeimos baltymo

kompleksą šiai mnkRNR visiškai komplementarią sritį turinčio taikinio raiškos nutildymui (Zaratiegui, 2015). Mažosios RNR indukuotas RNR nutildymas - mechanizmas, kuris naudoja mnkRNR ir Ago šeimos kompleksą geno-taikinio raiškos slopinimui posttranskripciniame ar transkripciniame lygiuose (Kim et al., 2014). Todėl laikui bėgant RNR interferencijos ir RNR nutildymo sąvokos imtos plačiai naudoti kaip sinonimai (Svoboda, 2014). Viengrandinės mnkRNR ir Ago šeimos baltymo kompleksas vadinamas mažosios nekoduojančios RNR indukuotu genų raiškos slopinimo kompleksu (RISC; angl. *RNA-induced silencing complex*) (Wu et al., 2012). RISC kompleksų pagrindą sudarantys ir visose organizmų karalystėse sintetinami Argonaute (Ago) šeimos baltymai yra skirstomi į tris pošeimius - tai Ago, Piwi ir Wago. Pastarieji aptinkami išimtinai tik kirmėlėse (Czech et Hannon, 2011). Efektoriniuose kompleksuose esančios mažosios RNR jungiasi su RNR sekoje esančia komplementaria sritimi ir tokiu būdu pritraukia prie jos visą kompleksą, kuris sukelia taikinio koduojamo geno raiškos slopinimą transkripciniame ar posttranskripciniame lygiuose aktyvuojant heterochromatino susidarymą ar vykdant RNR-taikinio kirpimą, indukuojant jo transliacijos slopinimą, suardymą (Kim et al., 2014). Tokiu būdu mnkRNR dalyvauja įvairių biologinių procesų reguliavime.

1.1.2. Trijų mažųjų nekoduojančių RNR klasių apibūdinimas

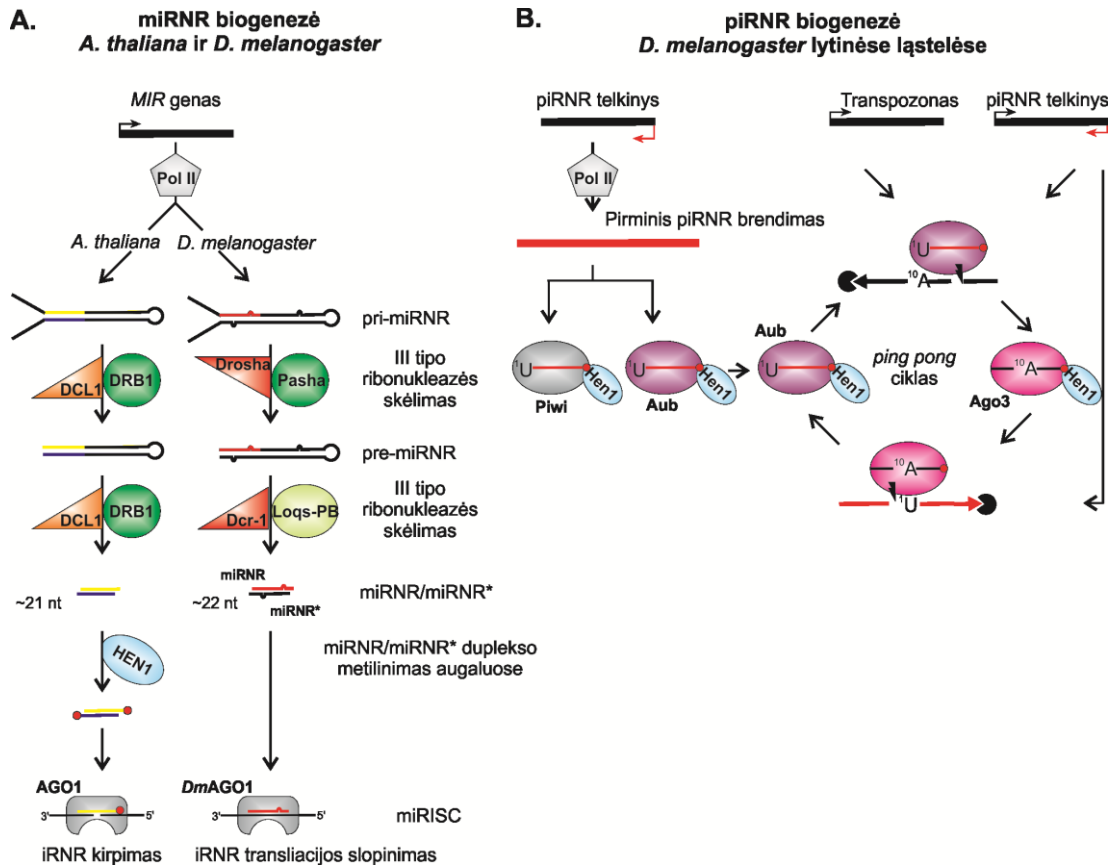
miRNR ir siRNR yra aptinkamos protistuose, augaluose ir gyvūnuose. Tuo tarpu grybuose identifikuojamos tik siRNR, o virusuose – tik miRNR. piRNR randamos gyvūnuose, daugiausiai jų lytinėse ląstelėse. Atsižvelgiant į kilmę siRNR gali būti skirstomos į egzogenines (egzo-siRNR) ir endogenines (endo-siRNR).

Arabidopsis thaliana ir *Drosophila melanogaster* egzo-siRNR susidaro iš linijinės arba plaukų segtuko formos dvigrandinės RNR (dgRNR), kurių šaltiniais gali būti: dgRNR ir (+) viengrandinių RNR virusų genomo sekos; viengrandinių RNR virusų replikacijos tarpiniai produktai; transgenų, dvigrandinės DNR (dgDNR) virusų RNR transkriptai bei kita dvigrandinė,

egzogeninė RNR (Bronkhorst et van Rij, 2014; Hirose et al., 2014; Pantaleo, 2011). Svarbiausia egzogeninių siRNR funkcija augaluose ir vabzdžiuose yra atsako prieš juos infekuojančius virusus užtikrinimas. Egzogeninės kilmės siRNR su Ago pošeimio baltymais formuoja siRNR indukuotus genų raiškos slopinimo kompleksus, siRISC. Jie, mnkRNR komplementariai jungiantis prie virusinių RNR ar iRNR komplementarių sričių, priartėja prie virusinės kilmės RNR molekulių ir vykdo jų kirpimą, rečiau, translacijos slopinimą, o augaluose dar inicijuoja ir viruso genomo citozinių metilinimą (Gammon et Mello, 2015; Mlotshwa et al., 2008; Pantaleo, 2011; Pooggin, 2013; Pumplin et Voinnet, 2013; Soares et al., 2014).

Žemiau detaliau aprašomos endogeninės kilmės mnkRNR klasės, atsižvelgiant į pagrindines jų biologinio kelio stadijas: mažųjų nekoduojančių RNR susidarymas iš jų pirmtakų, RISC, turinčio viengrandinę mnkRNR, susiformavimas ir pagrindinės jo atliekamos funkcijos.

miRNR. Augaluose ir gyvūnuose RNR polimerazei II nuskaitant *MIR* geną susidaro transkriptas, kuris formuoja plaukų segtuko formos antrinę struktūrą su viengrandiniais galais 3' ir 5' galuose (1.1 pav. A). Šis miRNR pirmtakas vadinamas pri-miRNR (angl. *primary-miRNA*). Jį atpažįsta ir skelia III tipo ribonukleazės ir dgRNR surišančio baltymo kompleksas Drosha•Pasha vaisinėse muselėse arba DCL1•DRB1 (angl. *Dicer-like protein 1; dsRNA-binding protein 1*) vaireniuose. Susidaro viengrandinių galų neturinti, plaukų segtuko formos pre-miRNR (angl. *precursor-miRNA*). Tuomet Dcr-1•Loqs-PB (angl. *Dicer-1; loquacious-PB*, viena iš trijų loquacious baltymo izoformų, detaliau žr. 1.2.2.1. skyrių) vaisinėse muselėse ar DCL1•DRB1 vaireniuose iš pre-miRNR iškerpa 21-23 nt ilgio miRNR/miRNR* dupleksus su 2 nt iškyšomis 3' galuose (Bologna et Voinnet, 2014; Gu et al., 2012; van Rij et Berezikov, 2009; Soares et al., 2014). Pažymėtina, kad daugelyje organizmų randami Dicer homologai, kurie dalyvauja skirtingų mnkRNR susidarymo keliuose. Pavyzdžiui, nors *D. melanogaster* aptinkami du Dicer baltymai, Dcr-1 ir Dcr-2 (angl. *Dicer-2*), o *A. thaliana* keturi DCL (DCL1, DCL2, DCL3, DCL4), tačiau Dcr-1 ir dažniausiai DCL1 dalyvauja miRNR brendime



1.1 pav. miRNR (A) ir piRNR (B) biogenezės mechanizmas (parengta pagal Bologna et Voinnet, 2014; Dueck et Meister, 2014; Luteijn et Ketting, 2013; Sato et Siomi, 2013). Pol II – RNR II polimerazė; Drosha – gyvūnų III tipo ribonukleazė skelianti pri-miRNR; DCL1 ir Dcr-1 – *A. thaliana* ir *D. melanogaster* Dicer šeimos III tipo ribonukleazės; DRB1 ir Pasha, Loqs-PB – su III tipo ribonukleazėmis sąveikaujantys *A. thaliana* ir *D. melanogaster* dgRNR surišantys baltymai; HEN1 – augalų mnkRNR metiltransferazė; Hen1 - Piwi pošeimio baltymų surištas piRNR modifikuojanti metiltransferazė vaisinėse muselėse; AGO1 ir *DmAGO1* – Ago šeimos, Ago pošeimio AGO1 vairyneje ir vaisinėse muselėse su miRNR sudarantys efektorinius kompleksus miRISC; miRNR ir miRNR* - augalų ir gyvūnų miRNR/miRNR* duplexų kreipiančioji ir lydinčioji grandinė; Piwi, Aub ir Ago3 – Ago šeimos Piwi pošeimio baltymai, sudarantys su priešprasminėmis ir prasminėmis piRNR efektorinius kompleksus piRISC; raudonas skrituliukas – metilgrupė.

(Bologna et Voinnet, 2014; Zhou et Rana, 2013). Vaisinėse muselėse susidarę miRNR/miRNR* kompleksai išlieka nmodifikuoti, tuo tarpu augaluose vyksta jų 3' galinių nukleotidų ribozijų 2'-O-metilimas, kurį vykdo HEN1 (angl. *HUA ENHANCER 1*) metiltransferazė.

Tuomet subrendę miRNR/miRNR* kompleksai sąveikauja su Ago pošeimio baltymu. Gyvūnuose ir augaluose yra aptinkama keletą Ago pošeimio baltymų. Žinduoliuose sintetunami keturi Ago baltymai, vaisinėse muselėse -

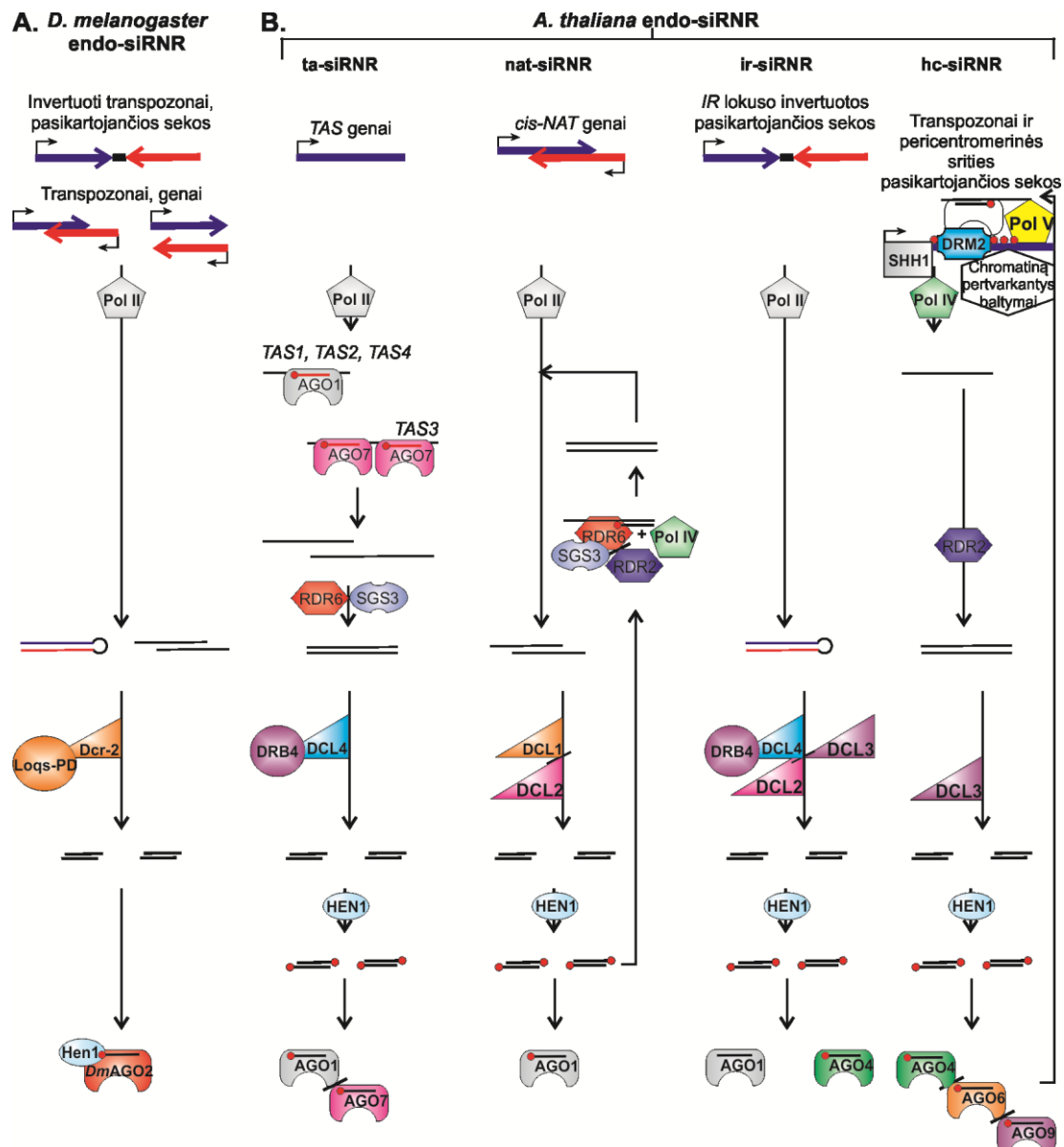
du, o vaireniuose – dešimt. *A. thaliana* ir *D. melanogaster* miRNR/miRNR* dupleksus dažniausiai atpažįsta AGO1 baltymai. Iš susidariusio Ago•miRNR/miRNR* komplekso viena iš duplekso grandinių vadinama lydinčiąją (žymima su žvaigždute – miRNR*, angl. *passenger strand*), yra pašalinama, o kita, kreipiančioji (žymima miRNR, angl. *guide strand*), išlieka ir su Ago baltymu sudaro miRNR indukuotą genų raiškos slopinimo kompleksą, miRISC (Bologna et Voinnet, 2014; Huang et al., 2013; Zhou et Rana, 2013).

miRISC kompleksų miRNR veikia kaip adaptorai, kuriems sąveikaujant su komplementariomis sritimis iRNR, efektoriniai kompleksai pritraukiami prie RNR molekulių. Gyvūnų miRISC dažniausiai inicijuoja iRNR translacijos slopinimą, suardymą, o augalų miRISC sudėtyje esantis endonukleaziniu aktyvumu pasižymintis Ago baltymas atlieka RNR taikinio kirpimą (Kim et al., 2014). Tokiu būdu miRISC vykdydami genų raiškos slopinimą posttranskripciniame lygyje valdo įvairius biologinius procesus (Asgari, 2013; Dong et al., 2013; Li et Zhang, 2016; Lucas et Raikhel, 2013):

- augaluose - vystymąsi; lytinę reprodukciją; reakciją ir prisitaikymą prie pakitusių, stresą sukeliančių aplinkos sąlygų;
- gyvūnuose - audinių ir organų vystymąsi; apsisaugojimą nuo virusų; lipidų metabolizmą; hormonų išskyrimą; imuninės sistemos funkcijas ir kt.

Endo-siRNR. Priešingai nei gyvūnuose, augaluose yra aptinkama keletą endo-siRNR rūšių. Pagal kilmę, biogenezę ir atliekamas funkcijas *A. thaliana* endo-siRNR yra skirstomos į (1.2 pav.): „*trans*“ veikiančias ta-siRNR (angl. *trans-acting siRNA*), iš natūralių antiprasminių transkriptų kilusias nat-siRNR (angl. *natural antisense siRNA*), iš invertuotų pasikartojimų susidariusias ir-siRNR (angl. *inverted repeat-derived siRNA*) bei heterochromatinines hc-siRNR (angl. *heterochromatic siRNA*) (Bologna et Voinnet, 2014; Katiyar-Agarwal et Jin, 2010; Zhang et al., 2012).

Augalų ir gyvūnų endo-siRNR pirmtakai yra ilgos linijinės arba plaukų segtuko formos dvigrandinės RNR, pasižyminčios visišku ar beveik visišku



1.2 pav. *Drosophila melanogaster* (A) ir *Arabidopsis thaliana* (B) endogeninių siRNR biogenezė (parengta pagal Bologna et Voinnet, 2014; Dueck et Meister, 2014; Katiyar-Agarwal et Jin, 2010; van Rij et Berezikov, 2009; Zhang et al., 2013; Zhou et Rana, 2013). Pol II – RNR II polimerazė; pol IV ir pol V – augalams specifinės RNR IV ir V polimerazės; DRM2 – *de novo* DNR metiltransferazė; AGO1, AGO4, AGO6, AGO7, AGO9 ir *DmAGO2* – *A. thaliana* ir *D. melanogaster* Ago šeimos, Ago pošeimio baltymai; RDR2, RDR6 – nuo RNR priklausančios RNR polimerazės, dalyvaujančios augalų siRNR biogenezėse; SGS3 – vgRNR stabilizuojantis veiksnys; DCL1, DCL2, DCL3, DCL4 ir Dcr-2 - *A. thaliana* ir *D. melanogaster* Dicer šeimos III tipo ribonukleazės; Loqs-PD, DRB4 - *D. melanogaster* ir *A. thaliana* dgRNR surišantys baltymai; HEN1 ir Hen1 – vairo ir vaisinės muselės mnkRNR metiltransferazės; raudonas skrituliukas – metilgrupė. Pastabos: nat-siRNR primtako viena iš grandinių sintetinama konstitutyviai, o kitos grandinės transkripcija yra indukuojama esant bakterinei infekcijai ar aplinkos, vystymosi ciklo pokyčiams; hc-siRNR kelio baltymas SHH1 (angl. *SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1*) jungiasi prie histono H3 ketvirtoje padėtyje esančio nemetilinto lizino ir prie devintoje padėtyje esančio metilinto lizino

(skaičiuojant nuo baltymo N-galo). Šios modifikacijos yra būdingos pasikartojančioms ir transpozonų sekoms, todėl RNR IV polimerazės sąveika su SHH1 sąlygoja heterochromatininių regionų, apimančių transpozonus koduojančias ir pasikartojančias sekas, transkripciją.

polinukleotidinių grandinių komplementarumu (1.2 pav.). Pirmojo pobūdžio pirmtakai susiformuoja sąveikaujant prasminių ir antiprasminių transpozonų (*D. melanogaster* endo-siRNR), genų (*D. melanogaster* endo-siRNR; nat-siRNR) transkriptams, nutranskribuotiems nuo to pačio ar skirtingų lokusų, persidengiančioms sritims, antrojo – invertuotų transpozonų (*D. melanogaster* endo-siRNR) ir kitų pasikartojančių sekų (*D. melanogaster* endo-siRNR; ir-siRNR) transkriptams sudarant antrines struktūras (Bologna et Voinnet, 2014; van Rij et Berezikov, 2009; Zhang et al., 2013). ta-siRNR ir hc-siRNR pirmtakai susidaro veikiant nuo RNR priklausančioms RNR polimerazėms (RDR; angl. *RNA-dependent RNA polymerase*), kurių genai nėra aptinkami vaisinėse muselėse ir žinduoliuose (Zhou et Rana, 2013). *A. thaliana* RDR2 ir RDR6 vykdo komplementarios grandinės sintezę nuo viengrandinės RNR 3' galinio nukleotido, susidarant ilgai dgRNR molekulei. Yra žinoma, kad RDR2, RDR6 antros grandinės sintezei kaip pradmenį gali panaudoti prie 3' galo prijungtą siRNR (žr. nat-siRNR biogenezę 1.2 pav. B). hc-siRNR biogenezėje RDR2 atpažįsta transpozonų, pasikartojančių sekų viengrandinius transkriptus susintetintus RNR IV polimerazės ir verčia juos į dvigrandines RNR molekules. Bręstant ta-siRNR, *TAS1*, *TAS2* transkriptai yra atpažįstami ir kerpami miR173•AGO1 efektorinio komplekso, *TAS4* – miR828•AGO1 komplekso, o *TAS3* transkriptai yra hidrolizuojami dviejų miR390•AGO7 kompleksų. Susidariusius produktus atpažįsta ir stabilizuoja SGS3 (angl. *SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3*) esantis komplekse su RDR6, kuri naudoja šiuos produktus kaip matricą komplementarios grandinės sintezei (Bologna et Voinnet, 2014; Pantaleo, 2011; Zhang et al., 2013).

Susiformalavusius endo-siRNR pirmtakus hidrolizuoja Dicer šeimos III tipo ribonukleazės, dažnai sudariusios kompleksą su dgRNR surišančiu baltymu (1.2 pav.). Vaisinėse muselėse Dcr-2 kompleksas su baltymu Loqs-PD

atpažįsta ir daugybę kartų kerpa ilgas dvigrandinės RNR molekules, susidarant 21 nt ilgio siRNR/siRNR* dupleksams. Vairenio ta-siRNR dupleksai susidaro DCL4•DRB4 kompleksui hidrolizuojant jų pirmtakus, tuo tarpu ir-siRNR dupleksai susiformuoja veikiant DCL4•DRB4 komplekso ribonukleazei ar DCL2, DCL3, nat-siRNR dupleksai – DCL1, DCL2 endonukleazėms, o hc-siRNR – DCL3. Mažosios nekoduojančios RNR ilgis priklauso nuo to, kuris iš keturių Dicer šeimos atstovų vykdo jo pirmtako kirpimą. Veikiant DCL4 ir DCL1, susidaro 21 nt ilgio mnkRNR, o DCL2 ir DCL3 atveju – 22 nt ir 24 nt ilgio siRNR (Axtell, 2013; Bologna et Voinnet, 2014; Cenik et Zamore, 2011; Cuperus et al., 2010; Dueck et Meister, 2014; Dunoyer et al., 2010; Liu et al., 2003; Wu et al., 2012). Po kirpimo visų rūšių augalų siRNR/siRNR* dupleksų 3' galinių nukleotidų ribozijų 2'-O atomai yra modifikuojami HEN1 metiltransferazės (Ji et Chen, 2012). Taip pat pažymėtina, kad 21 nt ir 22 nt nat-siRNR gali būti panaudojamos jų padauginimui veikiant RNR IV polimerazei ir RDR6•SGS3 kompleksui (Zhang et al., 2013).

Tuomet, po Ago pošeimio baltymo sąveikos su siRNR/siRNR* dupleksu, kai iš jo pašalinama viena RNR grandinė, susidaro siRISC (1.2 pav.). Vaisinėse muselėse siRISC kompleksai galutinai susiformuoja po *DmAGO2*[#] surištos viengrandinės siRNR metilinimo, kurį vykdo vairenio HEN1 homologas Hen1 (1.2 pav. A). Pažymėtina, kad vaireniuose siRNR/siRNR* dupleksų ilgis turi įtakos sąveikai su atitinkamu Ago pošeimio baltymu: DCL3 kirpimo produktai, 24 nt ilgio siRNR, sąveikauja su AGO4 arba AGO6, AGO9, o 21-22 nt ilgio mnkRNR/mnkRNR* dupleksai, susidarę veikiant DCL1, DCL2, DCL4•DRB4 – su likusiais Ago pošeimio baltymais (išskyrus AGO3 ir AGO8, kurie iki šiol nėra apibūdinti), iš kurių AGO1 yra dažniausias siRISC kompleksų komponentas.

[#]Kai kuriais atvejais norint pabrėžti baltymo kilmę prieš jį yra rašoma organizmo lotyniško pavadinimo santrumpa. *Dm* žymi, kad baltymas yra sintetinamas *Drosophila melanogaster*, *Mm* - *Mus musculus* ir *Hs* - *Homo sapiens*.

Vairenyje siRISC kompleksai dalyvauja posttranskripcinėje genų raiškos reguliacijoje, išskyrus efektorinius kompleksus, turinčius AGO4 arba AGO6, AGO9, kurie inicijuoja heterochromatino formavimąsi (1.2 pav. B). hc-siRNR dalyvauja transkripciniame genų raiškos nutildyme atpažįstant RNR V polimerazės sintetinamą transkriptą ir pritraukiant prie jo siRISC. Šis efektorinis kompleksas prijungia *de novo* DNR metiltransferazę DRM2 (angl. *domains rearranged 2*) su kitais chromatino pertvarkyme dalyvaujančiais baltymais, kuri metilina RNR V polimerazės transkribuojamą sritį. Iki šiol hc-siRNR biologinė funkcija nėra žinoma. Ryškus skirtingų šių mnkRNR kiekio padidėjimas ir sumažėjimas yra stebimas su lytine reprodukcija susijusiuose audiniuose ir ląstelėse (Axtell, 2013; Bologna et Voinnet, 2014). Tikslios ir-siRNR•AGO4 kompleksų funkcijos taip pat nėra žinomos, tačiau spėjama, kad jie yra svarbūs epigenetinių žymių palaikymui (Bologna et Voinnet, 2014; Dunoyer et al., 2010). Tuo tarpu yra nustatyta, kad vairo siRISC kompleksai, sudaryti iš AGO1 ir skirtingų siRNR, vykdydami mnkRNR komplementarių RNR taikinių kirpimą reguliuoja augalo vystymąsi (ta-siRNR, nat-siRNR), jų lytinę reprodukciją (nat-siRNR), padeda prisitaikyti prie pakitusių aplinkos pokyčių (nat-siRNR, ir-siRNR) bei prisideda prie greito atsako į patogeninių infekcijų susiformavimą (nat-siRNR) (Bologna et Voinnet, 2014; Dunoyer et al., 2010; Zhang et al., 2013). Vaisinėse muselėse endo-siRNR veikla siejama tik su posttranskripcine genų raiškos reguliacija. Tiksliau, endo-siRNR•*Dm*AGO2 kompleksai kirpdami RNR taikinius slopina judrųjų genomo elementų transpoziciją ir ląstelėms specifinių genų raišką (Czech et al., 2008; Ghildiyal et al., 2008; Zhou et Rana, 2013).

piRNR. miRNR ir siRNR biologiniuose keliuose dalyvauja Ago pošeimio baltymai, o piRNR - Piwi pošeimio baltymai. *D. melanogaster* - tai Piwi, Aub ir Ago3 (1.1 pav. B). Pažymėtina, kad vaisinių muselių lytinėse ląstelėse piRNR indukuoti genų raiškos slopinimo kompleksai piRISC susidaro Aub ir Ago3 sąveikaujant su 23-26 nt (daugiausiai su 24 nt) ilgio piRNR, o Piwi – su 23-30 nt (daugiausiai su 26 nt) ilgio piRNR (Gunawardane et al., 2007; Sato et Siomi, 2013).

piRNR brendimas apima du etapus (1.1 pav. B): pirminį ir antrinį. Pirminis brendimas prasideda RNR II polimerazei transkribuojant dažniausiai pericentromerinėse ir subtelomerinėse srityse išsidėsčiusius piRNR telkinius (angl. *piRNA clusters*), apimančius kartotines sekas su daugybe transpozonų. Nuskaitant priešprasmineje arba/ir prasminėje DNR grandinėse išsidėsčiusius piRNR telkinius, susidaro nuo kelių iki daugiau nei 200 kb ilgio viengrandiniai piRNR pirmtakai. Tokios linijinės formos viengrandinės RNR molekulės yra apdorojamos, susidarant pirminėms piRNR. Pirminio brendimo tikslus mechanizmas ir jame dalyvaujantys baltymai iki šiol nėra nustatyti, tačiau yra žinoma, kad pirminės priešprasmės piRNR, dažniausiai turinčios pirmą 5' galo nukleotidą uracilą, sudaro efektorinius kompleksus su Aub ir Piwi baltymais. Šių piRISC kompleksų piRNR 3' galai yra modifikuoti vairo HEN1 homologo Hen1 metiltransferazės, dar vadinamos Pimet (angl. *piRNA methyltransferase*). Efektoriniai kompleksai su Aub, bet ne su Piwi baltymu, inicijuoja antrinį brendimą, vadinamą *ping pong* ciklu (1.1 pav. B) (angl. *ping-pong cycle*) (Hirose et al., 2014; Sato et Siomi, 2013).

piRISC priešprasmė piRNR nukreipia Aub prie komplementaraus prasminio transpozono transkripto. Pastarajam Piwi pošeimio baltymui skeliant transpozono iRNR susiformuoja 3' kirpimo produktas turintis naujos, prasminės piRNR molekulės, turinčios dešimtoje padėtyje adeniną (skaičiuojant nuo 5' galo), 5' galą. Šį galą atpažįsta ir prisijungia Ago3 baltymas. Tuomet veikiant iki šiol nenustatyta 3'-5' egzonukleazei, susiformuoja subrendusi prasminė piRNR, kurios 3' galinis nukleotidas modifikuojamas Hen1 metiltransferazės. Toliau prasminė piRNR ir Ago3 kompleksas sąveikauja su priešprasmium transpozono transkriptu sukuriant 3' kirpimo produktą turintį naujos, priešprasmės piRNR, turinčios pirmoje padėtyje uracilą, 5' galą. Susidaro šio produkto ir Aub kompleksas. Nenustatyta 3'-5' egzonukleazei ir Pimet atlikus savas funkcijas, susiformuoja piRISC kompleksas, galintis atpažinti prasminio transpozono transkriptą ir ciklas kartojasi. Tokiu būdu vykstant *ping pong* ciklui yra ne tik padauginamos

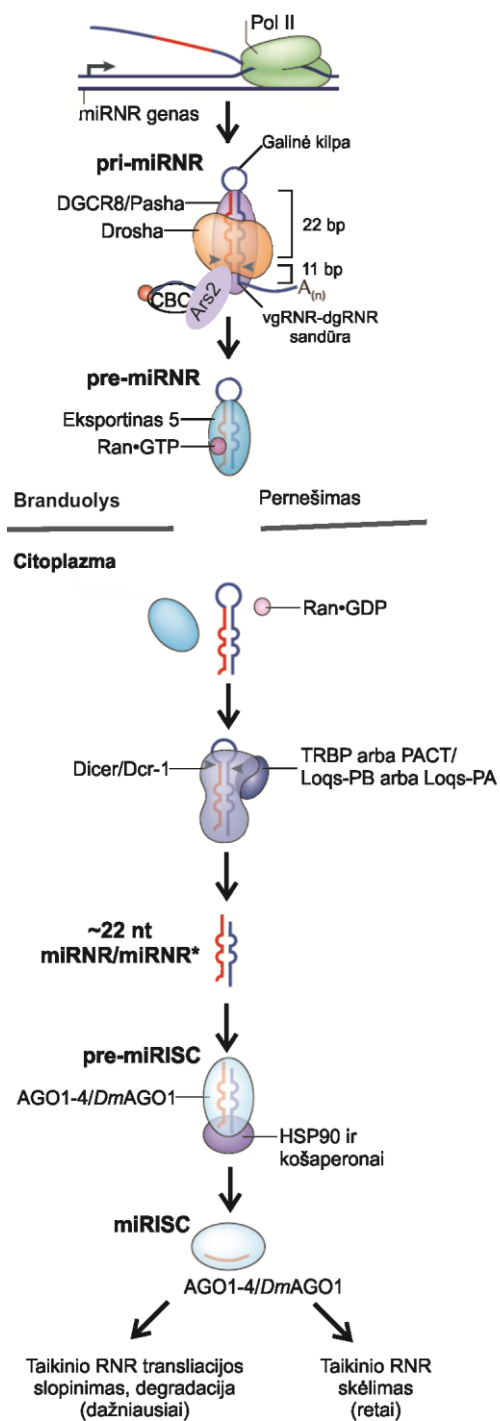
piRNR, bet ir skaldoma transpozonų RNR ir slopinama transpozicija (Han et Zamore, 2014; Sato et Siomi, 2013).

1.1.3. Kanoninių miRNR susidarymas gyvūnuose ir augaluose

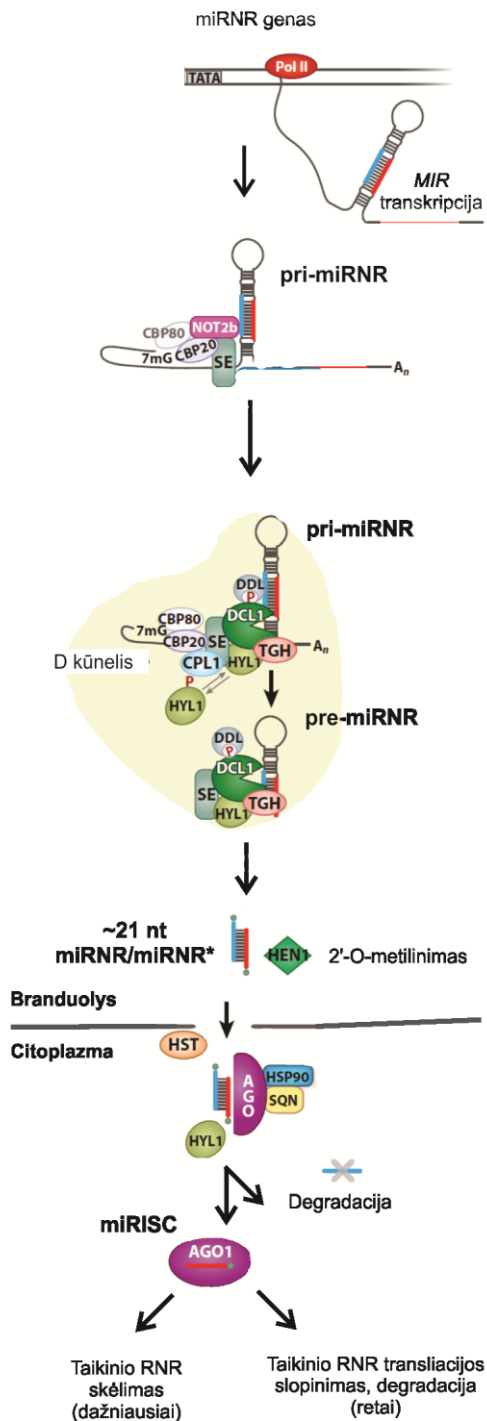
Šiuo metu, remiantis miRBase (<http://www.mirbase.org>; versija 21) duomenimis, identifikuota daugiau nei trisdešimt penki tūkstančiai augalų, gyvūnų, pirmuonių, virusų miRNR. Iš jų 2588 miRNR rastos *Homo sapiens*, 466 – *Drosophila melanogaster* ir 427 – *Arabidopsis thaliana*. Didžioji dalis gyvūnų ir augalų miRNR skiriasi savo seka, pirmtakų struktūra, jų brendimo kelio stadijų lokalizacija ir pan. Vis dėlto, pažymėtina, kad augalų ir gyvūnų miRNR biogenezės kelyje dalyvaujantys pagrindiniai baltymai yra homologiški (Axtell et al., 2011).

miRNR biogenezė gyvūnuose. Žinduoliuose apie 50 % miRNR koduojančių genų sudaro telkinius, koduojančius nuo 2 iki 7 miRNR, kurie nuskaitomi kaip policistroninis transkriptas. Keletas miRNR genų yra aptinkama RNR koduojančiose srityse, likusių *MIR* genų – baltymus koduojančiose srityse. Kiekvienu atveju ~ 40 % šių sričių yra išsidėstę intronuose ir ~ 10 % jų - egzonuose (Di Leva et al., 2014; Kim et al., 2009). Dažniausiai *MIR* genai yra nuskaitomi RNR II polimerazės, susidarant kelių kilobazių ilgio transkriptams pri-miRNR (angl. *primary miRNA*) su 3' poli(A) uodega ir 5' m7Gppp kepure, kurią suriša su arsenito atsparumo baltymu 2 (Ars2; angl. *Arsenite-resistance protein 2*; apie šį baltymą išsamiau žr. 1.2.1.1. skyriuje) sąveikaujantis baltyminis kompleksas CBC (angl. *cap-binding complex*) (1.3 pav. A). pri-miRNR formuoja plaukų segtuko formą atitinkančią struktūrą su 33-35 bp stiebu, galine kilpa ir ilgais, viengrandiniais galais 3' ir 5' galuose. Vėliau III tipo ribonukleazė Drosha komplekse su žmogaus dgRNR surišančiu baltymu DGCR8 (angl. *diGeorge syndrome critical region 8*) ar jo homologu vaisinėse muselėse Pasha nuo pri-miRNR atskelia ~60-70 nt ilgio plaukų segtuko formos pre-miRNR (angl. *precursor miRNA*) su 2 nt iškyša 3'

A. miRNR biogenezė gyvūnuose



B. miRNR biogenezė augaluose



1.3 pav. Gyvūnų (A) ir augalų (B) kanoninių miRNR biogenezės keliai (parengta pagal Bologna et Voinnet, 2014; Gruber et al., 2009; Ha et Kim, 2014; Moran et al., 2013; Sabin et al., 2009). Pol II – RNR II polimerazė; pri-miRNR – pirminė miRNR; pre-miRNR – miRNR pirmtakas; CBC – 5' m7Gppp kepurę surišantis kompleksas, sudarytas iš CBP20 ir CBP80 (angl. *cap-binding protein*); Ars2, SE – cinko pirštų motyvą turintys baltymai; Drosha – III tipo ribonukleazė kerpanči gyvūnų pri-miRNR; DGCR8, Pasha – su Drosha sąveikaujantys, dgRNR surišantys baltymai žinduoliuose ir vaisinėse muselėse; Eksportinas 5, HST – su Ran•GTP sąveikaujantys nukleoplazminio transporto receptoriai gyvūnuose ir augaluose; Dicer, Dcr-1 – pre-miRNR kerpančios III tipo ribonukleazės

žinduoliuose ir vaisinėse muselėse; TRBP, PACT ir Loqs-PB, Loqs-PA – su Dicer ir Dcr-1 sąveikaujantys dgRNR surišantys baltymai žinduoliuose ir vaisinėse muselėse; Hsp90 – šaperonas, padedantis Ago prisijungti miRNR/miRNR* dupleksą; FKBP5, FKBP4 (angl. *FK506-binding immunophilins 4, 5*) bei Hop, Droj2 (angl. *DnaJ-like-2*), p23 (angl. *Heat shock 23 polypeptide*) ir SQUINT (SQN) – Hsp90 košaperonai žinduoliuose bei vaisinėse muselėse ir augaluose, AGO1-4 – žinduolių Ago šeimos, Ago pošeimio baltymai; DmAGO1 – vaisinių muselių AGO1; miRISC – miRNR indukuotas genų raiškos slopinimo kompleksas; DCL1 – Dicer homologiška vairo III tipo ribonukleazė, skelianti pri-miRNR bei pre-miRNR; NOT2b – su CBC, SE ir DCL1 sąveikaujantis baltymas, kuris pritraukia ribonukleazę prie pri-miRNR; DDL – su DCL1 kompleksą sudarantis baltymas, padedantis ribonukleazei atpažinti ar pasiekti pri-miRNR; HYL1 – dgRNR surišantis baltymas; CPL1 – aktyvią, defosforilintą HYL1 baltymo formą užtikrinanti fosfatazė; TGH – su SE, HYL1 ir DCL1 sąveikaujantis ir viengrandines miRNR pirmtakų dalis surišantis baltymas, prisidedantis prie pri-miRNR•HYL1 susidarymo; HEN1 – augalų mnkRNR metiltransferazė.

gale. *In vitro* eksperimentais nustatyta, kad, kai DGCR8 homodimeras sąveikauja su viengrandinės RNR (vgRNR)-dgRNR sandūra ties stiebo apačia, tai Drosha pri-miRNR skelia ~11 bazių porų atstumu nuo šios vietos, o, kai DGCR8 homodimeras jungiasi su vgRNR-dgRNR sandūra ties galine kilpa, tai ribonukleazė pri-miRNR kerpa ~22 bazių porų atstumu nuo šios kilpos. Todėl šiuo metu manoma, kad dviejų DGCR8 homodimerų jungimasis su pri-miRNR vgRNR-dgRNR sritimis nustato tikslią Drosha skėlimo vietą 11 bazių porų atstumu nuo stiebo apačios ir 22 bazių porų atstumu nuo galinės kilpos (apie tai išsamiau sk. 1.2.2.1.).

Susidariusią pre-miRNR baltymas eksportinas 5 (EXP5; angl. *exportin 5*, koduojamas *XPO5*) kartu su branduolyje aptinkamu baltymu Ran•GTP, vykstant GTP hidrolizei, išneša iš branduolio (1.3 pav. A). Citoplazmoje kita III tipo ribonukleazė Dicer komplekse su dgRNR surišančiu baltymu TRBP (angl. *TAR RNA Binding Protein*) arba PACT (angl. *Protein ACTivator of the interferon-induced protein kinase*) iškerpa ~22 nt ilgio miRNR/miRNR* dupleksą, turintį dviejų nukleotidų iškyšas abiejuose 3' galuose. Vis dėlto, kadangi *Hs*TRBP sąveikauja su *Hs*PACT ir abu baltymai sudaro kontaktus su *Hs*Dicer helikaziniu domenu, neatmetama prielaida, kad pre-miRNR kirpimą vykdo trinaris *Hs*PACT•*Hs*TRBP•*Hs*Dicer kompleksas. Vaisinėse muselėse šį procesą atlieka viena iš Dicer ribonukleazių Dcr-1 komplekse su dvigrandinę

RNR surišančiu baltymu Loqs-PB arba Loqs-PA (angl. *loquacious-PB, -PA*). Nustatyta, kad dgRNR surišantys baltymai TRBP, PACT, Loqs-PA, Loqs-PB prisideda prie efektyvaus pre-miRNR kirpimo, padidindami Dicer šeimos ribonukleazės afiniškumą. Be to, TRBP ir Loqs-PB sumažina neteisingai iškerpamų tam tikrų miRNR/miRNR* dupleksų skaičių.

Susidaręs miRNR/miRNR* dupleksas sąveikauja su Ago pošeimio baltymu, iš kurio, pašalinus lydinčiąją grandinę miRNR*, susiformuoja subrendęs miRISC kompleksas (1.3 pav. A). *D. melanogaster* dažniausiai miRNR efektorinius kompleksus sudaro su *DmAGO1*, o siRNR – su *DmAGO2*. Tokį selektyvumą nulemia mnkRNR/mnkRNR* dupleksų struktūra ir jų biogenezėje dalyvaujantys dgRNR surišantys baltymai, sudarantys kompleksus su atitinkamu Dicer šeimos baltymu (apie tai išsamiau skyriuje 1.1.4.1.). Tuo tarpu žmogaus organizme Ago baltymų selektyvumas nėra stebimas. Aptinkami miRISC kompleksai, turintys visų keturių rūšių Ago pošeimio baltymus.

Visi gyvūnų miRNR turintys efektoriniai kompleksai, prisijungę prie taikinio RNR, gali inicijuoti taikinio RNR transliacijos slopinimą, degradaciją, tačiau tik miRISC, savo sudėtyje turintys AGO2 baltymą, gali kirpti iRNR (Ameres et Zamore, 2013; Dueck et Meister, 2014; Fukunaga et al., 2012; Gruber et al., 2009; Ha et Kim, 2014; Kim et al., 2014; Quick-Cleveland et al., 2014; Sabin et al., 2009).

miRNR biogenezė augaluose. Priešingai nei gyvūnuose, didžioji dalis augalų *MIR* genų yra aptinkami ne egzonuose ar intronuose, o tarpgeninėse srityse. Taip pat nors policistroninės pri-miRNR yra aptinkamos augaluose, tačiau dažniausiai stebimi tik vieną plaukų segtuko struktūrą sudarantys ir vieną miRNR koduojantys pirmtakai. Kaip ir gyvūnuose, *A. thaliana* *MIR* genai dažniausiai yra transkribuojami RNR II polimerazės (1.3 pav. B). *MIR* promotoriuose esančios TATA dėžutės ir *cis*-reguliaciniai elementai užtikrina priklausomą nuo laiko, erdvės ar sukkelto streso miRNR koduojančių genų transkripcijos reguliaciją *trans* veikiančiais veiksniais (Axtell et al., 2011; Budak et Akpınar, 2015).

Kaip ir gyvūnuose, *A. thaliana* išskiriamos dvi miRNR molekulių brandinimo stadijos (1.3 pav. B): iš pri-miRNR susidaro pre-miRNR, nuo kurios nuskėlus galinę kilpą gaunamas miRNR/miRNR* dupleksas. Tačiau augaluose abi stadijos vyksta branduolyje ir jose dalyvauja ta pati Dicer šeimos III tipo ribonukleazė DCL1, kuri sudaro baltyminių kompleksą su cinko pirštu motyvą turinčiu gyvūnų Ars2 homologu SERRATE (SE) ir dgRNR surišančiu baltymu DRB1, dar vadinamu HYL1 (angl. *Hyponastic leaves 1*). Šis kompleksas telkiasi branduolio D kūneliuose (angl. *Dicing-bodies*), kuriuose ir susidaro ne tik pre-miRNR, bet ir miRNR/miRNR* dupleksas. SE ir HYL1 baltymų svarba miRNR susidarymo kelyje atskleista *hyl1* ir *se* mutantuose nustačius sumažėjusį miRNR kiekį. Vėliau *in vitro* tyrimais parodyta, kad SE ir HYL1 padeda DCL1 efektyviai ir tiksliai skelti pri-miRNR. *In vivo* tyrimai patvirtino, kad HYL1, kuris, manoma, veikia kaip inkaras, matuojantis keliolikos bazių porų atstumą nuo pri-miRNR stiebo galo, užtikrina DCL1 skėlimo vietos pasirinkimą. Dažniausiai DCL1 skelia augalų pri-miRNR ~15 bp atstumu nuo stiebo apačioje esančios vgRNR-dgRNR sandūros ar vidinės kilpos. Susidariusioje pre-miRNR, kurių ilgis augaluose yra nuo 49 iki 900 nt, antrasis DCL1 skėlimas vyksta maždaug 21 bp atstumu nuo pirmojo, susiformuojant miRNR/miRNR* dupleksui. Taigi, pirmasis DCL1 vykdomas kirpimas yra kritinis, nes jis apsprendžia subrendusios miRNR seką, kuri užtikrina reikiamo geno nutildymą posttranskripciniame lygyje (Bologna et Voinnet, 2014; Dong et al., 2008; Fang et Spector, 2007; Yang et al., 2014).

Paskutiniaisiais metais buvo nustatyta daugybė pagalbinių augalų miRNR biogenezės kelyje dalyvaujančių baltymų (1.3 pav. B). Prie pri-miRNR 5' m7Gppp galo prisijungia CBC kompleksas (angl. *cap-binding complex*), sudarytas iš CBP80 (angl. *cap-binding protein, 80 kDa*) ir CBP20 (angl. *cap-binding protein, 20 kDa*) baltymų. Su abiem baltymais sąveikauja NOT2b, galintis sudaryti homodimerus arba heterodimerus su homologu NOT2a (angl. *At-Negative on TATA less2*). Manoma, kad NOT2b tarnauja platforma, leidžianti baltyminiam kompleksui susirinkti ties pri-miRNR. Šis baltymas sąveikauja su SE, kuris sudaro kontaktus su CBC kompleksu ir jungiasi prie

vgRNR-dgRNR sandūros pri-miRNR molekulėje. NOT2b jungiasi ir su ribonukleaze DCL1 bei pritraukia ją prie pri-miRNR. Viengrandinę RNR surišantis DAWDLE (DDL) yra dar vienas baltymas, kuris, manoma, padeda ribonukleazei atpažinti arba pasiekti pri-miRNR. Su SE ir DCL1 sąveikauja HYL1, o su visais trimis baltymais – TOUGH (TGH). Manoma, kad tai viengrandines miRNR pirmtakų sritis (kilpas ar nesuporuotus nukleotidus) surišantis baltymas, kuris prisideda prie pri-miRNR•HYL1 sąveikos susidarymo. Pažymėtina, kad su SE tiesiogiai sąveikaujanti fosfatazė CPL1 (angl. *C-terminal domain phosphatase-like 1*) defosforilina HYL1 ir tokiu būdu užtikrina aktyvią šio baltymo formą (Bologna et Voinnet, 2014; Manavella et al., 2012; Ren et al., 2012; Rogers et Chen, 2013; Wang et al., 2013a; Xie et al., 2015; Yu et al., 2008).

Susidariusį ~21 nt miRNR/miRNR* dupleksą, turintį 2 nt iškyšas abiejuose 3' galuose, atpažįsta HEN1 metiltransferazė (1.3 pav. B). Ji vykdo dvigrandinių miRNR 3' galinių nukleotidų ribozijų 2'-O-metilinimą ir tokiu būdu apsaugo jas nuo uridilinimo ir/ar 3'-5' degradacijos. Tikslī metilinimo vieta ląstelėje nėra žinoma, nes HEN1 yra aptinkamas tiek branduolyje, tiek citoplazmoje (Bologna et Voinnet, 2014; Borges et Martienssen, 2015).

Subrendusios, viengrandinės miRNR veikia citoplazmoje, tačiau iki šiol nėra žinomas nei miRNR/miRNR* dupleksų patekimo į citoplazmą mechanizmas, nei kurios miRNR brendimo stadijos metu jis vyksta. Nors augaluose yra aptiktas eksportino 5 homologas, su Ran•GTP sąveikaujantis nukleoplazminio transporto receptorius HASTY (HST) (1.3 pav. B), tačiau nustačius, kad *hst* mutantuose sutrinka tik kai kurių miRNR kaupimasis, manoma, kad jis atlieka antrąją jo homologui gyvūnuose būdingą funkciją – tam tikrų miRNR stabilumo užtikrinimą.

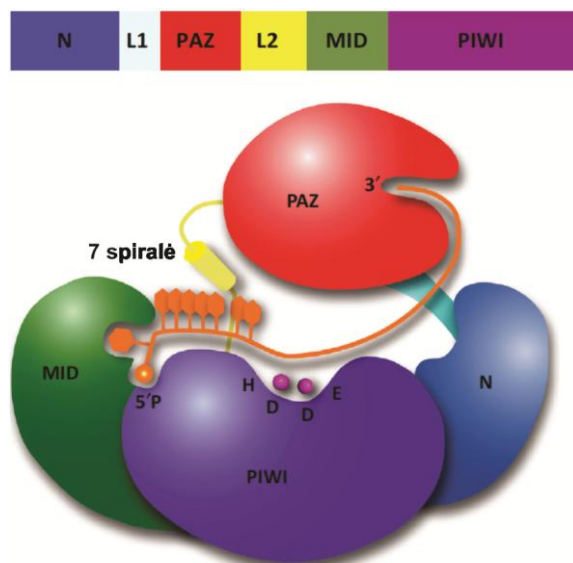
Tuomet miRNR/miRNR* sąveikaujant dažniausiai su AGO1 viena iš jos grandinių pašalinama, degraduojama, o kita išlieka ir su baltymu sudaro miRISC kompleksą (1.3 pav. B). Kadangi AGO1, kuris sąveikauja su HYL1, yra aptinkamas ir citoplazmoje, ir branduolyje, tiksli pastarojo proceso vieta ląstelėje nėra žinoma. Viengrandinei miRNR pritraukus miRISC efektorinį

kompleksą prie RNR taikinio, inicijuojamas jo kirpimas ar, retais atvejais augaluose, translacijos slopinimas, suardymas (Bologna et Voinnet, 2014; Fang et Spector, 2007; Liu et al., 2014; Rogers et Chen, 2013; Xie et Qi, 2008; Yang et al., 2014).

1.1.4. Iš Ago ir viengrandinės, kreipiančiosios miRNR grandinės sudaryto miRISC susiformavimas

miRNR indukuotas genų raiškos slopinimo, vadinamas efektoriniu, miRISC kompleksas susiformuoja, kai po sąveikos su Ago pošeimio baltymu iš miRNR/miRNR* duplekso pašalinama lydinčioji miRNR* grandinė (1.3 pav.). Augalų ir gyvūnų Ago pošeimio baltymus sudaro keturi domenai (1.4 pav.):

- N (angl. *N-terminal*) domenas, kuris formuojantis RISC dalyvauja mnkRNR/mnkRNR* duplekso polinukleotidinių grandinių atskyrimė, manoma, inicijuojant šį procesą įsispraudimu dvigrandinės mnkRNR gale;
- PAZ (angl. *Piwi-Argonaute-Zwille*), kuris sąveikauja su RISC komplekse išliekančios mnkRNR grandinės 3' galu bei yra reikalingas pre-RISC mnkRNR/mnkRNR* duplekso polinukleotidinių grandinių atskyrimui ardant vandenilinius ryšius tarp jų heterociklinių bazių, vykstant pasyviai lydinčiosios mnkRNR* grandinės pašalinimui;
- MID (angl. domain in the *middle* of the primary structure), kuris suriša RISC komplekse išliekančios mnkRNR grandinės 5' galinio nukleotido heterociklinę bazę bei 5'-fosfatą;
- PIWI (angl. *P-element induced wimpy testis*), kuris suriša RISC komplekse išliekančios mnkRNR grandinės 5'-fosfatą, turi ribonukleazei H būdingą struktūrą bei kai kuriuose Ago baltymuose pasižymi endonukleaziniu aktyvumu.

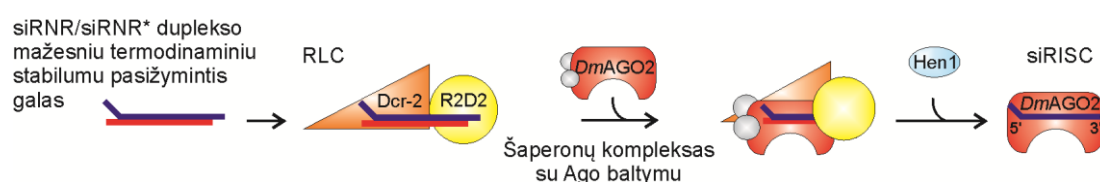


1.4 pav. Eukariotų Ago baltymų domeninė organizacija (viršuje) ir Ago sąveikos su kreipiančiąja mnkRNR grandine schema (apačioje) (Kuhn et Joshua-Tor, 2013). Kreipiančiosios grandinės 5' galinio nukleotido fosfatas išsidėsto tarp ir yra surišami MID ir PIWI domenų, o heterociklinė bazė sąveikauja su MID domene esančia „nukleotidui specifine“ kilpa. „Grūdo“ sekos (kreipiančiosios grandinės 2-7 nt ar 2-8 nt) bazės PIWI domeno orientuojamos taip, kad gali sąveikauti su taikinio RNR. Antrojo jungtuko (L2) 7-oji spiralė (pažymėta geltonai) tarnauja „kamščiu“, apsaugančiu nuo atsitiktinės, netikslios mnkRNR ir RNR taikinio hibridizacijos. Aktyvus Ago centras yra sudarytas iš katalitinės tetrados (D, E, D ir H), kuri vykdo nuo Mg^{2+} jonų (pažymėti violetiniais rutuliukais) priklausomą taikinio RNR kirpimą. Kreipiančiosios grandinės 3' galinio nukleotido surišimas PAZ domene nėra bazei specifinis: jo fosforilgrupė sudaro vandenilinius ryšius su PAZ domeno histidiniais ir tirozinu. L1, L2 – pirmasis, antrasis, atitinkamus Ago baltymo domenų sujungiantys, aminorūgščių jungtukai.

Efektorinio komplekso susidarymas apima dvi stadijas. Pirmoji, dalyvaujant šaperonų kompleksui, apibūdinama kaip Ago jungimasis su mnkRNR/mnkRNR* dupleksu, kurį dažniausiai pristato Dicer ir dgRNR surišančio baltymo kompleksas. Pažymėtina, kad kuri iš dviejų mnkRNR/mnkRNR* dupleksų grandinių išliks efektoriniame komplekse, yra nustatoma prieš ar šios stadijos metu. Antroji stadija - tai Ago baltyme esančio mnkRNR/mnkRNR* duplekso grandinių atskyrimas ir lydinčiosios grandinės pašalinimas (Ha et Kim, 2014; Kawamata et Tomari, 2010; Stroynowska-Czerwinska et al., 2014).

1.1.4.1. Selektivi mnkRNR/mnkRNR* duplekso sąveika su Ago

Formuojantis RISC *D. melanogaster*, miRNR/miRNR* dupleksai sąveikauja su *DmAGO1*, o siRNR/siRNR* dupleksai – su *DmAGO2* (1.1 pav.; 1.2 pav.; 1.5 pav.). Manoma, kad tokį selektyvumą lemia mnkRNR/mnkRNR* duplesų struktūra (sudaryti iš visiškai komplementarių grandinių ar turintys nekomplementarias bazių poras, nesuporuotų nukleotidų iškyšas) ir jų biogenezėje dalyvaujantys dgRNR surišantys baltymai, sudarantys kompleksus su atitinkamu Dicer šeimos baltymu. Dažniausiai, jei mnkRNR/mnkRNR* dupleksas turi nesuporuotus kreipiančiosios grandinės 8-11 nukleotidus, tai jis atpažįstamas *DmAGO1*. Vaisinėse muselėse ribonukleazė Dcr-2 ir dgRNR surišantis baltymas R2D2 (pavadintas R2D2, nes turi du dgRNR surišančius domenus (R2) ir sąveikauja su Dcr-2 (D2)) sudaro RISC pakraunantį kompleksą (RLC; angl. *RISC-loading complex*), kuris pasižymi dideliu afiniškumu iš pilnai komplementarių grandinių sudarytiems siRNR/siRNR* dupleksams bei užtikrina jų perkėlimą į *DmAGO2* (1.5 pav.) (Dueck et Meister, 2014; Ha et Kim, 2014; Kawamata et Tomari, 2010; Tomari et al., 2007). Žmogaus organizme Ago baltymų selektyvumas nėra stebimas. Visi keturi Ago pošeimio baltymai sąveikauja su miRNR/miRNR* dupleksais (1.3 pav. A).



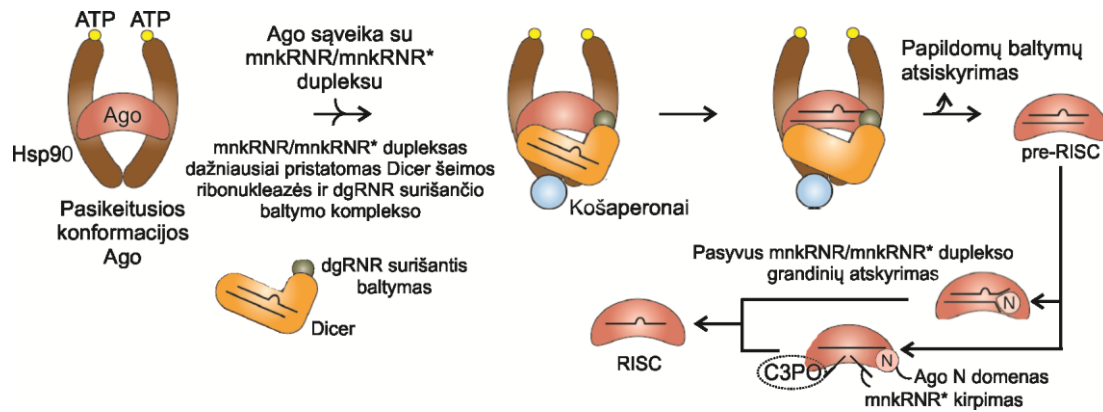
1.5 pav. siRNR grandinės pasirinkimas įjungimui į *D. melanogaster* siRISC (parengta pagal Bronkhorst et van Rij, 2014; Tomari et al., 2007; Zhou et Rana, 2013). RLC - RISC pakraunantis kompleksas; Dcr-2 – Dicer šeimos III tipo ribonukleazė; R2D2 – dgRNR surišantis baltymas; *DmAGO2* – Ago šeimos, Ago pošeimio baltymas; Hen1 – vairo HEN1 homologas, kuris metilina *DmAGO2* surištą viengrandinę mnkRNR; siRISC – siRNR indukuotas genų raiškos slopinimo kompleksas.

A. thaliana mnkRNR ilgis turi įtakos su kuriuo iš dešimties Ago pošeimio baltymų sąveikaus mnkRNR/mnkRNR* dupleksas. Specifinių DCL baltymų iškirpti mnkRNR/mnkRNR* dupleksai sudaro RISC kompleksus su

atitinkamais Ago baltymais: AGO4, AGO6, AGO9 sąveikauja su DCL3 produktu 24 nt siRNR/siRNR* (1.2 pav.), o AGO1, AGO2, AGO5, AGO7 ir AGO10 – DCL1, DCL2, DCL4 produktais 21-22 nt ilgio mnkRNR/mnkRNR* dupleksais. Pažymėtina, kad didžioji dalis augalų miRNR/miRNR*, iškerpamų veikiant DCL1, sudaro miRISC kompleksus su AGO1 (1.3 pav. B), kuris aptinkamas ir citoplazmoje, ir branduolio D kūneliuose kartu su kitais miRNR susidaryme dalyvaujančiais baltymais. Taigi, tikėtina, kad augalų ląstelių branduoliuose vyksta ne tik miRNR brendimas, bet ir efektorinių miRISC kompleksų susidarymas (Bologna et Voinnet, 2014; Fang et Spector, 2007; Rogers et Chen, 2013).

1.1.4.2. Ago ir miRNR/miRNR* duplekso sąveika

Ago prisijungti miRNR/miRNR* dupleksą padeda šaperonas Hsp90 (angl. *HEAT-SHOCK PROTEIN 90*) ir jo košaperonai (1.3 pav., 1.6 pav.). Augaluose ir gyvūnuose šis procesas yra priklausomas nuo ATP. Manoma, kad šaperonų kompleksas keičia Ago baltymo konformaciją, kuri yra palanki prisijungti mnkRNR/mnkRNR* dupleksą, pristatytą Dicer šeimos ribonukleazės ir dgRNR surišančio baltymo komplekso (1.6 pav.). Vaisinėse muselėse parodyta, kad *DmAGO2* kompleksas su šaperonais kur kas stipriau sąveikauja su Dcr-2•R2D2 kompleksu nei vienas *DmAGO2* (1.5 pav.). Susidarancio komplekso stabilumo pakanka, kad Ago baltymo PIWI domenas (1.4 pav.) spėtų prisijungti siRNR/siRNR* duplekso kreipiančiosios grandinės 5' nukleotido fosforilgrupę. Pastaroji sąveiką inicijuoja mnkRNR/mnkRNR* duplekso persikėlimą į Ago, susidarant didesniame kiekiui kontaktų su kreipiančiąja grandine (1.6 pav.). Ago prisijungiant mnkRNR/mnkRNR* dupleksą atsiskiria papildomi baltymai ir susiformuoja pre-RISC kompleksas, kuriame vyksta lydinčiosios grandinės pašalinimas (Dueck et Meister, 2014; Iwasaki et al., 2015; Kobayashi et Tomari, 2016; Rogers et Chen, 2013).



1.6 pav. Mažosios nekoduojančios RNR indukuoto genų raiškos slopinimo komplekso susidarymo schema (parengta pagal Dueck et Meister, 2014; Kobayashi et Tomari, 2016). Ago – Ago šeimos, Ago pošeimio baltymai; Hsp90 – šaperonas, sudarantis su košaperonais kompleksą, moduliuojantį Ago baltymo konformaciją; C3PO – tik gyvūnų AGO2 kirptų mnkRNR/mnkRNR* dupleksų lydinčiųjų mnkRNR* grandinių pašalinimą vykdomantis endoribonukleazinis kompleksas; RISC – mnkRNR indukuotas genų raiškos slopinimo kompleksas; pre-RISC – nesubrendęs RISC, sudarytas iš Ago ir mnkRNR/mnkRNR* duplekso.

1.1.4.3. miRNR/miRNR* duplekso lydinčiosios miRNR* grandinės iš pre-miRISC pašalinimas

Subrendęs miRISC susiformuoja iš pre-miRISC komplekso miRNR/miRNR* duplekso pašalinus lydinčiąją miRNR* grandinę.

Lydinčiosios grandinės pašalinimas skeliant. Gyvūnuose nustatyta, kad iš pre-RISC, turinčio endonukleaziniu aktyvumu pasižymintį AGO2, lydinčioji grandinė gali būti pašalinta baltymui ją kerpant (1.6 pav.) ties kreipiančiosios grandinės 10-11 nt. Kirpimas mažina mnkRNR/mnkRNR* duplekso stabilumą ir skatina lydinčiosios grandinės suardymą, kuri vykdo prie kirptos grandinės prisijungiantis C3PO kompleksas. Šie žinduoliuose ir muselėse aptikti ribonukleaziniu aktyvumu pasižymintys daugiabaltyminiai kompleksai yra sudaryti iš translinų (angl. *translin*) ir su jais sąveikaujančių X baltymų (Trax; angl. *translin-associated protein X*) (Betancur et al., 2012; Ha et Kim, 2014).

Pasyvus lydinčiosios grandinės pašalinimas. Dažniausiai gyvūnų miRNR/miRNR* dupleksai formuoja nekomplementarias bazių poras ties

kreipiančios grandinės 8-11 nt, todėl paprastai iš pre-miRISC lydinčioji miRNR* grandinė pašalinama vykstant pasyviai miRNR/miRNR* duplekso grandinių atskyrimui (1.6 pav.). Šiuo keliu viena iš mnkRNR/mnkRNR* duplekso grandinių šalinima ir iš pre-RISC, kurie turi endonukleaziniu aktyvumu nepasižymintį Ago baltymą. Nustatyta, kad šis grandinių atskyrimo procesas vyksta kur kas efektyviau, jei miRNR/miRNR* dupleksai turi nekomplementarias bazių poras ties kreipiančiosios grandinės 2-7 nt ar 2-8 nt („grūdo“ seka) ir/ar 13-16 nt. Tikslus pasyvaus mnkRNR/mnkRNR* grandinių atskyrimo mechanizmas nėra žinomas, tačiau parodyta, kad šiame procese svarbų vaidmenį atlieka Ago N ir PAZ domenai (1.4 pav.) (Betancur et al., 2012; Ha et Kim, 2014; Kwak et Tomari, 2012). Pažymėtina, kad po pasyvaus atskyrimo, pašalinta grandinė greitai degraduojama (Czech et Hannon, 2011).

Nors *A. thaliana* AGO1, AGO2, AGO4, AGO7, AGO10 pasižymi endonukleaziniu aktyvumu, tačiau *in vitro* ir *in vivo* tyrimais parodyta, kad bent AGO1 atveju šis aktyvumas nėra reikalingas lydinčiosios grandinės pašalinimui iš pre-miRISC. Šiame komplekse miRNR/miRNR* duplekso grandinės atskiriamos vykstant pasyviai jų išvyniojimui (Carbonell et al., 2012; Iki et al., 2010; Rogers et Chen, 2013).

D. melanogaster siRISC kompleksai galutinai susiformuoja įvykus *DmAGO2* surištos viengrandinės siRNR metilinimui, kurį katalizuoja Hen1 metiltransferazė (1.2 pav.). Nors dažniausiai vaisinių muselių miRISC formuoja *DmAGO1* (1.1 pav., 1.3 pav.), pažymėtina, kad yra aptikta miRISC, sudarytų iš *DmAGO2* ir metilintos miRNR grandinės (Abe et al., 2014).

1.1.5. miRNR/miRNR* duplekso kreipiančiosios grandinės pasirinkimo principai

Nuo to, kuri iš miRNR/miRNR* duplekso grandinių išlieka miRISC, priklauso efektorinio komplekso specifiškumas: kurio geno raiška bus nuslopinta. Tai svarbus RNR interferencijos etapas, kurio tikslus mechanizmas iki šiol nėra aiškus. Šiuo metu išskiriami du pagrindiniai kreipiančiosios grandinės pasirinkimo principai: mnkRNR/mnkRNR* duplekso galų termodinaminis

stabilumas ir 5' galinio nukleotido prigimtis. Žemiau *D. melanogaster* pagrindu pateiktas detalesnis šių principų aprašas.

Drosophila melanogaster

mnkRNR/mnkRNR* duplekso galų termodinaminis stabilumas. Vaisinėse muselėse dažniausiai siRISC komplekse išlieka ta siRNR/siRNR* duplekso grandinė, kurios 5' galas sudaro silpnesnes sąveikas su komplementarios grandinės 3' galu, t.y., pasižymi mažesniu termodinaminiu stabilumu (1.5 pav.). siRNR/siRNR* duplekso galų termodinaminį stabilumą įvertina RLC, sudarytas iš Dicer šeimos ribonukleazės Dcr-2 ir dgRNR surišančio baltymo R2D2. Pastarasis baltymas sąveikauja su didesniu termodinaminiu stabilumu pasižyminčio siRNR/siRNR* duplekso lydinčiosios grandinės 5' galu, o ribonukleazė Dcr-2 rišasi prie duplekso mažesnio termodinaminio stabilumo pusėje esančio kreipiančiosios grandinės 5' galo. Kryptingas Dcr-2 ir R2D2 siRNR/siRNR* duplekso surišimas sąlygoja, kad RLC perduoda siRNR/siRNR* dupleksą *DmAGO2* orientacija, užtikrinančia lydinčiosios grandinės kirpimą ir kreipiančiosios grandinės išlikimą. Į siRNR biogenezės (1.2 pav.; 1.5 pav.) RLC panašus kompleksas, sudarytas iš Dicer šeimos ribonukleazės Dcr-1 ir dgRNR surišančio baltymo Loqs-PB (1.1 pav.; 1.3 pav.), yra randamas miRNR susidarymo kelyje. Nors iki šiol moksliniais tyrimais nėra parodyta, kad Dcr-1•Loqs-PB kompleksas lemia į *DmAGO1* perkeliama miRNR/miRNR* duplekso orientaciją, tačiau neatmetama prielaida, kad jis atlieka RLC funkciją (Czech et Hannon, 2011; Dueck et Meister, 2014; Ha et Kim, 2014).

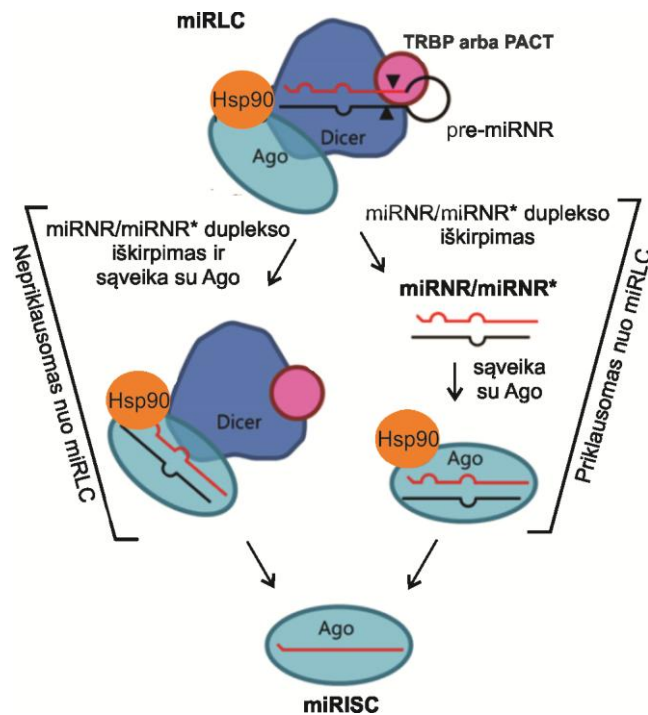
5' galinio nukleotido prigimtis. *D. melanogaster* nustatyta, kad dažniausiai miRISC kompleksai yra sudaryti iš *DmAGO1* ir viengrandinės miRNR, kurios 5' galinis nukleotidas yra uracilas, o siRISC – iš *DmAGO2* ir viengrandinės siRNR, kurios 5' galinis nukleotidas yra citozinas. Kreipiančiosios grandinės 5' galinio nukleotido „tapatybė“ yra dar vienas principas, turintis įtakos, kuri iš mnkRNR/mnkRNR* duplekso grandinių išliks

RISC komplekse (Czech et Hannon, 2011; Dueck et Meister, 2014; Ha et Kim, 2014).

Žinduoliai

mnkRNR/mnkRNR* duplekso galų termodinaminis stabilumas. Žinant, kad *H. sapiens* bei *Mus musculus*, kaip ir vaisinėse muselėse, miRNR/miRNR* ar siRNR/siRNR* dupleksų galų termodinaminis stabilumas veikia RISC komplekse išliekančios grandinės pasirinkimą, bandyta surasti panašų į vaisinių muselių RLC kompleksą (Khvorova et al., 2003; Noland et Doudna, 2013; Schwarz et al., 2003). Iš žmogaus ląstelių buvo išskirtas *HsDicer•HsTRBP•HsAGO2* kompleksas (1.7 pav.) (Gregory et al., 2005; Liu et al., 2012; Maniataki et Mourelatos, 2005). Didžioji dalis šių kompleksų surišusi pre-miRNR, mažesnė – subrendusius miRNR/miRNR* dupleksus. Izotopinio pakeitimo eksperimentais parodyta, kad šis kompleksas paverčiamas į miRISC, sudarytą iš viengrandinės miRNR ir *HsAGO2* (Kim et Kim, 2012; Liu et al., 2012). Nustačius, kad vienas *HsDicer* pasižymi mažu afiniškumu dvigrandinėms mnkRNR, vienas *HsTRBP* sąveikauja su bet kuriuo mnkRNR/mnkRNR* dupleksų galu, o tik *HsDicer•HsTRBP* ar *HsDicer•HsPACT* kompleksų ribonukleazės suriša dupleksų mažesniu termodinaminiu stabilumu pasižyminčius galus, parodyta, kad pastarieji kompleksai veikia panašiai kaip muselių Dcr-2•R2D2 kompleksas. Remiantis šiais duomenimis, pasiūlytas nuo RLC priklausomas žmogaus miRISC susidarymo modelis (1.7 pav. kairėje): *HsDicer•HsTRBP* arba *HsDicer•HsPACT* ne tik skelia pre-miRNR, bet ir užtikrina miRNR/miRNR* duplekso perkėlimą į Ago kreipiančiosios grandinės išlikimui miRISC palankia orientacija (Kim et Kim, 2012; Noland et al., 2011). *In vivo* tyrimais patvirtinta, kad žmogaus ląstelėse egzistuoja funkcionalus RLC, tačiau kartu parodyta, kad *HsDicer•HsTRBP* ir *HsDicer•HsPACT* kompleksai neturi įtakos kai kurių miRNR/miRNR* dupleksų, sąveikaujančių su *HsAGO2*, kreipiančiosios grandinės pasirinkimui (Wilson et al., 2015). Taigi, šiuo metu yra pasiūlytas ir alternatyvus, nuo *HsDicer* ir dgRNR surišančio baltymo

nepriklausomas žmogaus miRISC susidarymo kelias (1.7 pav. dešinėje), pagal kurį vieno Ago užtenka teisingam, RISC komplekse išliekančios miRNR/miRNR* duplekso grandinės pasirinkimui. Šio kelio egzistavimo žinduolių ląstelėse prielaidą sustiprina rezultatai, rodantys, kad siRNR/siRNR* dupleksais transfekuotose pelės embrioninėse ląstelėse, neturinčiose *MmDicer*, susiformuoja funkcionaliai vienodi RISC kompleksai kaip ir ribonukleazę sintetinančiose ląstelėse (Ha et Kim, 2014; Kim et Kim, 2012).

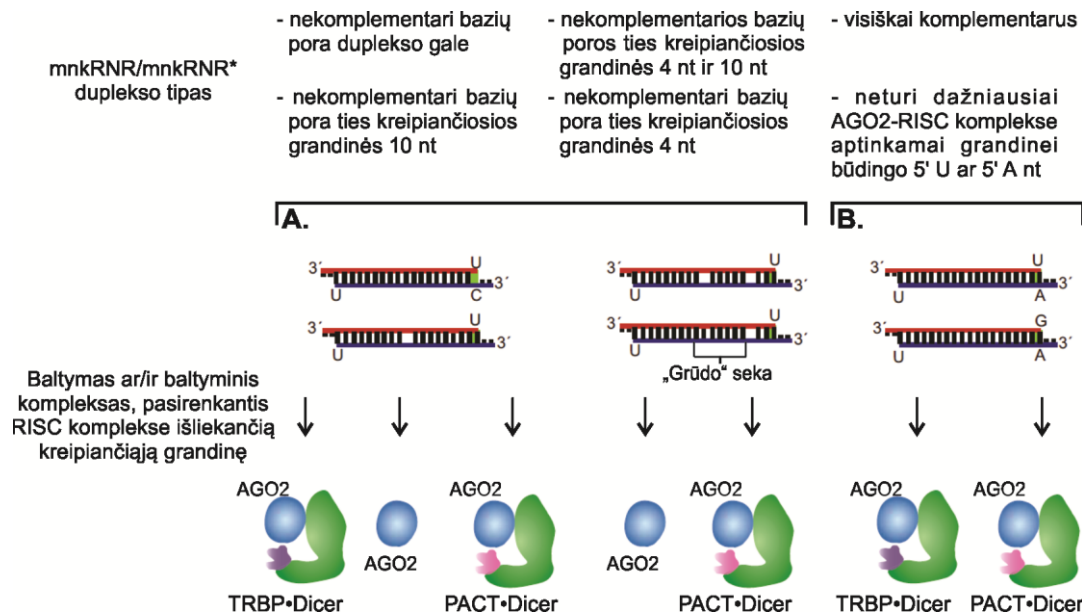


1.7 pav. Galimi žmogaus miRISC susidarymo keliai: priklausomas (kairėje) ir nepriklausomas (dešinėje) nuo miRLC, sudaryto iš Dicer ir dgRNR surišančio baltymo (parengta pagal Kim et Kim, 2012; Noland et Doudna, 2013). Paveikslo aprašymas analogiškas pateiktam 1.3 pav.

5' galinio nukleotido prigimtis. Kaip *D. melanogaster*, žinduoliams yra būdingas dar vienas RISC komplekse išliekančios grandinės pasirinkimo principas – 5' galinio nukleotido prigimtis. Žmogaus miRISC kompleksų miRNR grandinės 5' nukleotidas dažniausiai yra U arba A. Nustatyta, kad U ir A nukleotidai yra atpažįstami *HsAGO2* MID domeno „nukleotidui specifinės“ kilpos, kuri yra konservatyvi visuose keturiuose žmogaus Ago baltymuose bei

bei su miRNR kompleksus sudarančiuose muselių *DmAGO1* (Frank et al., 2010, 2012; Ghildiyal et al., 2010).

Siekiant geriau suprasti, kas lemia žmogaus RISC komplekse išliekančios grandinės pasirinkimą, ištirti mnkRNR/mnkRNR* dupleksai, turintys ar neturintys nekomplementarių bazių porų, pasižymintys skirtingu galų termodinaminiu stabilumu, 5' galiniais nukleotidais (1.8 pav.).



1.8 pav. Struktūra besiskiriančių mnkRNR/mnkRNR* dupleksų kreipiančiosios grandinės pasirinkime dalyvaujančių žmogaus baltymų nustatymas (parengta pagal Noland et Doudna, 2013). (A) mnkRNR/mnkRNR* dupleksai, kurių kreipiančiosios grandinės pasirinkimo efektyvumas išauga AGO2 esant komplekse su Dicer•TRBP ar Dicer•PACT. (B) mnkRNR/mnkRNR* dupleksai, kurių mnkRNR indukuoti RNR nutildymo kompleksai susidaro, jei į reakcijos mišinį be AGO2 įdedama Dicer•TRBP ar Dicer•PACT. AGO2 – žmogaus Ago šeimio ir endoribonukleaziniu aktyvumu pasižymintis baltymas; Dicer – žmogaus III tipo ribonukleazė; TRBP, PACT – žmogaus dgRNR surišantys baltymai; raudona polinukleotidine grandine pažymėta mnkRNR/mnkRNR* duplekso kreipiančioji grandinė, o žalia spalva – mažesniu termodinaminiu stabilumu pasižymintis dvigrandinės mnkRNR galas.

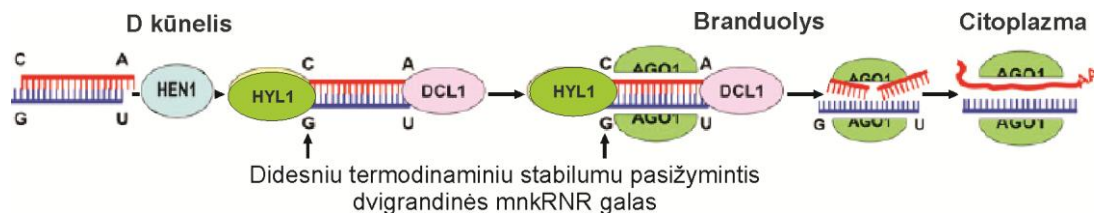
Nustatyta, kad kreipiančioji grandinė yra pasirenkama arba efektyviai atpažįstama, kai į *HsAGO2* turintį mišinį pridedama *HsDicer•HsTRBP* ar *HsDicer•HsPACT*. Nors didžiausią įtaką kreipiančiosios grandinės pasirinkimui turi mnkRNR/mnkRNR* galų termodinaminis stabilumas, svarbi ir 5' galinio nukleotido prigimtis bei nekomplementarių bazių porų vieta mnkRNR/mnkRNR* duplekse. Pažymėtina, kad tik *HsAGO2* kompleksas su

HsDicer•*HsPACT* užtikrina efektyvų miRNR/miRNR* dupleksų, turinčių nekomplementarias bazių poras „grūdo“ sekoje (ties kreipiančiosios grandinės 2-7 nt ar 2-8 nt), kreipiančiosios grandinės pasirinkimą (Noland et Doudna, 2013).

Arabidopsis thaliana

mnkRNR/mnkRNR* duplekso galų termodinaminis stabilumas.

Išanalizavus 58 vairo miRNR/miRNR* dupleksus, parodyta, kad 96,5 % atvejų dupleksų galų termodinaminis stabilumas nulemia kreipiančiosios grandinės pasirinkimą. Taip pat nustatyta, kad mutantuose, neturinčiuose HYL1, nors DCL1 iškerpa miRNR/miRNR* dupleksus iš pre-miRNR, pradeda kauptis lydinčiosios grandinės, kurios nenustatytos laukinio tipo vairyje. Be to, parodyta, kad dgRNR surišantis baltymas HYL1 sąveikauja su galutinės miRNR biogenezės stadijos miRISC komplekso AGO1 baltymu. Remiantis pastaraisiais duomenimis bei žinant, kad vaisinių muselių *Dcr-2*•*R2D2* ir žinduolių RLC, sudarytas iš *Dicer* ir dgRNR surišančio baltymo TRBP arba PACT, sąveikauja atitinkamai su *DmAGO2* ir *HsAGO2*, manoma, kad HYL1, surišantis, kaip vaisinių muselių *R2D2*, didesnio termodinaminio stabilumo dgRNR galą, tikėtina, komplekse su DCL1, užtikrina miRNR/miRNR* duplekso perkėlimą į AGO1 orientacija palankia lydinčiosios grandinės pašalinimui iš pre-miRISC (1.9 pav.) (Eamens et al., 2009; Fang et Spector, 2007; Manavella et al., 2012).



1.9 pav. Numanomas *A. thaliana* HYL1•DCL1 komplekso sąlygotas kreipiančiosios grandinės pasirinkimo mechanizmas (parengta pagal Eamens et al., 2009). Paveikslas aprašomas analogiškai pateiktam 1.3 pav.

5' galinio nukleotido prigimtis. *A. thaliana* miRNR kreipiančiosios grandinės specifiniam susirišimui su Ago baltymu turi įtakos 5' nukleotido prigimtis. Nustatyta, kad AGO1 dažniausiai jungiasi su mnkRNR, kurios 5' gale turi U, t.y. paprastai su tokį nukleotidą turinčiomis miRNR, AGO2 ir AGO4 – A, o AGO5 – C nukleotidą (Frank et al., 2012; Mi et al., 2008).

Nustatyta, kad esant stresinėms sąlygoms ar užkrėtus augalus *Pseudomonas* bakterijomis, randami AGO2 turintys miRISC kompleksai su miRNR* grandinėmis. Gyvūnuose, priklausomai nuo audinio vystymosi stadijos ar susirgimo, taip pat aptinkami miRISC turintys ne miRNR, o miRNR* grandinę. Šie pavyzdžiai rodo, kad kartu su pagrindiniais kreipiančiosios grandinės pasirinkimą veikiančiais principais egzistuoja ir pagalbiniai veiksniai (Bhayani et al., 2012; Ha et Kim, 2014; Thieme et al., 2012).

1.1.6. Efektorinių miRISC kompleksų atliekamos funkcijos

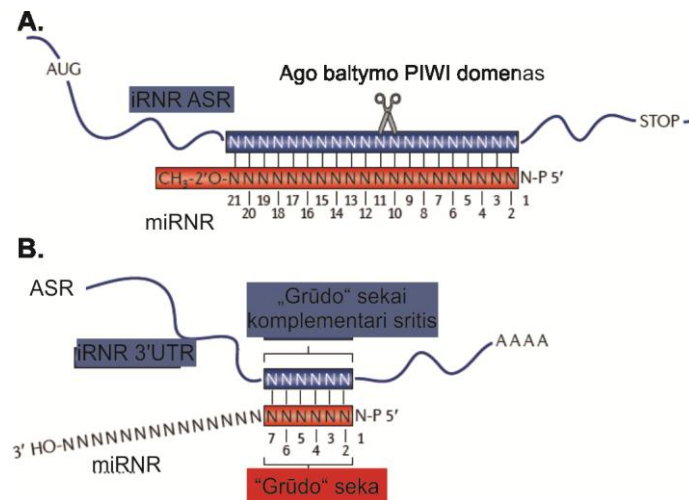
Efektorinių kompleksų viengrandinė mnkRNR atpažįsta RNR taikinį, sudarydama su juo komplementarias Votsono-Kriko bazių poras, ir pritraukia prie jo visą RISC kompleksą. Toliau miRISC kompleksų Ago baltymai arba kerpa RNR taikinius, arba komplekse su papildomais baltymais slopina transliaciją ir/ar inicijuoja suardymą. Tokiu būdu miRNR dažniausiai dalyvauja RNR taikinio koduojamo geno posttranskripciniame raiškos nutildyme, nors yra žinomi pavieniai atvejai, kai miRISC aktyvina iRNR transliaciją ar skatina heterochromatino susidarymą (Kim et al., 2009).

Gyvūnų miRNR dažniausiai jungiasi prie genų transkriptų 3' netransliuojamos srities (3' UTR; angl. *untranslated region*) sekų, tačiau šių mažųjų nekoduojančių RNR atpažįstamos sekos aptiktos ir 5' UTR bei baltymus koduojančiose srityse (1.1 lentelė) (Arora et al., 2013; Axtell et al., 2011). Taikinio atpažinimui yra būtina, kad miRNR „grūdo“ sekos (angl. *seed sequence*) 2-7 nt ar 2-8 nt (skaičiuojant nuo miRNR 5' galo) su RNR sudarytu

1.1 lentelė. Gyvūnuose ir augaluose dažniausiai stebimos miRISC kompleksų savybės

Gyvūnuose	Augaluose
<ul style="list-style-type: none"> • Jungiasi prie geno transkripto 3' UTR • miRNR „grūdo“ seka komplementari iRNR sričiai • Slopina RNR translaciją ar/ir skatina jos suardymą • Atpažįsta nuo dviejų iki 100 RNR taikinių • RNR translaciją reguliuoja keli miRISC 	<ul style="list-style-type: none"> • Jungiasi prie iRNR atviro skaitymo rėmelio • miRNR visiškai komplementari RNR taikinio sričiai • Vykdo RNR taikinio kirpimą • Atpažįsta nuo vieno iki kelių RNR taikinių • RNR translaciją reguliuoja vienas miRISC

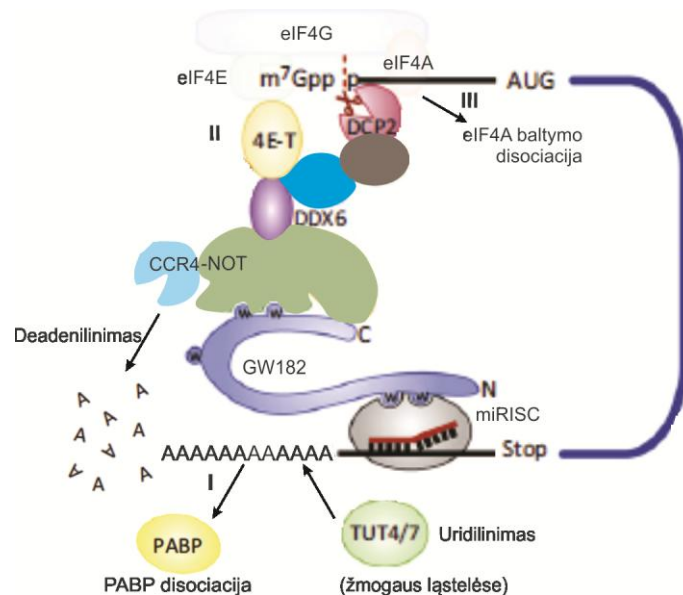
komplementarias bazių poras (1.10 pav. B), o kai miRNR 9-12 nt su taikinio RNR sudaro papildomas komplementarias bazių poras, yra inicijuojamas iRNR kirpimas (1.10 pav.). Kadangi RNR taikinio atpažinimas priklauso nuo trumpos miRNR „grūdo“ sekos, tai vieną miRNR turintis efektorinis kompleksas gali reguliuoti nuo 2 iki 100 iRNR translaciją. Iš kitos pusės, vieno RNR taikinio koduojamo geno raišką gali slopinti keli tos pačios ar skirtingų rūšių miRNR grandines turintys miRISC kompleksai (Broderick et al., 2011; Tétreault et De Guire, 2013). Gyvūnuose, kadangi dažniausiai miRISC miRNR 9-12 nt yra nesuporuoti, iRNR nėra kerpama, o slopinama jos translacija ar/ir inicijuojamas suardymas (Huntzinger et Izauralde, 2011). Šiuo metu yra išskiriami trys pagrindiniai miRISC sukeliami iRNR translacijos slopinimo keliai (1.11 pav. romėniškais skaičiais pažymėtos kritinės reguliavimo vietos). Pirmas (1.11 pav. I), parodyta, jog miRISC Ago baltymo PIWI domenas sudaro kontaktus su GW182 (182 kDa glicino ir triptofano pasikartojimus turintis baltymas), kuris sąveikauja su deadenilinimo kompleksu CCR4-NOT. Pastaroji sąveika sukelia poli(A) seką surišančio baltymo PABP (angl. *poly(A) binding protein*), sąveikaujančio su eIF4G, disociaciją, dėl ko nebegali susiformuoti translacijos vykimui būtina iRNR „uždaros-kilpos“ (angl. „*closed-loop*“) struktūra. Antras (1.11 pav. II), tai translacijos slopinimo veiksnių pritraukimas prie iRNR per GW182 baltymą. Tiksliau, su CCR4-NOT baltyminiu kompleksu sąveikaujanti DEAD dėžutė



1.10 pav. miRNR taikinių (iRNR) atpažinimas augaluose (A) ir gyvūnuose (B) (Huntzinger et Izaurre, 2011). ASR – atviro skaitymo rėmelis.

turinti RNR helikazė DDX6 (angl. *DEAD-box helicase 6*) sudaro kontaktus su eIF4E surišančiu baltymu 4E-T, kuris sukelia translacijos slopinimą iniciacijos ir/ar elongacijos etapuose sąveikaujant su eIF4F komplekso komponentais. Trečias (1.11 pav. III), nuo GW182 baltymo nepriklausoma miRISC sukeliama DEAD dėžutę turinčios nuo ATP priklausomos RNR helikazės eIF4A disociacija, dėl kurios nebegali prisijungti 43S iniciacijos kompleksas ir/ar nebegali vykti šio komplekso judėjimas išilgai iRNR. Parodyta, jos gyvūnų miRISC sukelia RNR taikinio suardymą (1.11 pav.), kai per GW182 baltymą pritrauktas CCR4-NOT kompleksas vykdo žmogaus iRNR deadenilinimą. Po šios modifikacijos vyksta uridilinis katalizuojamas uridililtransferazės TUT4/7, kuris skatina egzomosos vykdymą 3'-5' suardymą. Dažniausiai po deadenilinimo vyksta iRNR 5' m⁷Gppp kepurės pašalinimas: su CCR4-NOT baltyminiu kompleksu sąveikauja RNR helikazė DDX6, kuri sudaro kontaktus su 4E-T baltymu; prie pastarojo baltymo jungiantis kepurės šalinimo aktyvikliams prie iRNR 5' galo pristatomas kepurės šalinimo komplekso baltymas DECAPPING2 (DCP2). Po kepurės pašalinimo vyksta iRNR suardymas, kurį 5'-3' kryptimi vykdo egzoribonukleazė XRN1 (Iwakawa et Tomari, 2015). Šiuo metu yra žinoma, jog RNR taikinio deadenilinimas, sukeliantis RNR suardymą, gali vykti nepriklausomai nuo translacijos slopinimo. Iš kitos pusės 60-90 % žinduolių miRNR sukiamų iRNR

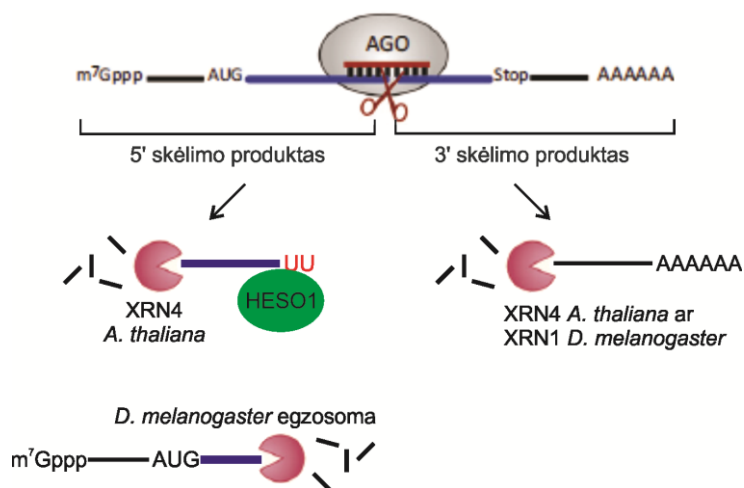
transliacijos slopinimų baigiasi jų suardymu (Jonas et Izaurralde, 2015). Tačiau ar RNR taikinio transliacijos slopinimas skatina jo suardymą bei šio proceso ir pavienių transliacijos slopinimo, RNR suardymo kelių ir jų kombinacijų detalūs mechanizmai iki šiol nėra žinomi (Iwakawa et Tomari, 2015).



1.11 pav. Baltymai dalyvaujantys gyvūnų miRISC sukeliame RNR taikinio transliacijos slopinime ir/ar suardyme (parengta pagal Iwakawa et Tomari, 2015). Prie 5' m7Gppp kepurės prisijungiantis eIF4E, baltymas-tarpininkas eIF4G ir DEAD dėžutę turinti nuo ATP priklausoma RNR helikazė eIF4A sudaro iRNR kepurę surišantį kompleksą eIF4F. DCP2 – kepurės šalinimo komplekso baltymas, vykdamas iRNR 5' m7Gppp šalinimą. 4E-T – transportinis, eIF4E surišantis baltymas; DDX6 - DEAD dėžutę turinti RNR helikazė; CCR4-NOT – deadenilinimo kompleksas; PABP – poli(A) seką surišantis baltymas; GW182 - 182 kDa glicino ir triptofano pasikartojimus turintis baltymas, kuris sąveikauja su miRISC Ago baltymu. TUT4/7 – uridililtransferezės (angl. *terminal uridyltransferase*), vykdančios uridilinimą po iRNR deadenilinimo.

Paprastai augalų miRNR atpažįstamos sekos yra išsidėsčiusios iRNR koduojamose srityse, tačiau aptinkamos ir jų 3' UTR bei 5' UTR (1.1 lentelė) (Brodersen et Voinnet, 2009; Huntzinger et Izaurralde, 2011). Skirtingai nuo gyvūnų, augalų miRNR dažniausiai yra komplementarios taikiniui per visą savo ilgį (1.10 pav. A). Tai lemia, kad augalų miRNR atpažįsta nuo vieno iki kelių RNR taikinių. Be to, konkrečios RNR transliacija yra reguliuojama paprastai vienos miRNR. Dažniausiai augaluose, prie taikinio prisijungus miRISC, vyksta iRNR kirpimas. Po fosfodiesterinio ryšio tarp su miRNR 10 ir

11 nt sąveikaujančių taikinio nukleotidų hidrolizės (1.10 pav. A) susidarę 3' ir 5' produktai suardomi 5'-3' egzonukleazės XRN4 (vaisinėse muselėse 3' produktai atpažįstami į augalų XRN4 panašios 5'-3' ribonukleazės XRN1) (1.12 pav.). *In vivo* parodyta, kad 5' produktų suardymą skatina uridilinis, kurį vykdo nukleotidiltransferazė HESO1 (angl. *HEN1 suppressor 1*). Tuo tarpu vaisinėse muselėse po efektorinio komplekso turinčio *Dm*AGO2 taikinio-RNR skėlimo susidarantys 5' produktai suardomi egzosomos (1.12 pav.). Priešingai nei gyvūnuose augaluose aptiktos tik kelios miRNR, sudarančios ties 10 ir 11 nt nekomplementarias bazių poras su iRNR, kurios dalyvauja transliacijos slopinime, suardyme. Nors tikslus šio proceso mechanizmas nėra žinomas, tačiau parodyta, kad jame dalyvauja glicino ir triptofano pasikartojimus turintis ir tuo į gyvūnų GW182 baltymą panašus SUO bei 5' m⁷Gppp kepurę pašalinantis baltyminis kompleksas, todėl manoma, kad augalų iRNR transliacijos slopinimas ir suardymas vyksta panašiai kaip gyvūnuose (Axtell et al., 2011; Brodersen et al., 2008; Iwakawa et Tomari, 2015; Rogers et Chen, 2013).



1.12 pav. *A. thaliana* ir *D. melanogaster* po RISC RNR taikinių skėlimo susidarantių produktų suardymo mechanizmai (parengta pagal Iwakawa et Tomari, 2015). XRN4, XRN1 - *A. thaliana* ir gyvūnų 5'-3' egzonukleazės; HESO1 – baltažiedžio vairo miRISC skėlimo 5' produktus modifikuojanti uridiltransferazė.

1.2. Augalų miRNR/miRNR* duplekso iškirpimo ir modifikavimo baltymai

Vienas iš esminių augalų mažųjų RNR biogenezės skirtumų lyginant su gyvūnų yra ~21-24 nt ilgio dvigrandinių siRNR/siRNR* ir miRNR/miRNR* dupleksų metilinimas, kurį katalizuoja HEN1 metiltransferazė. Ši modifikacija užtikrina subrendusios, viengrandinės miRNR ar siRNR stabilumą ir tokiu būdu sąlygoja RNR interferenciją vykdančių efektorinių RISC kompleksų susidarymą. Augalų metiltransferazė atpažįsta ir metilina tik dgRNR ir nors 1.1.3. skyriuje paminėta daugybė augalų miRNR/miRNR* dupleksų susidaryme dalyvaujančių baltymų, tačiau cinko pirštų motyvą turintis SERRATE (SE), dgRNR surišantis HYL1 ir III tipo ribonukleazė DCL1 yra išskiriami kaip vieni svarbiausių šio proceso dalyvių (Bologna et al., 2013; Moran et al., 2013; Yang et al., 2014).

1.2.1. SERRATE ir jo homologai

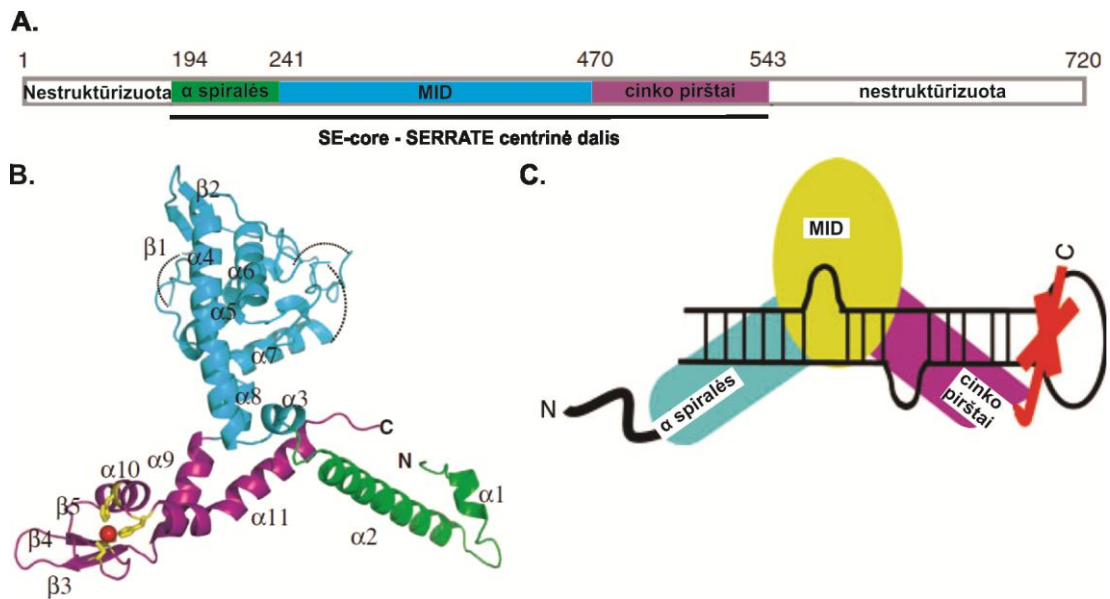
1.2.1.1. Vairenio SERRATE homologas gyvūnuose Ars2

A. thaliana cinko pirštų motyvą turinčio SERRATE homologai, vadinami arsenito atsparumo baltymais 2 (Ars2), aptinkami grybuose ir gyvūnuose (Prigge et Wagner, 2001). Žinduolių nukleoplazminis baltymas Ars2 sąveikauja su transkriptų 5' m⁷Gppp kepurę surišančio komplekso CBC baltymais CBP20 ir CBP80 bei su ribonukleaze Drosha (1.3 pav. A). Nustatyta, kad žinduolių Ars2, kuris turi įtakos pri-miRNR kiekiui ląstelėse ir teisingam pre-miRNR iškirpimui iš pri-miRNR, yra sintetinamas tik proliferuojančiose ląstelėse (Gruber et al., 2009). Tuo tarpu vaisinėse muselėse *DmArs2* yra randamas visų tipų ląstelėse. *DmArs2* turi įtakos pri-miRNR, o kartu ir miRNR kiekiui ląstelėse. Nustatyta, kad jis sąveikauja su CBC komplekso CBP20 baltymu bei dgRNR surišančiu baltymu Pasha. Pažymėtina, kad *DmArs2* kartu su CBC kompleksu dalyvauja ir endogeninių bei egzogeninių siRNR susidarymo keliuose. Yra žinoma, kad *DmArs2* yra

reikalingas efektyviam Dcr-2 ribonukleazės atliekamam siRNR/siRNR* dupleksų iškirpimui citoplazmoje (Sabin et al., 2009). Manoma, kad gyvūnų Ars2 funkcija gali būti dvejopa: cinko pirštų motyvą turintis baltymas komplekse su CBC prisijungia prie pri-miRNR ir padidina jos skėlimo efektyvumą veikdamas kaip šaperonas, kuris stabilizuoja ir pristato miRNR pirmtaką mikroprocesoriaus kompleksui arba/ir Ars2 gali veikti kaip III tipo ribonukleazių kofaktorius, kuris skatina greitą ir tikslų Drosha ar Dcr-2 atliekamą miRNR pirmtakų kirpimą (Gruber et al., 2009; Romero-Cordoba et al., 2014; Sabin et al., 2009).

1.2.1.2. Augalų SERRATE struktūra

SERRATE yra 720 aminorūgščių baltymas, kuriame išskiriamos keletą branduolio lokalizacijos signalų turinti N (1-193 ar.) ir C (544-720 ar.) galinės, nestruktūrizuotos sritys bei centrinė dalis (angl. *core*) (194-543 ar.), turinti cinko pirštų motyvą (1.13 pav. A). Šiuo metu yra žinoma tik pastarosios dalies struktūra, kuri primena einantį žmogų (1.13 pav. B). „Vedančiąją“ šio „žmogaukoją“ sudaro statmenai viena kitos atžvilgiu SE centrinės dalies N gale išsidėstančios dvi α spiralinės (194-240 ar.). „Kūną“ formuoja šio baltymo MID (angl. *middle*) domenas (241-469 ar.), kurio trys α spiralinės ($\alpha 5$ - $\alpha 7$) išsidėsto statmenai $\sim 30^\circ$ kampų pakrypusiai ilgai α spiralei ($\alpha 4$). Dvi antiparaleliai išsidėsiusios β klostės yra aptinkamos dalinai nestruktūrizuotoje kilpoje. Net trys MID domene randamos nestruktūrizuotos kilpos leidžia manyti, kad šis domenas gali dalyvauti tarpbaltyminėse sąveikose ir/ar substrato atpažinime. Šio domeno $\alpha 3$ bei $\alpha 8$ spiralinės atitinkamai sujungia jį su SE centrinės dalies N ir C galais. Pastarasis galas formuoja „atsiliekančią koją“ (471-543 ar.), kurią sudaro nekanoninis β - β - β - α C₂H₂ cinko pirštų motyvas išsidėstęs tarp dviejų α spiralių (Machida et al., 2011).



1.13 pav. SERRATE (SE) struktūra (Guo et al., 2014; Machida et al., 2011). (A) SE domeninė organizacija. Cinko pirštai – cinko pirštų motyvą turinti SE dalis. (B) Spiralinė-klostinė SE centrinės dalies (SE-core) struktūra. Punktyrinėmis linijomis pavaizduotos nestruktūrizuotos kilpos tarp $\alpha 4$ ir $\alpha 5$, $\alpha 5$ ir $\alpha 6$ bei $\alpha 6$ ir $\alpha 7$. (C) Hipotetinis SE sąveikos su pre-miRNR modelis.

1.2.1.3. SE vaidmuo miRNR biogenezėje

Jau nuo 2006 m. žinoma, kad SE kartu su HYL1 ir DCL1 dalyvauja miRNR biologinio kelio stadijose iki HEN1 katalizuojamo miRNR/miRNR* duplekso metilinimo (1.3 pav. B) (Yang et al., 2006a). *In vitro* nustatyta, kad HYL1 ir SE skatina ir užtikrina tikslų DCL1 vykdomą pri-miRNR kirpimą ir tokiu būdu prisideda prie efektyvaus miRNR/miRNR* dupleksų susidarymo (Dong et al., 2008). Taip pat *in vitro* nustatyta, kad SE cinko pirštų motyvo ir baltymo C galinės nestruktūrizuotos srities (1.13 pav. A) pakanka pre-miRNR surišimui bei laukinio tipo fenotipui atstatyti *se* mutantiniuose vairėniuose. Remiantis *in silico* tyrimais, manoma, kad SE cinko pirštų motyvas atpažįsta dvigrandinę sritį, o jo nestruktūrizuota C galinė sritis – viengrandines – dvigrandines RNR sandūras miRNR pirmtakuose (1.13 pav. C). *In vitro* parodyta, kad struktūrizuota SE centrinė dalis sudaro ryšius su HYL1 antru dgRNR surišančiu domenu ir DCL1 helikaziniu, PAZ. *In vivo* nustatyta pilno ilgio SE sąveika su DCL1 dgRNR surišančiais domenais. Taip pat šis baltymas

sąveikauja su NOT2b, CPL1, TGH ir RNR II polimerazės transkripto 5' kepurę surišančio CBC komplekso baltymais CBP20, CBP80. Pažymėtina, kad SE ir baltyminis kompleksas CBC dalyvauja ne tik miRNR biogenezėje, bet ir reguliuoja *A. thaliana* alternatyvųjį splaisingą veikiant pre-iRNR iškerpamo pirmojo introno pasirinkimą (Bologna et Voinnet, 2014; Guo et al., 2014; Liu et al., 2013; Machida et al., 2011; Raczynska et al., 2014).

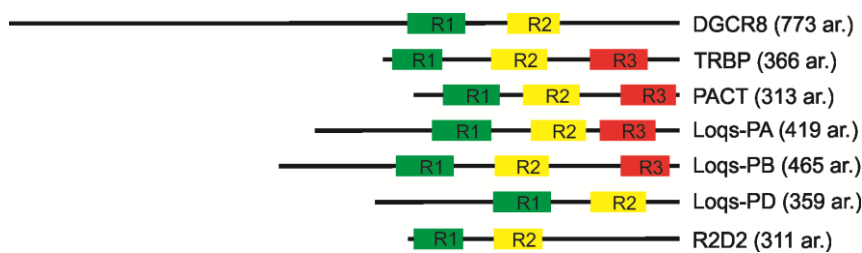
1.2.2. HYL1 ir kiti dgRNR surišantys baltymai, dalyvaujantys mažųjų RNR biogenezėje

DgRNR surišantys baltymai (angl. *double-stranded RNA-binding protein*), dalyvaujantys siRNR ir miRNR biogenezėse, dažnai funkcionuoja kompleksuose su III tipo ribonukleazėmis ir užtikrina tikslų ir efektyvų dgRNR iškirpimą. Šie baltymai turi du arba tris ~70 aminorūgščių dgRNR surišančius domenų (R; angl. *double-stranded RNA-binding domain*), kurių antrinės struktūros elementai išsidėsto α - β - β - β - α tvarka (kaip pavyzdys pateikiama spiralinė-klostinė HYL1 R domenų struktūra 1.16 pav. B). Jų erdvinė struktūra - dviejų α spiralių išsidėstymas virš β lakšto, kurį sudaro trys antiparalelios β juostos. Tipiniuose R domenuose yra aptinkamos trys dgRNR surišančios sritys, sudarytos iš konservatyvių aminorūgščių: pirmoji yra randama pirmoje α spiralėje, antroji – kilpoje tarp pirmos ir antros β juostų, o trečioji – ilgesnės antros α spiralės N gale. Kanoninė R domenų funkcija – dgRNR surišimas. Manoma, kad R domenų sąveika su dgRNR priklauso nuo struktūros, bet ne nuo jos sekos (Masliah et al., 2013). Kai kurie R domenai atpažįsta specifines struktūras (pvz., plaukų segtuko formos RNR galvutę) RNR molekulėse. Parodyta, kad R domenai gali atlikti ir kitas funkcijas: dalyvauti tarpbaltyminėse sąveikose, homodimerizacijoje bei atlikti branduolio lokalizacijos signalo vaidmenį (Doyle et Jantsch, 2002; Fukunaga et al., 2012).

1.2.2.1. Kiti į HYL1 panašūs, miRNR bei siRNR biogenezėje dalyvaujantys, baltymai

Gyvūnų

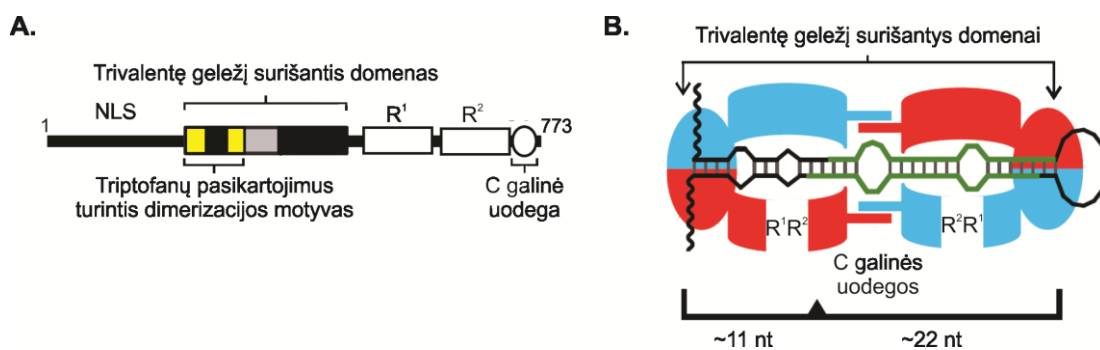
1.14 pav. pateiktos miRNR bei siRNR biogenezėje dalyvaujančių, su III tipo ribonukleazėmis kompleksus sudarančių vaisinių muselių *Loquacious*, R2D2 ir žmogaus DGCR8, TRBP, PACT baltymų domeninė organizacija, iš kurios matyti, kad jie turi du arba tris R domenų.



1.14 pav. *H. sapiens* ir *D. melanogaster* miRNR, siRNR susidarymo keliuose dalyvaujančių ir su III tipo ribonukleazėmis kompleksus sudarančių dgRNR surišančių baltymų domeninė organizacija. R – dgRNR surišantys domenai (pažymėti stačiakampiais), kuriuos apimančios aminorūgštys nustatytos remiantis UniProtKB duomenimis (www.uniprot.org).

DGCR8/Pasha. Pradinėje gyvūnų miRNR biogenezės stadijoje dalyvaujanti ribonukleazė Droscha, vykdanči pre-miRNR iškirpimą iš pri-miRNR (1.1 pav.; 1.3 pav.), sudaro mikroprocesoriaus kompleksą su *H. sapiens* DGCR8 (ar jo homologu *D. melanogaster* Pasha), kuris atlieka pagrindinį vaidmenį atpažįstant substratus iš daugybės ląstelinių RNR molekulių. DGCR8 savo N gale turi branduolio lokalizacijos signalą, už kurio išsidėsto trivalentę geležį surišantis domenas, apimantis triptofanų pasikartojimus turintį dimerizacijos motyvą (1.15 pav. A). Už jo, link C galo išsidėsto du R domenai ir C galinė uodega (angl. *C-terminal tail*). Biocheminiais metodais nustatyta, kad tarpusavyje sąveikaujant Fe^{3+} surišantiems domenams susidaro homodimerai, kurie jungiasi prie pri-miRNR dviejose vietose. Quick-Cleveland su kolegomis nustatė, jog mikroprocesoriaus DGCR8 homodimerai jungiasi prie pri-miRNR taip, kad pirmojo homodimero du geležį surišantys domenai sąveikauja su viengrandine-

dvigrandine RNR sandūra ties pri-miRNR stiebo apačia, o antrojo homodimero du geležį surišantys domenai sąveikauja su miRNR pirmtako galine kilpa (1.15 pav. B). Manoma, kad tokiu būdu DGCR8 išmatuoja pri-miRNR ilgį ir nukreipia *HsDrosha* skėlimą 22 bazių porų atstumu nuo substrato galinės kilpos ir 11 bazių porų – nuo pri-miRNR stiebo galo. DGCR8 R domenai sąveikauja su pri-miRNR stiebu, o C galinės uodegos sudaro kontaktus su ribonukleaze *HsDrosha* (Ha et al., 2014; Quick-Cleveland et al., 2014; Senturia et al., 2012; Yeom et al., 2006).



1.15 pav. *H. sapiens* DGCR8 baltymo domeninė organizacija (A) ir hipotetinis šio baltymo jungimosi su pri-miRNR, užtikrinančio tikslią *HsDrosha* skėlimo vietą pirminiame miRNR transkripte, modelis (B) (Quick-Cleveland et al., 2014). NLS – branduolio lokalizacijos signalą turinti sritis; R¹, R² – pirmas, antras dgRNR surišantys domenai.

TRBP ir PACT. PACT ir TRBP, dalyvaujantys vėlesnėse žinduolių miRNR bei siRNR biogenezės stadijose, yra aptinkami citoplazmoje (ypač branduolio tarpumembranyje), o mažesnė jų dalis - branduolyje (Heyam et al., 2015). TRBP ir PACT turi po tris dgRNR surišančius domenų (1.14 pav.). *In vitro* ir *in vivo* eksperimentais parodyta, kad TRBP ir PACT trečias R domenų yra atsakingas už sąveiką su Dicer helikazinio domeno N galine sritimi (Wilson et al., 2015; Yamashita et al., 2011). Biocheminiais tyrimais parodyta, kad pirmieji du *HsTRBP* ir *HsPACT* R domenai homodimerizuojasi ir heterodimerizuojasi (Heyam et al., 2015; Kok et al., 2007; Laraki et al., 2008). Taip pat nustatyta, kad *HsTRBP* ir *HsPACT* pirmas ir antras R domenai yra atsakingi už dgRNR atpažinimą (Takahashi et al., 2013). Nors ribonukleazė Dicer kerpa substratus ir nesant TRBP, PACT baltymams, tačiau jos

afiniškumas dgRNR molekulėms padidėja sudarius kompleksą su *Hs*TRBP arba *Hs*PACT (Lee et Doudna, 2012; Lee et al., 2013). Nustatyta, kad HeLa ir *Mus musculus* embrioniniuose fibroblastuose, neturinčiuose baltymo TRBP, pakinta kai kurių pre-miRNR skėlimo vieta, dėl ko susidaro netipinio ilgio miRNR. Tuo tarpu šiose ląstelėse PACT neturi įtakos Dicer kirpimo vietos pasirinkimui (Fukunaga et al., 2012; Kim et al., 2014; Wilson et al., 2015). Tačiau žinant, kad *in vitro* *Hs*Dicer•*Hs*TRBP ir *Hs*Dicer•*Hs*PACT iš tų pačių pre-miRNR iškerpamos miRNR skiriasi ilgiu, neatmetama prielaida, jog kito tipo ląstelėse ar esant pakitusioms fiziologinėms sąlygoms, PACT, bet ne TRBP, moduliuoja Dicer kirpimo vietą pre-miRNR (Lee et al., 2013). Palyginus kaip nuo *Hs*TRBP ir *Hs*PACT baltymų kiekio HeLa ląstelėse kinta miRNR kiekis ir egzo-siRISC kompleksų poveikis RNR taikiniui, nustatyta, jog *Hs*PACT labiau nei *Hs*TRBP veikia miRNR biogenezę, o *Hs*TRBP atlieka svarbesnį už *Hs*PACT vaidmenį siRISC kompleksų susidaryme (Heyam et al., 2015; Lee et al., 2006). *In vitro* eksperimentais parodyta, kad *Hs*Dicer, *Hs*Dicer•*Hs*TRBP ar *Hs*Dicer•*Hs*PACT vykdo pre-miRNR hidrolizę panašiu greičiu. Tačiau *Hs*Dicer•*Hs*PACT pre-siRNR hidrolizuoja kur kas lėčiau nei *Hs*Dicer ar *Hs*Dicer•*Hs*TRBP (Lee et al., 2013). Šie tyrimai rodo, kad TRBP ir PACT gali pasižymėti specifiskumu miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleksams ar jų pirmtakams, tačiau šio spėjimo patvirtinimui būtini papildomi tyrimai.

Nustatyta, kad vėlesnėje miRNR brendimo stadijoje *Mm*Dicer sąveika su *Mm*TRBP arba *Mm*PACT yra būtina tam tikrų miRNR/miRNR* dupleksų, sąveikaujančių su *Mm*AGO2, kreipiančiosios grandinės pasirinkimui (Wilson et al., 2015). Parodžius, kad *Hs*Dicer•*Hs*TRBP ar *Hs*Dicer•*Hs*PACT jungiasi prie ir įvertina mnkRNR/mnkRNR* duplekso galų termodinaminį stabilumą (Gredell et al., 2010; Noland et al., 2011), manoma, kad šie kompleksai ne tik vykdo efektyvų pre-miRNR skėlimą, bet kaip vaisinių muselių Dcr-2•R2D2 (RLC) komplekso analogas užtikrina miRNR/miRNR* duplekso perkėlimą į Ago kreipiančiosios grandinės išlikimui miRISC palankia orientacija (Heyam et al., 2015; Kim et Kim, 2012).

Loquacious (Loqs). Vaisinėse muselėse yra randamos trys loquacious izoformos: Loqs-PA, Loqs-PB bei Loqs-PD baltymai (1.14 pav.) (Fukunaga et al., 2012). *D. melanogaster* Loqs-PA ir Loqs-PB kiekis skiriasi ir priklauso nuo audinio bei vystymosi stadijos. Pavyzdžiui, ankstyvose vystymosi stadijose silpnai sintetinamo Loqs-PA kiekis didėja vėlesnių vystymosi stadijų metu. Suaugusių muselių sėklidėse dominuoja Loqs-PA sintezė, tačiau kiaušidėse aptinkama Loqs-PB daugiau nei Loqs-PA (Fukunaga et al., 2012). Nors jų funkcijos dar nėra iki galo iširtos, šiuo metu yra žinoma, kad Loqs-PB antras R domenas sąveikauja su pre-miRNR, o Loqs-PB ir Loqs-PA trečiais R domenais – su Dcr-1 (Dueck et Meister, 2014; Ye et al., 2007). Pastarieji Loqs dalyvauja tik miRNR biogenezės kelyje (1.3 pav. A). Jie katalizuoja Dcr-1 vykdomą miRNR/miRNR* duplexų iškirpimą didinant ribonukleazės afiniškumą tam tikroms pre-miRNR. Taip pat parodyta, kad Loqs-PB, kaip ir žinduolių TRBP, nustato tikslią Dcr-1 skėlimo vietą tam tikrose pre-miRNR (Förstemann et al., 2005; Fukunaga et al., 2012; Miyoshi et al., 2010).

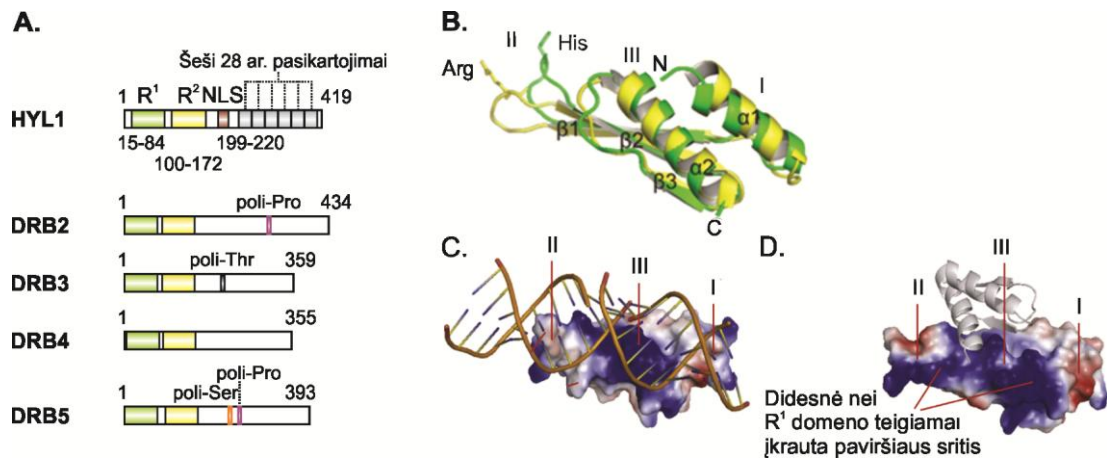
Trečia Loqs izoforma, Loqs-PD, kuris dalyvauja vaisinių muselių siRNR susidarymo kelyje (1.2 pav. A), turi tik du R domenų. Nustatyta, kad šio baltymo C galinė sritis su antruoju R domenu sąveikauja su Dcr-2 helikaziniu domenu (Hartig et Förstemann, 2011; Miyoshi et al., 2010). Loqs-PD užtikrina efektyvų siRNR/siRNR* duplexų iškirpimą iš jų pirmtakų didindamas ribonukleazės afiniškumą ilgoms dgRNR molekulėms (Cenik et Zamore, 2011; Fukunaga et al., 2012). Pažymėtina, kad egzogeninių siRNR/siRNR* duplexų iškirpime iš virusinės kilmės dgRNR Loqs-PD baltymas nedalyvauja (Bronkhorst et van Rij, 2014; Gammon et Mello, 2015; Soares et al., 2014).

R2D2. R2D2 baltymas dalyvauja visų *D. melanogaster* siRNR rūšių (egzo-siRNR ir endo-siRNR) susidarymo kelyje (1.5 pav.) (Dueck et Meister, 2014; Gammon et Mello, 2015). Šis du R domenų turintis baltymas (1.14 pav.), kaip ir Loqs-PD, sąveikauja su Dcr-2 helikaziniu domenu. Parodyta, kad R2D2 C galinės sritys sąveiką su ribonukleaze sustiprina antras R domenas (Hartig et Förstemann, 2011; Nishida et al., 2013). Nustatyta, kad R2D2•Dcr-2

yra RLC (1.5 pav.), kuris įvertinęs siRNR/siRNR* duplekso galų termodinaminį stabilumą jį atitinkama orientacija perkelia į *DmAGO2* (išsamiau žr. 1.1.5. skyriuje) (Okamura et al., 2011; Zhou et Rana, 2013). Nishida su kolegomis nustatė, kad R2D2 jungiantis prie Loqs-PD•Dcr-2•siRNR/siRNR* komplekso (1.2 pav. A) įvyksta relokalizacija ir R2D2•Dcr-2•siRNR/siRNR* kompleksas (1.5 pav.) atsiduria citoplazminiuose kūneliuose (angl. *D2 bodies*), kuriuose telkiasi *DmAGO2*, bet ne *DmAGO1* (Betancur et al., 2012; Dueck et Meister, 2014).

A. *thaliana* DRB baltymų šeima. HYL1 (DRB1) kartu su DRB2, DRB3, DRB4 ir DRB5 (1.16 pav. A) sudaro *A. thaliana* DRB (angl. *double-stranded RNA-binding protein*) baltymų šeimą. Jų aminorūgščių sekų analizė rodo, kad DRB2, DRB3 ir DRB5 sudaro vieną filogenetinę grupę, kuri yra giminingesnė DRB4, nei atskirą filogenetinio medžio šaką sudarantis HYL1. 35-40 kDa DRB baltymai, turintys po du R domenų N gale, molekulinė masė ir domeninė organizacija yra panašūs į R2D2 baltymą (1.14 pav.; 1.16 pav. A). DRB baltymų C galai yra variabilūs ir jų funkcijos nėra žinomos (1.16 pav. A). DRB2 C gale turi trumpą poli-prolino, DRB3 – poli-treonino, DRB5 – poli-prolino ir poli-serino aminorūgščių sekas. Nors DRB4 C galą sudaro 205 aminorūgštys, tačiau struktūrinės determinantės jame nenustatytos (Curtin et al., 2008; Hiraguri et al., 2005).

HYL1, veikiantis komplekse su DCL1 miRNR susidarymo kelyje (1.3 pav.), netiesiogiai dalyvauja ta-siRNR biogenezėje, kurioje miRNR ir Ago baltymų kompleksai atlieka ta-siRNR pirmtakų hidrolizę (1.2 pav. B) (žr. 1.1.2. skyriuje endo-siRNR; apie HYL1 biologinę funkciją miRNR brendimo kelyje žr. 1.2.2.3. skyrių) (Bologna et Voinnet, 2014; Zhang et al., 2013). *A. thaliana* ūglių apikalinės meristemos regiono (SAM; angl. *Shoot apical meristem*) bei skoretelės lapų lapkočių ląstelių branduolių D kūneliuose yra randami HYL1•DCL1 alternatyvūs DRB2•DCL1 kompleksai. Manoma, kad DRB2•DCL1 suriša pri-miRNR pirmtakus, kurie struktūriškai skiriasi nuo HYL1•DCL1 komplekso atpažįstamų. Parodyta, jog *hyll* vairyje padidinus



1.16 pav. HYL1 struktūra (parengta pagal Yang et al., 2010). (A) HYL1 ir DRB2, DRB3, DRB4, DRB5 baltymų domeninių organizacijų, parengtų remiantis UniProtKB duomenimis (www.uniprot.org), palyginimas. (B) Spiralinės-klostinės HYL1 pirmo (R¹, pažymėtas žalia spalva) ir antro (R², pavaizduotas geltonai) dgRNR surišančių domenų struktūros palyginimas. (C) Erdvinė-paviršinė R¹ su dgRNR struktūra. (D) R² homodimero struktūra. Vienas R² domenas pavaizduotas erdvinė-paviršine struktūra, o kitas R² - spiraline-klostine struktūra. Mėlyna, balta ir raudona – teigiamu, neutraliu ir neigiamu elektriniu potencialu pasižyminčios sritys. I, II, III – R domenų sąveikos su dgRNR sritys.

DRB2 baltymo sintezę yra atstatomas laukinio tipo fenotipas. Tai leidžia manyti, jog DRB2•DCL1 veikia sinergistiškai HYL1•DCL1. Nustatyta, kad nuo DRB2 priklausomo miRNR brendimo kelio paskutinėse stadijose dalyvauja ir DRB3, DRB5 baltymai. Manoma, kad citoplazmoje jie kartu su Ago sudaro alternatyvius miRISC kompleksus. Iškelta prielaida, kad, priešingai nei nuo HYL1 priklausomu keliu susidarę miRISC, DRB2 ir DRB5 turintys efektoriniai kompleksai neatlieka iRNR kirpimų, bet slopina jų transliaciją (Eamens et al., 2012a, 2012b).

Kitas branduolio D kūneliuose randamas baltymas DRB4 formuoja kompleksą su DCL4. Nustatyta, kad DRB4•DCL4 kompleksas dalyvauja ta-siRNR, ir-siRNR (1.2 pav. B) bei kelių evoliuciškai jaunų miR822, miR839 ir miR840 (šio tipo mnkRNR brendime dalyvauja ir alternatyvūs DRB2•DCL4 kompleksai) susidarymo keliuose (Bologna et Voinnet, 2014; Eamens et al., 2012b; Fukudome et al., 2011; Hiraguri et al., 2005; Pélissier et al., 2011). *In vitro* nustatyta, kad abu DRB4 R domenai yra reikalingi tiek dgRNR surišimui, tiek sąveikai su DCL4. Be to, Qin su kolegomis parodė, kad DRB4 R¹ domenas sudaro kontaktus su DCL4 nežinomos funkcijos domenu 283

(DUF283; angl. *domain of unknown function 283*) (Fukudome et al., 2011; Qin et al., 2010).

1.2.2.2. HYL1 struktūra

HYL1 yra 419 aminorūgščių baltymas N gale turintis du R domenus (15-84 ar. ir 100-172 ar.), C gale - nežinomos funkcijos šešis 28 ar. pasikartojimus (247-414 ar.) bei tarp jų išsidėsčiusį branduolio lokalizacijos signalą (207-222 ar.) (1.16 pav. A) (Ren et Yu, 2012; Yang et al., 2010).

HYL1 pirmojo R domeno (R^1) tretinė struktūra atitinka kanoninio R domeno trijų dgRNR surišančių sričių išsidėstymą erdvėje (1.16 pav. B). Teigiamai įkrauta HYL1 R^1 domeno trečia sritis (III) sąveikauja su dgRNR didžiuoju griovelio, o nedideliu neigiamu ar neutraliu krūviu pasižyminčios pirmoji (I) ir antroji (II) sritys – su substrato mažaisiais grioveliais (1.16 pav. B, C). Tokiu būdu HYL1 R^1 domenas atpažįsta ~ 16 bazių porų dgRNR fragmentą, apimančią du mažuosius griovelius ir tarp jų įsiterpusį didįjį griovelį. Taip pat parodyta, kad HYL1 R^2 domenas padeda R^1 stipriai surišant substratą (Hiraguri et al., 2005; Rasia et al., 2010; Yang et al., 2010).

Lyginant su kanoninių R domenų, HYL1 R^2 domeno antros srities orientacija yra pakitusi (1.16 pav. B). Be to, joje tipinių R domenų mažojo griovelio atpažinime dalyvaujantis histidinas yra pakeistas argininu. R^2 antroje srityje šalia didelio, stipriai neigiamu krūviu pasižyminčio paviršiaus išsidėsto didesnė nei R^1 domene teigiamai įkrauta paviršiaus sritis (1.16 pav. C, D). Taip, dalinai susiliejančios antros ir trečios srities teigiamo krūvio paviršiai sudaro ilgą, teigiamai įkrautą regioną, kuris gali dalyvauti tarpbaltyminėje sąveikoje ar dimerizacijoje. Yang su kolegomis *in vitro* nustatė, kad nesant dgRNR HYL1 multimerizuojasi, o pridėjus atitinkamą kiekį substrato molekulių, R^2 domenai sąveikauja ir susidaro homodimerai surišantys vieną dvigrandinę RNR. Tuo tarpu Rasia ir kolegų *in vitro* rezultatai rodo, kad iš atskirų R^1 ar R^2 arba abiejų R domenų sudaryti HYL1 baltymai yra tik monomerinės formos. Pažymėtina, kad augalų lizatuose nustatytos abi,

dimerinės ir monomerinės, HYL1 formos (Rasia et al., 2010; Yang et al., 2010).

1.2.2.3. HYL1 vaidmuo miRNR biogenezėje

2008 m. buvo parodyta, jog efektyviam miRNR/miRNR* duplekso iškirpimui iš pri-miRNR yra būtinas baltyminis kompleksas, sudarytas iš mažiausiai trijų komponentų – DCL1, SE ir HYL1 (1.3 pav. B) (Chen, 2008). HYL1 R¹ domenas yra esminis surišant pri-miRNR, pre-miRNR ir miRNR/miRNR* dupleksus, tuo tarpu R² domenas sudaro tarpbaltymines sąveikas. Nustatyta, kad HYL1 R² sudaro kontaktus su DCL1 DUF283, R² domenais (1.17 pav.) bei su SE centrinės dalies N galu ir jo MID domenu (1.13 pav. A) (Hiraguri et al., 2005; Liu et al., 2013; Machida et al., 2011; Qin et al., 2010; Yang et al., 2010). Dong su kolegomis *in vitro* nustatė, kad HYL1 ir SE skatina ir užtikrina tikslių DCL1 vykdomą pri-miRNR kirpimą (1.3 pav. B) (Dong et al., 2008). *In vivo* tyrimu patvirtinta, kad HYL1 homodimeras yra atsakingas už teisingos DCL1 skėlimo vietos nustatymą pri-miRNR. Manoma, kad HYL1 veikia kaip inkaras, matuojantis 15-17 bazių porų atstumą nuo pri-miRNR stiebo galo su viengrandiniais išsikišimais (Yang et al., 2014). Yra žinoma, kad baltymas TOUGH, kuris sąveikauja su branduolio D kūneliuose besitelkiančiais HYL1, SE ir DCL1, padeda susidaryti pri-miRNR•HYL1 kompleksams (1.3 pav. B) (Fang et Spector, 2007; Ren et al., 2012). Kitas baltymas, veikiantis HYL1 funkcijas vaireniuose, yra fosfatazė CPL1. Manoma, kad SE pritraukia CPL1 (1.3 pav. B) prie mikroprocesoriaus komplekso, kuriame HYL1 yra defosforilinimas ir tokiu būdu užtikrinamas jo optimalus aktyvumas (Manavella et al., 2012; Rogers et Chen, 2013).

Vėlesnėje vairenio miRNR brendimo stadijoje HYL1 lemia, kuri iš miRNR/miRNR* duplekso grandinių su Ago baltymu sudarys efektorinį miRISC kompleksą (1.3 pav. B; 1.9 pav.) (Eamens et al., 2009). Nustatyta, kad HYL1 sąveikauja su AGO1, DCL1 bei miRNR/miRNR* dupleksu. Šie duomenys sustiprina Eamens ir kolegų prielaidą, kad HYL1 su DCL1 sudaro vairenio RLC, kuris, kaip ir muselių R2D2•Dcr-2, užtikrina

mnkRNR/mnkRNR* duplekso perkėlimą į AGO1 kreipiančiosios grandinės išlikimui palankia orientacija (1.9 pav.) (Eamens et al., 2009; Fang et Spector, 2007; Qin et al., 2010; Rasia et al., 2010; Ren et Yu, 2012; Yang et al., 2010).

1.2.3. Dicer baltymų šeima ir jai priklausanti *A. thaliana* DCL1 ribonukleazė

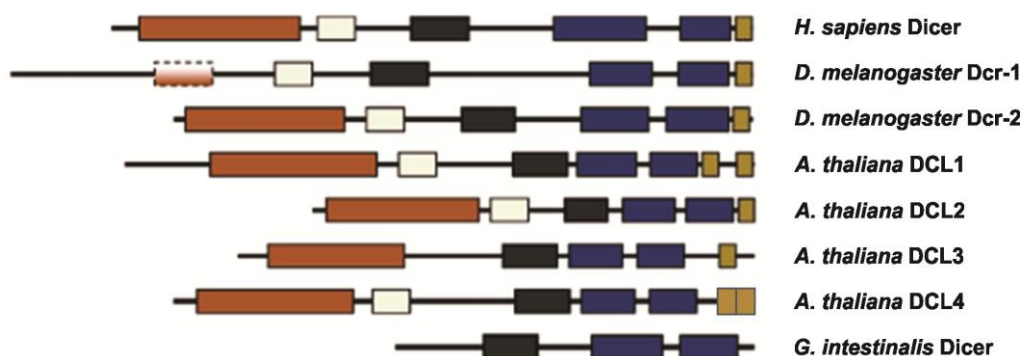
Augalų ir gyvūnų III tipo ribonukleazės Dicer skelia ilgas linijinės formos ir plaukų segtuko tipo struktūrą įgyjančias dgRNR (1.2 pav.; 1.3 pav.), ko pasekoje susidaro atitinkamai siRNR/siRNR* ir miRNR/miRNR* dupleksai turintys 5' fosfatus bei 2 nt iškyšas jų 3' galuose. Dažniausiai substratų kirpimą vykdo komplekse su dgRNR surišančiais baltymais, kurie užtikrina proceso efektyvumą ir tikslumą (žr. 1.2.2.1. ir 1.2.2.3. skyrius). Žinduoliuose yra randamas vienas Dicer baltymas, kuris vykdo tiek miRNR/miRNR*, tiek siRNR/siRNR* dupleksų iškirpimą. Tuo tarpu du vaisinių muselių Dicer baltymai dalyvauja skirtingo tipo mnkRNR brendimo keliuose: Dcr-1 iškerpa miRNR/miRNR* (1.1 pav. A; 1.3 pav. A), o Dcr-2 – siRNR/siRNR* (1.2 pav. A; 1.5 pav.) (Fukunaga et al., 2012). *A. thaliana* identifikuoti net keturi Dicer homologiški DCL (angl. *Dicer-like protein*) baltymai (1.17 pav.). Veikiant DCL1 susidaro daugiausiai 21 nt, DCL2 - 22 nt, DCL3 - 24 nt ir DCL4 - 21 nt mnkRNR (Bologna et Voinnet, 2014; Henderson et al., 2006). Dauguma pri- ir pre-miRNR skelia DCL1, kai DCL4 vykdo tik kelių, evoliuciškai jaunų miRNR pirmtakų kirpimą. DCL1 ir DCL2 iškerpa dvigrandines nat-siRNR (1.2 pav. B). DCL4 skelia ta-siRNR pirmtakus bei yra svarbus ir-siRNR biogenezės kelyje, kuriame dalyvauja ir DCL2, DCL3. DCL3 iškerpa 24 nt ilgio dvigrandines hc-siRNR iš jų pirmtakų (1.2 pav. B) (žr. 1.1.2. skyrių). Pažymėtina, kad DCL1 dažniausiai funkcionuoja komplekse su HYL1, o DCL4 – su DRB4 (Bologna et Voinnet, 2014; Katiyar-Agarwal et Jin, 2010).

1.2.3.1. Dicer struktūra ir funkcinis mechanizmas

Žmogaus, vaisinių muselių ir vairenio Dicer šeimos baltymuose išskiriama nuo septynių iki penkių domenų (1.17 pav.):

- helikazinis - nuo dgRNR priklausomas ir ATP surišančią sritį bei DECH dėžutę (išskyrus *D. melanogaster* Dcr-1) turintis domenas;
- DUF283 - nežinomos funkcijos domenas 283 (DUF283; angl. *domain of unknown function 283*), kurio neturi *A. thaliana* DCL3;
- PAZ (angl. *Piwi-Argonaute-Zwille*), surišantis substrato 3' galą;
- RNazė IIIa ir RNazė IIIb - du ribonukleazės III domenai;
- R - vienas arba du dgRNR surišantys domenai.

Žemesnių eukariotų, pavyzdžiui pirmuonių *Giardia intestinalis*, Dicer šeimos baltymai sudaryti iš mažesnio skaičiaus domenų (1.17 pav.) (Johanson et al., 2013; Luo et al., 2013). *A. thaliana* DCL1 tretinė struktūra nėra nustatyta. Be to, ne visų šios ribonukleazės domenų funkcijos yra žinomos. Vis dėlto, DCL1 ir kitų Dicer baltymų domenų aminorūgščių sekų homologiškumas leidžia spėti, kad ribonukleazių domenai atlieka panašų vaidmenį.



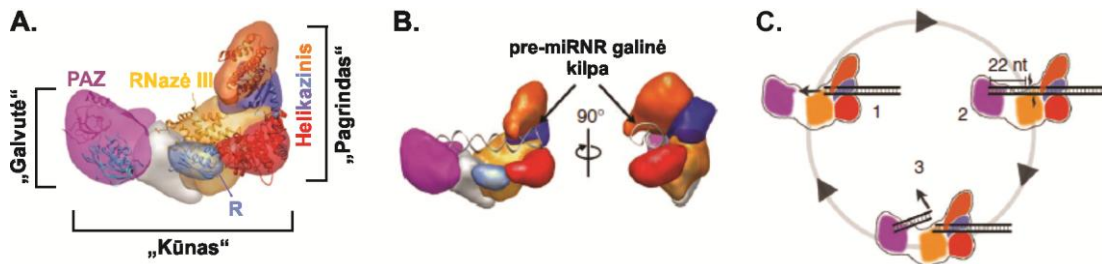
1.17 pav. Žmogaus, vaisinės muselės, baltažiedžio vairenio ir pirmuonio giardijos Dicer baltymų domeninė organizacija (parengta pagal Johanson et al., 2013). Nuo baltymų N galo išsidėstę domenai pavaizduoti spalvomis: helikazinis – ruda; DUF283 – balta; PAZ – juoda; RNazė IIIa ir RNazė IIIb – mėlyna; dgRNR surišantys domenai (R) – rusva.

Helikazinis. Dicer baltymai priklauso DExD/H RNR helikazių grupei (Chen et al., 2013). Šios grupės baltymai dalyvauja nuo ATP priklausomame dgRNR atpažinime, jų grandinių atskyrimo, judėjime išilgai RNR ar

moduliuoja baltymo•baltymo, RNR•baltymo kompleksų konformaciją (Cenik et Zamore, 2011; Pyle, 2008; Tanner et Linder, 2001). Nors *D. melanogaster* Dcr-1 ir Dcr-2 turi helikazinį domeną, tačiau tik Dcr-2 šis domenas prisijungia ir hidrolizuoja ATP. Manoma, kad Dcr-2 reikia ATP judėjimui išilgai dgRNR substrato, kas užtikrina procesyvų siRNR/siRNR* dupleksų susidarymą nuo jų pirmtakų galo (1.2 pav. A) (Fukunaga et Zamore, 2014). Dcr-2 helikazinis domenas sąveikauja su vaisinių muselių siRNR biogenezės kelyje dalyvaujančiais baltymais Loqs-PD ir R2D2. Nors išgrynintas Dcr-2 gali iškirpti miRNR/miRNR* dupleksus iš pre-miRNR *in vitro*, *in vivo* parodyta, kad R2D2 prisijungiant prie Dcr-2 šis skėlimas nevyksta (Cenik et Zamore, 2011; Fukunaga et Zamore, 2014; Hartig et Förstemann, 2011). *In vivo* išimtinai miRNR biogenezėje dalyvaujantis Dcr-1 turi trumpesnę helikazinį domeną, kurio aminorūgščių seka skiriasi nuo žmogaus Dicer ir vaisinės muselės Dcr-2 helikazinių domenų (1.17 pav.). *In vitro* šis Dcr-1 domenas jungiasi prie pre-miRNR viengrandinės, galinės kilpos ir nustato jos dydį. Manoma, kad tokiu būdu helikazinis kartu su kitais domenais užtikrina Dcr-1 specifinių substratų, miRNR pirmtakų, atpažinimą (Ma et al., 2012; Park et al., 2011; Tsutsumi et al., 2011).

Parodyta, jog žinduolių Dicer baltymas iškerpa ir miRNR/miRNR*, ir siRNR/siRNR* dupleksus iš jų pirmtakų. Šiuo metu yra žinomi pre-miRNR ir pre-siRNR atpažinimo modeliai (Lau et al., 2012), pasiūlyti remiantis *HsDicer* struktūra, kuri primena „L“ raidę (1.18 pav. A). Pažymėtina, manoma, kad tokia tretinė struktūra yra būdinga visiems eukariotiniams Dicer baltymams. „L“ raidės pagrindą sudaro helikazinis domenas (1.18 pav. A), kuris *in vitro* sąveikauja su viengrandinėmis kilpomis RNR molekulėje. Šio domeno išsidėstymas primena „C“ raidę (1.18 pav. B), kurioje, manoma, įsiterpia miRNR pirmtako galinė kilpa. Remiantis pre-miRNR surišimo modeliu, nuo „C“ raidės tarpelio nusitęsiantis kanalas pro ribonukleazinių domenų aktyvų centrą iki pat PAZ domeno suriša substrato dvigrandinę dalį, o PAZ domeno „kišenės“ (detaliau aptartos PAZ domeno funkcijas aprašančioje pastraipoje) – miRNR pirmtako 5' ir 3' galus (1.18 pav. B). Spėjama, kad tokia PAZ domeno

sąveika su substratu bei helikazinio domeno prisijungimas prie RNR vidinių ar galinių kilpų užtikrina *HsDicer* ir vaisinių muselių *Dcr-1* baltymų RNazės III domenu, vykdančių dgRNR skėlimą, tikslų išsidėstymą pre-miRNR (Gu et al., 2012; Lau et al., 2012; Ma et al., 2012; Park et al., 2011; Taylor et al., 2013). Pagal pre-siRNR atpažinimo modelį (1.18 pav. C), *HsDicer* helikazinis domenas suriša linijinės formos dgRNR ir nukreipia ją kanalu į baltymo gilumą, link „L“ raidės „kūno“, „galvutės“. Šiam procesui reikia ATP hidrolizės. PAZ domenas atpažįsta substrato 3′, 5′ galus ir nuo šio domeno surišamos pozicijos ~22 nt nutolę RNazė IIIa, RNazė IIIb skelia siRNR pirmtaką. Iškirptas produktas, siRNR/siRNR* dupleksas, disocijuoja, o ~22 bp sutrumpėjusi dgRNR išlieka prijungta helikazinio domeno (Lau et al., 2012; Taylor et al., 2013). Pažymėtina, kad *MmDicer* helikazinis domenas yra atsakingas ir už tarpbaltyminę sąveiką su TRBP ir PACT trečiu R domenu (Wilson et al., 2015).



1.18 pav. Žmogaus Dicer struktūra ir funkcinis mechanizmas (parengta pagal Lau et al., 2012). (A) III tipo ribonukleazės domeninė struktūra primenanti „L“ raidę, kurios „pagrindą“ sudaro helikazinis domenas, „kūną“ – RNazės III ir R domenai, „galvutę“ – PAZ ir DUF283 domenai. (B) pre-miRNR atpažinimo mechanizmas. (C) Linijinės formos dgRNR kirpimo ribonukleaze modelis: helikazinis domenas suriša dgRNR ir nukreipia substratą į baltymo centrą (1), PAZ domeno RNR galo atpažinimas inicijuoja RNazės III domenu vykdomą skėlimą (2), produktas, siRNR/siRNR* dupleksas, disocijuoja, o dvigrandinis substratas išlieka surištas helikazinio domeno (3).

In vitro parodyta, kad vairo DCL1 skelia pri-miRNR procesyvai (1.3 pav. B). Šiam procesui reikia ATP, kurį prijungia ir hidrolizuoja ribonukleazės helikazinis domenas. Manoma, kad ATP hidrolizė sąlygoja DCL1 struktūrinius pokyčius, būtinus antram skėlimui, kurio metu iš pre-miRNR iškerpamas miRNR/miRNR* dupleksas. *In vitro* nustatyta, kad vairo DCL1 helikazinis

domenas atpažįsta substratų vidines viengrandines kilpas ir užtikrina miRNR/miRNR* dupleksų iškirpimo tikslumą moduluojant ribonukleazės skėlimo vietą pri-miRNR (Liu et al., 2012; Zhu et al., 2013). *A. thaliana* DCL1 helikazinis domenas sąveikauja su DDL baltymu (1.3 pav. B), o pastarasis ir PAZ domenai – su SE centrine dalimi (1.13 pav. A) (Machida et Yuan, 2013; Machida et al., 2011).

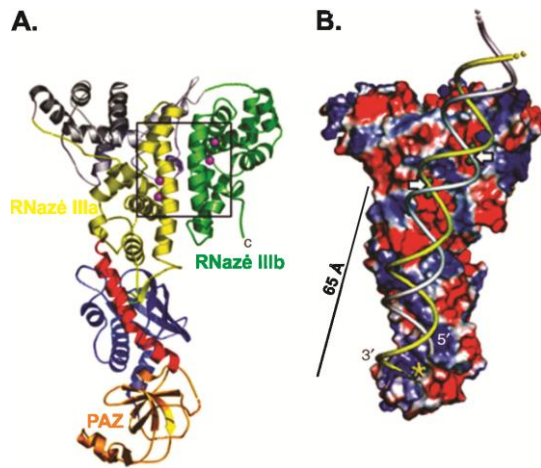
DUF283. Iki šiol yra mažai žinoma apie gyvūnų Dicer šeimos baltymų DUF283 domenų (1.17 pav.) atliekamas funkcijas. *In vitro* nustatyta, kad *HsDicer* DUF283 domeno delecija žymiai sumažina ribonukleazės linijinės formos dgRNR, bet ne pre-miRNR, skėlimo efektyvumą (Ma et al., 2008). *HsDicer* ir *D. melanogaster* Dcr-1 neturintys helikazinio ir DUF283 domenų neiškerpa miRNR/miRNR* dupleksų iš pre-miRNR (Lee et al., 2006; Ye et al., 2007).

A. thaliana DCL4 DUF283 domeno struktūros analizė parodė, kad jo antrinės struktūros elementai išsidėsto α - β - β - β - α tvarka ir C galinės α spiralės bei β juostų išsidėstymas erdvėje atitinka tipinių R domenų. Lyginant su tipinių R domenų DCL4 DUF283 domeno N galinės α spiralės orientacija skiriasi, kas sąlygoja kitoki nei tipiniuose R domenuose paviršiaus krūvių pasiskirstymą DUF283 domene. Be to, kilpa tarp pirmos ir antros β juostų yra trumpesnė bei joje nėra randama tipinių R domenų histidino aminorūgštis, kuri dalyvauja surišant dgRNR. *In vitro* parodyta, kad DCL4 DUF283 tik silpnai sąveikauja su dgRNR, tačiau specifiškai jungiasi su dgRNR surišančio baltymo DRB4 R¹ domenu, o vairenio DCL1 DUF283 – su HYL1 R² domenu (1.17 pav.; 1.16 pav. A) (Dlakić, 2006; Guo et al., 2014; Qin et al., 2010).

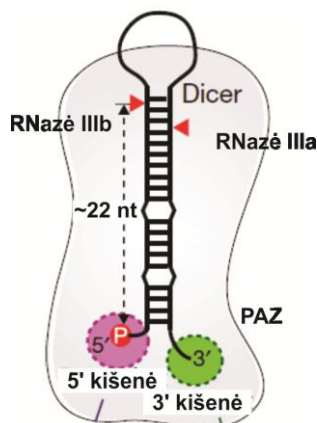
PAZ ir RNazė III. Biocheminiais tyrimais buvo parodyta, kad du žmogaus Dicer RNazės III domenai formuoja homodimerą turintį du aktyvius centrus, kurių kiekvienas atlieka vienos iš dgRNR grandinės skėlimą. Reakcijos metu iškerpamas mnkRNR/mnkRNR* dupleksas su dviejų nukleotidų iškyšomis ir laisvomis hidroksigrupėmis 3' galuose bei fosforilgrupėmis 5' galuose (Zhang et al., 2004). Pirmuonio *Giardia intestinalis* Dicer, sudaryto tik iš PAZ ir dviejų RNazė III domenų (1.17 pav.),

trečinės struktūros (1.19 pav.) analizė parodė, kad dviejų nukleotidų iškyšą turinčios dgRNR 3' galas yra specifiškai surišamas PAZ domeno (1.19 pav. B), o toliau substratas sąveikauja su RNazė III domenais, kurie sudaro homodimerą (1.19 pav. A). Atstumas nuo PAZ surišamos pozicijos iki RNazė IIIa domeno aktyvaus centro surišamų pozicijų yra apytiksliai 65Å ir atitinka iškerpamos, maždaug 25 nukleotidų *G. intestinalis* siRNR molekulės ilgį (Macrae et al., 2006). Vėliau *in vitro* ir *in vivo* eksperimentais nustatyta, kad *HsDicer* PAZ domenas turi ne tik „3' kišenę“ (1.20 pav.), kuri sąveikauja su substrato 3' galu, bet ir dgRNR 5' galą surišančią „5' kišenę“, kuri būdinga tik aukštesnių eukariotų Dicer baltymams: vaisinių muselių Dcr-1 ir *HsDicer* (Park et al., 2011). „L“ raidę primenančioje *HsDicer* erdvinėje struktūroje PAZ kartu su DUF283 domenu išsidėsto priešingoje helikaziniam domenui pusėje ir sudaro šios raidės „galvutę“, o du RNazė III kartu su R domenais – jos „kūną“ (1.18 pav. A). Atstumas tarp PAZ domeno „3' kišenės“ ir „5' kišenės“ bei atitinkamai RNazė IIIa ir RNazė IIIb domenų aktyvių centrų atitinka maždaug 22 nukleotidų ilgį (Lau et al., 2012; Taylor et al., 2013) (1.20 pav.). RNazė IIIa, išsidėstantis arčiau PAZ domeno, visuomet kerpa 3'-OH grupę turinčią grandinę, o RNazė IIIb – 5' fosforilgrupę turinčią grandinę. Taigi, manoma, kad substrato 3', 5' galus surišantis PAZ ir vidinę ar galinę kilpą atpažįstantis helikazinis domenas veikia kaip „molekulinė liniuotė“, kuri nustato tikslią Dicer skėlimo vietą pre-miRNR (Gu et al., 2012; Ma et al., 2012; Nicholson, 2014; Park et al., 2011; Tian et al., 2014).

A. thaliana DCL1 PAZ domene nustatyta tik „3' kišenė“. Iki šiol nėra žinoma, ar ši ribonukleazė turi „5' kišenę“, kuri gyvūnų Dicer šeimos baltymuose yra svarbi teisingos kirpimo vietos pre-miRNR nustatymui ir efektyviam miRNR/miRNR* dupleksų iškirpimui (Iwata et al., 2013; Park et al., 2011). Vairenio DCL1 PAZ domenas dalyvauja ne tik dgRNR surišime, bet ir tarpbaltyminėje sąveikoje su SE centrine dalimi (1.13 pav. A) bei NOT2b, NOT2a baltymais (Machida et al., 2011; Wang et al., 2013a).



1.19 pav. *Giardia intestinalis* Dicer struktūra (parengta pagal Nicholson, 2014). (A) Ribonukleazės erdvinė struktūra. Stačiakampyje pavaizduoti RNazė IIIa ir RNazė IIIb domenų aktyvieji centrai, turintys po du, violetiniais rutuliukais pažymėtus, magnio jonus. (B) Erdvinė-paviršinė Dicer struktūra su įmodeliuota dgRNR. Baltomis rodyklėmis pažymėti RNazė IIIa ir RNazė IIIb domenų aktyvieji centrai, kuriuose vyksta fosfodiesterinio ryšio skėlimas. Žvaigždute pažymėtas PAZ domeno surišamas substrato 2 nt iškyšą turintis 3' galas.



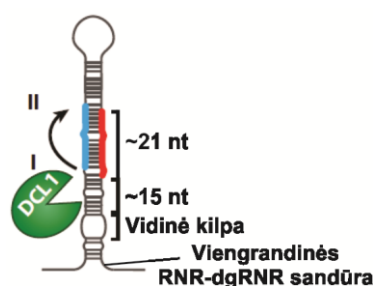
1.20 pav. Žmogaus Dicer vykdomo ~22 nt ilgio miRNR/miRNR* duplekso iškirpimo iš pre-miRNR mechanizmas (parengta pagal Park et al., 2011). PAZ domeno 5' ir 3' kišenės suriša dgRNR 5' ir 3' galus. Raudonais trikampiais pažymėti RNazė IIIa ir RNazė IIIb domenų aktyvieji centrai.

R domenas. Žmogaus, vaisinių muselių Dicer baltymai ir baltažiedžio vairenio DCL2, DCL3 turi po vieną dgRNR surišantį domeną, o DCL1, DCL4 – po du R domenus ribonukleazių C galuose (1.17 pav.) (He et Hannon, 2004). *In vitro* nustatyta, kad *HsDicer* R domenas suriša dgRNR (Wostenberg et al., 2012). Jis yra esminis pri-miRNR, pri-siRNR prijungimui, kai *HsDicer* neturi PAZ domeno, kas leidžia spėti, jog R domenas gali būti atsakingas už alternatyvių, PAZ neatpažįstamų, *HsDicer* substratų surišimą (Ma et al., 2012; Nicholson, 2014). Pažymėtina, jog chimerinių baltymų, sudarytų iš *HsDicer* ir papildomo šios ribonukleazės R domeno C gale bei iš *HsDicer* ribonukleazės R domeno sulieto su piruvato kinaze, R domenas veikia ir kaip branduolio lokalizacijos signalas, nors pilno ilgio *HsDicer* ši funkcija yra užslopinta (Doyle et al., 2013).

A. thaliana DCL1 pirmas dgRNR surišantis domenas yra kanonis R domenas, surišantis pri-miRNR. Tuo tarpu antras nekanoninis R domenas, nors ir pasižymi konservatyviems R domenams būdinga α - β - β - β - α topologija, turi trumpesnę pirmąją α spiralę bei suriša panašiu stiprumu ne tik miRNR pirmtakus, bet ir dgDNR *in vitro* (Burdisso et al., 2012). Bimolekulinės fluorescencijos komplementacijos metodu *in vivo* parodyta, kad DCL1 R domenai sąveikauja su SE (1.13 pav.), o šiuo ir *in vitro* metodais nustatyta DCL1 antro dgRNR surišančio domeno sąveika su HYL1 R domenais (1.16 pav. A) (Hiraguri et al., 2005; Liu et al., 2013).

1.2.3.2. *A. thaliana* DCL1 vaidmuo miRNR biogenezėje

DCL1 baltymą prie pirminio miRNR transkripto pritraukia NOT2b, kuris sąveikauja su prie pri-miRNR 5' m7Gppp galo prisijungusiais CBC komplekso baltymais (1.3 pav. B). Šiame ribonukleazės „pristatymo“ procese taip pat dalyvauja viengrandinę RNR surišantis DDL baltymas (Rogers et Chen, 2013; Yu et al., 2008). Priešingai nei gyvūnų Dicer šeimos baltymai, *A. thaliana* DCL1 skelia ne tik pre-miRNR, bet ir pri-miRNR. Nors DCL1 be papildomų baltymų gali iškirpti miRNR/miRNR* iš pri-miRNR, tačiau žymiai efektyvesnį ir tikslesnį iškirpimą užtikrina HYL1 ir SE, sudarantys kompleksą su ribonukleaze (Dong et al., 2008). Didžioji dalis vairo pri-miRNR yra



1.21 pav. *A. thaliana* DCL1 vykdomo pri-miRNR skėlimo mechanizmas (Bologna et Voinnet, 2014).

skeliamos DCL1 vadovaujantis „pagrindo-kilpos“ taisykle (angl. *base to loop*): kerpama ~ 15 nt atstumu nuo stiebo apačioje esančios vgRNR-dgRNR sandūros ar vidinės kilpos (1.21 pav.). Susidariusioje pre-miRNR antras DCL1 kirpimas vyksta maždaug 21 nt atstumu nuo pirmojo, susiformuojant miRNR/miRNR* dupleksui (Bologna et al., 2013; Xie et al., 2015).

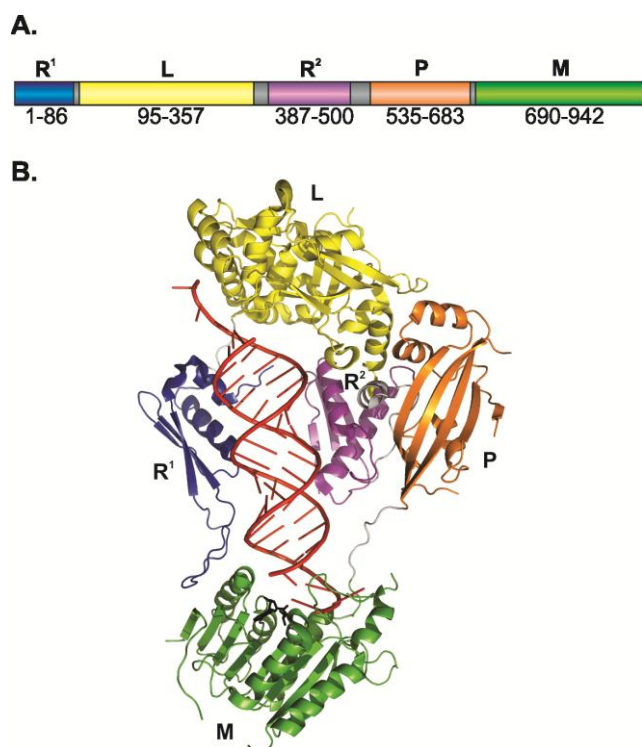
1.2.4. HEN1 ir jo homologai

Ieškant svarbių *A. thaliana* žiedų formavimuisi genų, *HEN1* buvo nustatytas kaip veiksnys didinantis kuokelių ir vaislapių vienodumą augaluose (Chen et al., 2002). Tais pačiais metais nustatyta, kad *hen1* ir *dcl1* mutantų fenotipai (pakitusio dydžio, formos lapai; sutrumpėjęs stiebas; vėlesnis žydėjimas; mažiau žiedadulkių, sėklų) yra panašūs. Ištyrus, jog *hen1* mutante yra sumažėjęs miRNR kiekis, parodyta, jog HEN1, kaip ir DCL1, dalyvauja vairo miRNR brendimo kelyje (Park et al., 2002). Vėliau paaiškėjo, kad HEN1 reikalingas ir skirtingų tipų siRNR susidarymui (Boutet et al., 2003; Li et al., 2005). 2005 metais nustatyta, kad *HEN1* genas koduoja metiltransferazę, kuri vykdo mažųjų nekoduojančių RNR dupleksų 3' galinių nukleotidų ribozijų 2'-O-metilinimą, naudojant ląstelinį kofaktorių S-adenozil-L-metioniną (AdoMet) kaip metilgrupės donorą (Li et al., 2005; Yu et al., 2005). Bioinformatikos metodais, atlikus paiešką naudojant vairo metiltransferazės kataliznio domeno ar. seką, HEN1 homologai rasti ir kituose organizmuose. Baltymai, kurių metiltransferazinių domenų aminorūgščių sekos 40-50 % panašios į vairo HEN1, nustatyti gyvūnuose, grybuose, protistuose bei bakterijose (bet ne archėjose) (HEN1 homologai aprašyti 1.2.4.3. skyriuje). Visos HEN1 šeimai priklausančios metiltransferazės vykdo RNR molekulių 3' galinių nukleotidų ribozijų 2'-O-metilinimą, tačiau modifikuojamų RNR substratų pobūdis skiriasi. Augalų ir žaliadumblių HEN1 metilina dvigrandines miRNR ir siRNR, likusių eukariotų metiltransferazės – viengrandines mnkRNR, o bakterijų HEN1 homologai – ribotoksino kirptą viengrandinę tRNR, vykstant jos reparacijai. Eukariotuose modifikacija užtikrina mnkRNR stabilumą, o bakterijose - apsaugo reparuotą tRNR nuo pakartotino transesterifikaciją vykdančių endonukleazų poveikio reparacijos vietoje (Abe et al., 2010; Huang, 2012; Liu et al., 2014; Mui Chan et al., 2009; Park et al., 2002).

1.2.4.1. *A. thaliana* HEN1 domenų funkcijos tyrimai

Nustčius 942 aminorūgščių HEN1 su dvigrandine mnkRNR ir kofaktoriaus analogu S-adenozil-L-homocisteinu (AdoHcy) tretinę struktūrą, nustatyti penki metiltransferazės domenai (1.22 pav. A):

- R¹ (1-86 ar.) – N gale išsidėstęs pirmas dgRNR surišantis domenas;
- L (angl. *La-motif-containing domain*) (95-357 ar.) - La motyvą turintis domenas;
- R² (387-500 ar.) - antras dgRNR surišantis domenas;
- P (angl. *PPIase-like domain*) (535-683 ar.) - į peptidil-proolino *cis-trans* izomerazę panašus domenas;
- M (angl. *methyltransferase domain*) (690-942 ar.) – C gale išsidėstęs metiltransferazinis domenas (Huang et al., 2009; Tkaczuk et al., 2006).

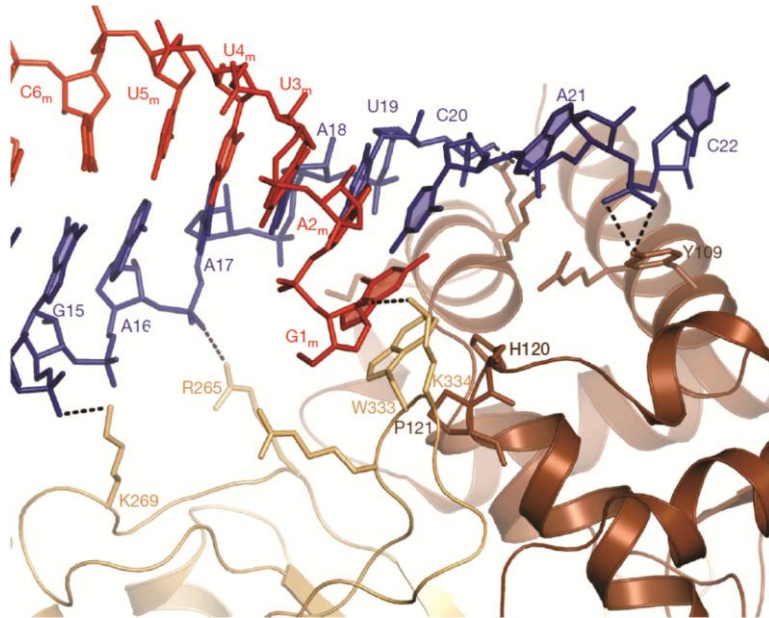


1.22 pav. *A. thaliana* HEN1 struktūra (Huang et al., 2009). (A) Metiltransferazės domeninė organizacija. (B) HEN1 komplekso su dvigrandine siRNR tipo molekule ir kofaktoriaus analogu AdoHcy (pažymėtas juodai) struktūra (PDB ID 3HTX). Domenų santrumpos: R – dgRNR surišantis; L – La motyvą turintis; P – į peptidil-proolino *cis-trans* izomerazę panašus ir M – metiltransferazinis.

Abu HEN1 R domenai yra sudaryti iš trijų antiparalelių β klosčių sudarančių β lakštą, virš kurio išsidėsto dvi α spiralės (1.22 pav. B). Tokia tipinė α - β - β - β - α antrinės struktūros elementų išsidėstymo tvarka yra aptinkama virusų, prokariotų ir eukariotų dgRNR surišančių baltymų R domenuose, todėl

Huang ir kolegos išskėlė prielaidą, kad metiltransferazės R domenai dalyvauja mnkRNR/mnkRNR* dupleksų surišime (Huang et al., 2009; Koh et al., 2013). Vairenio HEN1 R domenų antros dgRNR surišančios sritys, kilpos tarp pirmos ir antros β juostų, yra ilgesnės nei tipinių R domenų. Dėl to metiltransferazės R domenai yra didesni nei kanoniniai ~ 70 ar. dgRNR surišantys domenai. Lyginant su R^1 , R^2 domeno antra dgRNR surišanti sritis yra nestruktūrizuota, kur kas ilgesnė ir pasižymi mažesniu konservatyvumu tarp HEN1 homologų augaluose. R^1 domeno kilpa tarp pirmos ir antros β juostų išsidėsto šalia M domeno, todėl spėjama, kad ji gali sudaryti hidrofobines sąveikas su M domenu (1.22 pav. B) (Huang et al., 2009; Masliah et al., 2013). Pažymėtina, kad tretinėje HEN1 struktūroje R^2 nuo substrato yra nutolęs 3 Å (Huang et al., 2009), todėl šio domeno sąveikos su mnkRNR/mnkRNR* dupleksu, sudarytu iš pilnai komplementarių grandinių, yra mažai tikėtinos. Remdamiesi šiais kristalografinės analizės duomenimis, Huang su kolegomis spėjo, kad R^2 domenas gali būti svarbus specifinius antrinės struktūros elementus (nekomplementarius nukleotidus; nesuporuotų nt iškyšas) turinčių miRNR/miRNR* dupleksų, bet ne dvigrandinių siRNR surišimui. Tipinių R domenų sąveika su dgRNR apima maždaug 16 bp. Šie duomenys leido manyti, kad specifiškumą dgRNR substrato ilgiui sąlygoja ne tik HEN1 R, bet ir kiti domenai (Chen et al., 2013; Huang et al., 2009; Masliah et al., 2013; Ryter et Schultz, 1998; Sashital et Doudna, 2010). *A. thaliana* HEN1 L domenas yra atsakingas už mnkRNR/mnkRNR* duplekso modifikuojamos grandinės 5' galo surišimą. Augalų metiltransferazių La motyvo konservatyvios aminorūgštys His120 ir Pro121 orientuoja L domeno C galinės dalies konservatyvų triptofaną 333 taip, kad jo šoninė grupė ir dgRNR metilinamos grandinės 5' galinio nukleotido heterociklinė bazė sudaro stekingo sąveiką (1.23 pav.). Kadangi mutantinis HEN1 baltymas, turintis Trp333 pakaitą alaninu, nepasižymi metiltransferaziniu aktyvumu ir silpniau suriša mnkRNR/mnkRNR* dupleksą, manoma, kad ši stekingo sąveika yra svarbi metiltransferazei atpažįstant dvigrandines mnkRNR. Tuo tarpu tarp mnkRNR/mnkRNR* duplekso nemetilinamos grandinės 3' galinio nukleotido

fosforilgrupės ir La motyvo pirmos α spiralės tirozino (Tyr109) šoninės grupės susidarantys vandeniliniai ryšiai (1.23 pav.) neturi įtakos HEN1 aktyvumui ar afiniškumui dgRNR *in vitro* (Huang et al., 2009; Sashital et Doudna, 2010).

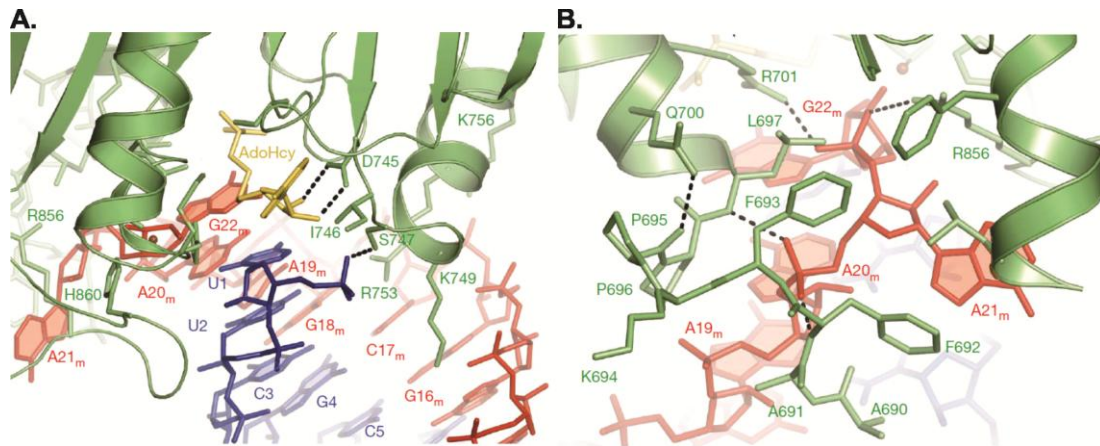


1.23 pav. *A. thaliana* HEN1 L domeno sąveika su dvigrandine mncRNR (Huang et al., 2009). L domenas suriša mncRNR/mncRNR* duplexo modifikuojamos grandinės 5' galą susidarant stekingo sąveikai tarp Trp333 šoninės grupės ir dgRNR metilinos grandinės 5' galinio nukleotido heterociklinės bazės. Ruda spalva parodytas L domeno N galo La motyvas, o gelsva – L domeno C galinė dalis.

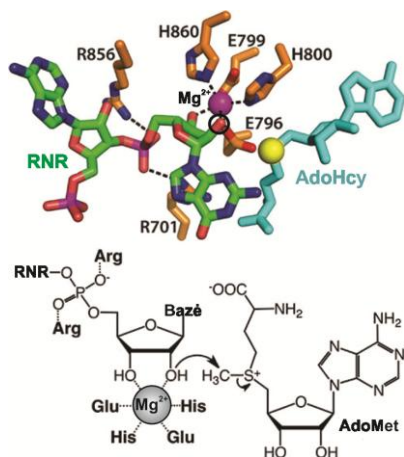
Vairenio HEN1 tretinėje struktūroje (1.22 pav.) matyti, kad P domenas nesudaro tiesioginių kontaktų su dgRNR. Šis domenas yra panašus į eukariotų su imunosupresoriniais vaistais, takrolimu (FK506) ir rapamicinu (sirolimu), sąveikaujančių baltymų (FKBP; angl. *FK506-binding proteins*) FK506 surišantį domeną. Kadangi tipinis FK506 prijungiantis domenas pasižymi peptidil-prolino *cis-trans* izomerazės būdingu aktyvumu, todėl jis dar vadinamas PPIaziniu domenu (Huang et al., 2009; Kang et al., 2008). Daug FKBP šeimos baltymų yra aptinkama aukštesniuose augaluose, kuriuose šie baltymai dalyvauja fotosintezės procesuose, atsako į stresą susidaryme bei augalo atsako į hormonus kontrolėje. Didesnės dalies augalų baltymų FK506 surišantys domenai, kurie neatsakingi už prolino *cis-trans* izomerizaciją, dalyvauja tarpbaltyminėje sąveikoje. Pažymėtina, kad HEN1 P domene peptidil-prolino izomerazės būdingas aktyvusis centras nesudaro (Gollan et al., 2012; Tkaczuk et al., 2006; Vasudevan et al., 2015).

A. thaliana HEN1 M domene, sudarytame iš aštuonių β juostų ir šešių α spiralių, aptinkama Rosmano klostė (angl. *Rossmann fold*), kuri būdinga DNR, RNR, baltymų ir mažų metabolitų metiltransferazėms bei kitiems fermentams, prijungiantiems adenoziną turinčius kofaktorius (Huang et al., 2009; Schubert et al., 2003). HEN1 metiltransferaziniame domene kofaktoriaus analogo AdoHcy 2'-OH ir 3'-OH grupės sudaro vandenilinius ryšius su metiltransferazinio domeno aspartato aminorūgšties (Asp745) šonine grupe (1.24 pav. A). Tokiu būdu AdoHcy ribozės žiedas išsidėsto virš mnkRNR/mnkRNR* duplekso nemetilinamos grandinės 5' galinio nt. Šio nukleotido fosfatas sąveikauja su serino (Ser747) liekana (1.24 pav. A). Stipriau substratas surišamas M domeno teigiamai įkrautų aminorūgščių (Lys749, Arg753, Lys756) šoninėms grupėms sąveikaujant su dgRNR iš didžiojo griovelio pusės. Pažymėtina, kad šios ar. kartu su Ser747 yra konservatyvios augalų HEN1 homologuose, kurie suriša dgRNR, o gyvūnų HEN1 homologuose, kurie atpažįsta vgRNR, jos nėra aptinkamos. 1.24 pav. B matyti, kad dgRNR metilinamos grandinės dviejų nukleotidų iškyšą 3' gale su likusiu karkasu sujungiančio fosfodiesterinio ryšio deguonies atomai sudaro vandenilinius ryšius su M domeno Phe692-Leu697 ar. kilpos pirmos (Phe692) ir paskutinės (Leu697) aminorūgščių aminogrupėmis. mnkRNR/mnkRNR* duplekso metilinamos grandinės fosfodiesterinio ryšio tarp 3' galinio ir priešpaskutinio nukleotidų deguonies atomai sudaro vandenilinius ryšius su Arg856 ir Arg701, kurie konservatyvūs visuose HEN1 homologuose, šoninėmis grupėmis. Šie vandeniliniai ryšiai stabilizuoja substrato metilinamos grandinės išsukto 3' priešpaskutinio nukleotido (A21_m) padėtį (1.24 pav. B; 1.25 pav. viršuje). Dvigrandinės RNR metilinamos grandinės 3' galinio ir priešpaskutinio nukleotidų heterociklinės bazės nesudaro kontaktų su metiltransferaziniu domenu. Tai leidžia spėti, kad HEN1 metiltransferazinis aktyvumas nepriklauso nuo substrato metilinamos grandinės 3' galinio nukleozido tipo. Pažymėtina, kad HEN1 M domenas, kuris suriša mnkRNR/mnkRNR* duplekso metilinamos grandinės 3' bei nemetilinamos grandinės 5' galus, kartu su L domenu (1.22 pav. B) veikia kaip „molekulinė

liniuotė“, nustatanti metilinamo substrato ilgį (Huang, 2012; Huang et al., 2009).



1.24 pav. Dvigrandinės mnkRNR surišimas HEN1 metiltransferaziniu domenu (Huang et al., 2009). (A) Kofaktoriaus analogo AdoHcy įtvirtinimas HEN1 M domene bei mnkRNR/mnkRNR* duplekso nemetilinamos grandinės 5' galinio nukleotido fosfato surišimas Ser747. Šį surišimą sustiprina su didžiuoju dgRNR groveliu sąveikaujančios M domeno teigiamai įkrautų aminorūgščių (Lys749, Arg753, Lys756) šoninės grupės. (B) mnkRNR/mnkRNR* duplekso metilinamos grandinės fosfodiesterinio ryšio tarp 3' galinio ir priešpaskutinio nukleotidų deguonies atomai sudaro vandenilinius ryšius su visų HEN1 homologų M domenuose aptinkamos argininų poros (Arg856, Arg701) šoninėmis grupėmis. Taip pat vandeniliniai ryšiai susidaro tarp dgRNR metilinamos grandinės dviejų nukleotidų iškyšą 3' gale su likusiu karkasu sujungiančio fosfodiesterinio ryšio deguonies atomų ir M domeno Phe692-Leu697 ar. kilpos pirmos (Phe692) ir paskutinės (Leu697) aminorūgščių aminogrupėmis.



1.25 pav. HEN1 vykdomo 2'-O-metilinimo mechanizmas (parengta pagal Huang, 2012). Viršuje – 3' galinio nukleotido įtvirtinimas M domene susidarant vandeniliniams ryšiams tarp fosfodiesterinio ryšio tarp 3' galinio ir priešpaskutinio nukleotidų deguonies atomų ir Arg856, Arg701 šoninių grupių. Apibrėžta – modifikuojamą deguonies atomą turinti 3' galinio nukleotido ribozės 2'-OH grupė. Apačioje – schematinis HEN1 vykdomos reakcijos mechanizmas.

1.2.4.2. Vairenio HEN1 substratų metilinimas

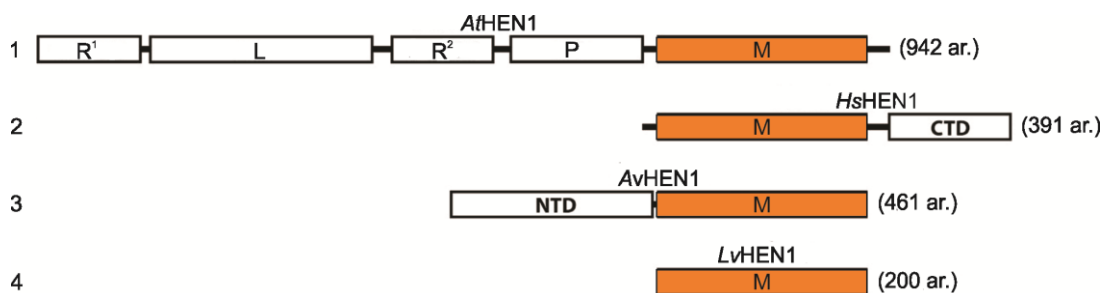
In vitro duomenys, panaudojant rekombinantinę vairenio metiltransferazę HEN1, rodo, kad gali būti modifikuojami abu miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleksų 3' galiniai nukleotidai. Tuo tarpu duomenų, įrodančių abiejų grandinių metilinimą, *in vivo* nėra (Vilkaitis et al., 2010; Yang et al., 2006b; Yu et al., 2005). Augaluose po metilinimo dvigrandinė miRNR sąveikauja su Ago šeimos baltymu. Formuojantis miRISC viena iš miRNR/miRNR* duplekso grandinių pašalinama ir degraduojama, o išlikusi su Ago sudaro subrendusį efektorinį kompleksą miRISC, kuriame randama viengrandinė miRNR yra modifikuota. Pažymėtina, kad vairenyje identifikuojamos visų tipų siRNR yra taip pat metilintos (Bologna et Voinnet, 2014). *In vitro* parodyta, kad HEN1 gali metilinti 19-25 nt ilgio miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR*, tačiau efektyviausiai modifikuoja 21-24 nt dupleksus, kurių populiacija vairenyje yra didžiausia (Yang et al., 2006a; Yu et al., 2005). Dvigrandinių RNR modifikacijai yra būtinos 2'- ir 3'-hidroksigrupės, kas apsprendžia, jog metilinimo reakcija yra specifiška RNR, bet ne DNR (Huang, 2012). Nustatytoje vairenio HEN1 komplekso su dgRNR ir AdoHcy struktūroje, aktyviajame centre dgRNR metilinamos grandinės 3' galinio nukleotido ribozės 2'- ir 3'-hidroksigrupės kartu su keturių, visuose HEN1 homologue konservatyvių M domeno aminorūgščių (Glu796, Glu799, His800, His860) šoninėmis grupėmis koordinuoja Mg^{2+} (1.25 pav.). Tokiu būdu 3' galinio nukleotido 2'-OH grupė išsidėsto šalia S δ AdoMet atomo (1.25 pav. apačioje) efektyviai metilgrupės pernašai vykstant S $_N$ 2 tipo nukleofilinio pakeitimo reakcijai po hidroksigrupės deprotonizacijos. Biocheminiais metodais parodyta, kad magnio jonas yra būtinas augalų metiltransferazės aktyvumui (Huang et al., 2009). Tuo tarpu bakterijų *Clostridium thermocellum* HEN1 yra nuo Mn^{2+} priklausanti metiltransferazė (Huang, 2012). Gyvūnų HEN1 pasižymi didžiausiu efektyvumu modifikuojant *in vitro* viengrandinius RNR substratus į reakcijos mišinį pridėjus Co^{2+} (M. Mickutė et G. Vilkaitis, neskelbti duomenys). Šie duomenys rodo, kad, priešingai nei kitų šeimų RNR 2'-O-metiltransferazių, HEN1 šeimos baltymų aktyvumas yra priklausomas

nuo divalenčių metalo jonų. *In vitro* taip pat parodyta, kad efektyviai modifikacijai būtina metilinamos grandinės 3' gale esanti viengrandinė dviejų nukleotidų iškyša. Vairenio HEN1•mnkRNR/mnkRNR*•AdoHcy struktūroje metilinamos grandinės fosfodiesterinio ryšio tarp 3' galinio ir priešpaskutinio nukleotidų deguonies atomai sudaro vandenilinius ryšius su dviejų konservatyvių argininų (Arg701, Arg856) šoninėmis grupėmis (1.25 pav. viršuje), kas sąlygoja teisingą 3' galinio nukleotido ribozės 2'- ir 3'-hirdoksigrupių išsidėstymą metiltransferazės aktyviajame centre. Šie argininai kaip ir metalo jono koordinacijoje, kofaktoriaus AdoMet surišime dalyvaujančios aminorūgštys, yra išsidėsčiusios M domene, kas rodo, jog pagrindinės struktūrinės determinantės, dalyvaujančios substrato atpažinime ir metiliniame, telkiasi C galiniame domene (Huang, 2012; Huang et al., 2009). Iš tiesų mutantinis vairenio HEN1 baltymas, sudarytas tik iš metiltransferazinio domeno, panašiu pilno ilgio metiltransferazei efektyvumu metilina abi mnkRNR/mnkRNR* duplekų grandines *in vitro*. Tačiau šis sutrumpintas baltymas pasižymi mažesniu afiniškumu mnkRNR/mnkRNR* dupleksui, kofaktoriui bei vos nustatomu metiliniu tų mnkRNR/mnkRNR* duplekso grandinių, kurių 3' galinių nukleotidų iškyšos yra šalia nekomplementarių bazių porų. Taigi, nors M domeno pakanka substrato atpažinimui, prisijungimui, tačiau vairenio HEN1 N galo domenai yra būtini bent jau katalizinio komplekso stabilizavimui bei tam tikrą struktūrą (besiskiriančią nesuporuotų nt iškyšų ir nekomplementarių bazių porų skaičiumi, išsidėstymu) turinčių mnkRNR/mnkRNR* dupleksų atpažinimui (Vilkaitis et al., 2010). Huang su bendraautoriais cheminio susiuvimo (angl. *cross-linking*) metodu nustatė, kad L, R¹ ir M domenai dalyvauja dgRNR substrato surišime, tačiau detalesnio šių ir kitų vairenio HEN1 domenų funkcinio charakterizavimo neatliko (Huang et al., 2009).

1.2.4.3. HEN1 šeimos baltymų suskirstymas ir jų atliekamų modifikacijų svarba

HEN1 šeimai priklausantys baltymai yra aptinkami nuo bakterijų iki žinduolių. Atsižvelgiant į domenų pobūdį ir išsidėstymą jie yra skirstomi į keturis pošeimius (1.26 pav.):

1. didelės (810-970 ar.) žaliadumblių ir augalų HEN1 metiltransferazės, kurios turi metiltransferazinį domeną baltymo C gale. Šie baltymai pasižymi ilga aminorūgščių seka panašia N galine sritimi;
2. pirmuonių, grybų ir gyvūnų HEN1 baltymai (~400 ar.), kurių M domenas išsidėstęs baltymo N gale, o C galinis domenas varijuoja dydžiu ir yra mažai konservatyvus;
3. bakterinės HEN1 metiltransferazės (460-500 ar.), dalyvaujančios Pnkp/HEN1 RNR reparacijoje. Jų metiltransferazinis domenas yra išsidėstęs C gale, o N gale yra randamas adeniltransferazinį domeną surišantis domenas (1.28 pav. A).
4. tik iš M domeno sudarytos bakterinės HEN1 metiltransferazės, nustatytos aštuoniose bakterijų rūšyse. Parodyta, kad šie baltymai turi konservatyvias, metilgrupės pernašai būtinas aminorūgštis, todėl tikėtina, kad jie vykdo RNR 3' galinio nukleotido 2'-O-metilinimą, tačiau jų aktyvumas iki šiol nėra ištirtas (Huang, 2012).

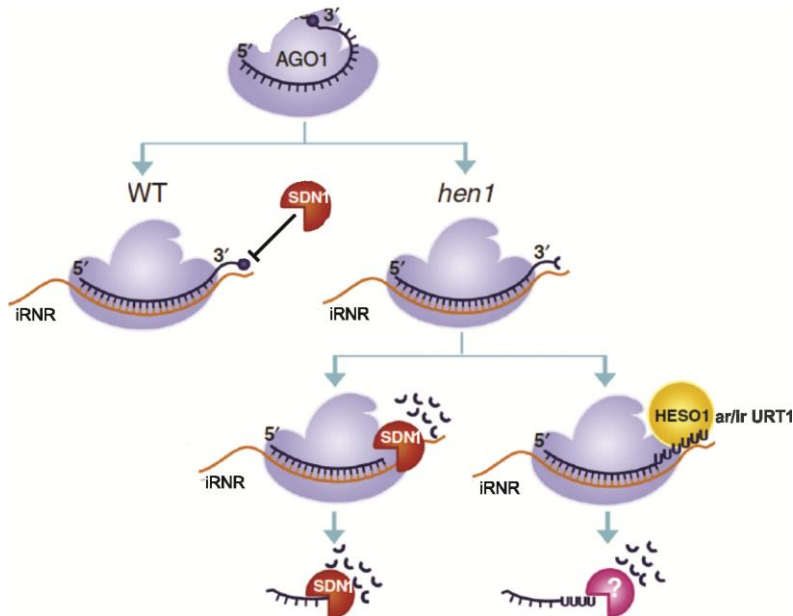


1.26 pav. Kiekvieno iš keturių HEN1 pošemių atstovo domeninė organizacija (Huang, 2012). Kairėje – skaičiais pažymėtas pošemis. Santrumpos: *At* – *A. thaliana*; *Hs* – *Homo sapiens*; *Av* – *Anabaena variabilis*; *Lv* – *Loktanella vestfoldensis*; R¹ – pirmas dgRNR surišantis domenas; L – La motyvą turintis domenas; R² – antras dgRNR surišantis domenas; P – į peptidil-prolino *cis-trans* izomerazę panašus domenas; M – metiltransferazinis domenas; CTD – C galinis domenas; NTD – N gale randamas adeniltransferazinį domeną surišantis domenas.

Pirmas pošeimis. Pirmo pošeimio metiltransferazės, kurioms priskiriamos *A. thaliana* HEN1 ir jos ortologas ryžiuose *Oryza sativa* WAF1 (angl. *Wavy Leaf 1*), modifikuoja dvigrandinės mnkRNR. Vaireniuose ir ryžiuose nustatyta, kad nesant funkcionalių metiltransferazių sumažėja miRNR ir siRNR, o likusios skiriasi 3' galinės dalies ilgiu (Abe et al., 2010; Li et al., 2005). Šie duomenys rodo, kad metilinimas apsaugo mnkRNR nuo degradacijos ir papildomų nukleotidų prijungimo 3' gale (1.27 pav.). *A. thaliana* subrendusias miRNR degraduoja 3'-5' egzonukleazė SDN1 (angl. *Small RNA Degrading Nuclease*). *In vitro* parodyta, kad pastarasis baltymas degraduoja 8 nt ir ilgesnes viengrandinės, nemetilintos miRNR žymiai didesniu efektyvumu nei metilintus analogiškus substratus. Iki šiol nėra žinoma, ar ši nukleazė degraduoja nemetilintus substratus surištus AGO1 RISC kompleksuose ar iš jų disocijavusias mažąsias RNR (Ji et Chen, 2012; Ramachandran et Chen, 2008; Zhao et al., 2012a). Manoma, kad SDN1 yra atsakinga ne tik už miRNR degradaciją, bet ir jų sutrumpinimą, po kurio mažųjų nekoduojančių RNR 3' galus ilgina uridililtransferazė (Sanei et Chen, 2015). Parodyta, kad *A. thaliana* HEN1 mutacijas turinčiuose augaluose pailgėjusių, 1-7 papildomų U nukleotidų turinčių mnkRNR susidarymą sąlygoja nukleotidiltransferazė HESO1 (1.27 pav.). Nustatyta, kad uridilinimas skatina mnkRNR degradaciją (Zhao et al., 2012b). *In vitro* parodyta, kad HESO1 sąveikauja su AGO1 ir uridilina šio baltymo surištos nemetilintos miRNR 3' galą (Ren et al., 2014). *hen1* ir *heso1* mutantuose pastebėjus daugiausiai monouridilintų miRNR susidarymą, identifikuota sinergistiškai su HESO1 veikianti uridililtransferazė URT1 (angl. *Uridyltransferase 1*), kuri taip pat sąveikauja su AGO1 ir specifiškai modifikuoja pastarojo baltymo surištos nemetilintos miRNR 3' galą (1.27 pav.) (Tu et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhao et al., 2012a).

Vienaląsčiame žaliadumblyje *Chlamydomonas reinhardtii* randamas į vairenio HEN1 panašus baltymas, kuris turi M ir du R domenus bei metilina siRNR, miRNR 3' galinius nukleotidus (Molnár et al., 2007). *In vitro* parodyta, kad 2'-O-metilinimas apsaugo mnkRNR nuo *MUT68* geno koduojamos

nukleotidiltransferazės vykdomo 3' galo uridilino, kuris skatina egzomosos vykdomą siRNR ir miRNR degradaciją *in vivo* (Ibrahim et al., 2010; Kim et al., 2010).



1.27 pav. Hipotetiniai modeliai, kaip *A. thaliana* HEN1 vykdomas metilinimas apsaugo mnkRNR nuo degradacijos ir uridilino (Sanei et Chen, 2015). Visiškai komplementarios mnkRNR sąveika su RNR taikiniu sąlygoja jos 3' galinės srities „išsikišimą“ iš Ago baltymo PAZ domeno. Vairenio mutante *hen1* nemetilintą mnkRNR degraduoja 3'-5' egzonukleazė SDN1 (angl. *Small RNA Degrading Nuclease*). Manoma, kad ši nukleazė yra atsakinga ir už mnkRNR sutrumpinimą, po kurio mažosios nekoduojančios RNR 3' galą ilgina uridililtransferazė HESO1 ar/ir URT1, sudaranti kompleksą su RISC Ago baltymu. Pažymėtina, kad egzonukleazės vykdančios uridilintų mnkRNR degradaciją nėra žinomos. Laukinio tipo augale (WT) mnkRNR nuo degradacijos ir uridilino apsaugo 2'-O-metilgrupė (pažymėta mėlynu skrituliuku).

Antras pošeimis. Antro pošeimio metiltransferazės (1.26 pav.) modifikuoja įvairaus ilgio viengrandines, Ago baltymo surištas RNR.

Pirmuonyje *Tetrahymena thermophila* aptinkamos pastoviai sintetinos maždaug 23-24 nt ilgio siRNR ir tik lytinio dauginimosi (konjugacijos) metu randamos maždaug 28-29 nt ilgio skenuojančios RNR (angl. *scan RNA*). Pastarosios RNR dalyvauja gyvybingų palikuonių susidarymui būtiname procese – vidinių DNR sekų pašalinime formuojantis naujiems makrobranduoliams iš mikrobranduolių. Iš 12 šiame vienląstyje aptinkamų Piwi pošeimio baltymų, tik Twi1p sąveikauja su skenuojančia RNR.

Ši sąveika vyksta makrobranduolyje, kuriame konjugacijos metu yra sintetinamas HEN1 homologas Hen1p, kuris sudaro kompleksą su Twi1p. Manoma, kad metiltransferazė Hen1p modifikuoja kreipiančiąją skenuojančios RNR grandinę surištą Twi1p. Parodyta, kad metilinimas stabilizuoja skenuojančias RNR ir apsaugo jas nuo degradacijos (Kurth et Mochizuki, 2009).

Žuvų *Danio rerio* lytinėms ląstelėms specifinės piRNR ir du Piwi pošeimio baltymai, Ziwi ir Zili, sudaro RISC kompleksus, kurie vykdo transpozonų raiškos slopinimą ir užtikrina normalų oocitų vystymąsi. Parodyta, kad šių mažųjų RNR 3' galinis nukleotidas yra 2'-O-metilintas. Ši modifikacija stabilizuoja viengrandines piRNR bei apsaugo nuo adenilino ar uridilino skatinamos 3'-5' degradacijos. piRNR metilinimą katalizuoja HEN1 homologas Hen1, kurio C domenu užtikrinama lokalizacija sutampa su lytinių ląstelių granulėse besitelkiančiu Ziwi baltymu (Kamminga et al., 2010).

Apvaliųjų kirmėlių *Caenorhabditis elegans* HENN1 (angl. *HEN1 of Nematodes 1*) metilina lytinėms ląstelėms specifines 21U mnkRNR (21 nt ilgio ir prasidedančios U nukleotidu; dar vadinamos piRNR). Oocituose bei embrionuose yra modifikuojamos 26G siRNR (26 nt ilgio ir prasidedančios G nukleotidu; pirminės endo-siRNR), surištos Piwi pošeimio baltymų ERGO-1. Ši modifikacija apsaugo visiškai taikiniams komplementarias 26G siRNR nuo uridilino ir 3'-5' egzonukleazijų vykdomų degradacijų (Kamminga et al., 2012).

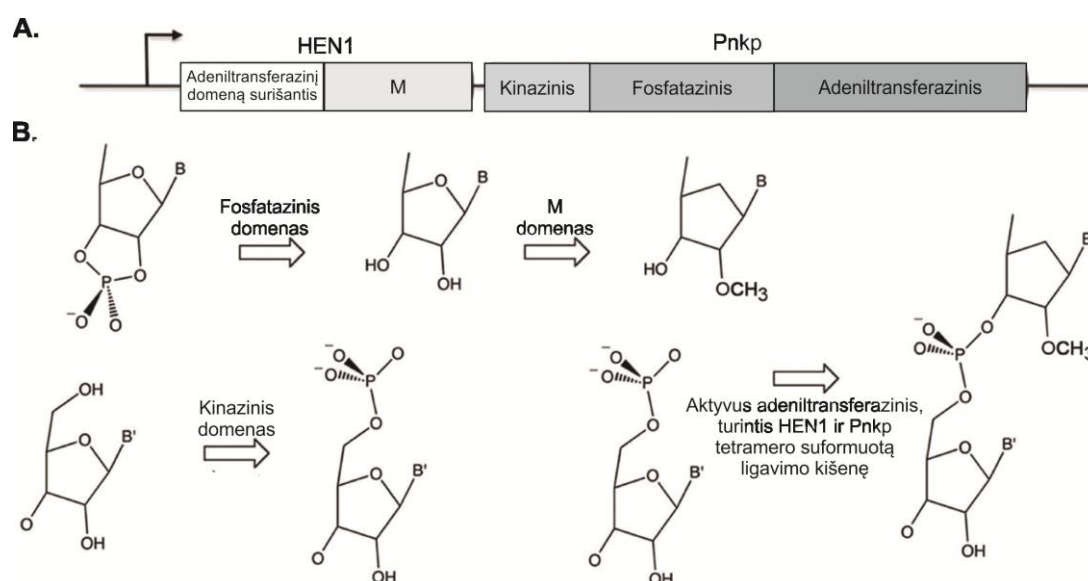
D. melanogaster lytinėse liaukose sintetinamų piRNR, pelių ir galvijų piRNR, 3' galiniai nukleotidai yra 2'-O-metilinti. Vaisinėse muselėse šių mažųjų RNR, esančių komplekse su Piwi pošeimio baltymais, modifikaciją katalizuoja HEN1 homologas Hen1. Pastarojo baltymo mutantuose stebimas sutrikęs piRNR taikinių, transpozonų, slopinimas bei sumažėjęs piRNR kiekis, o likusios piRNR yra sutrumpėjusios (Horwich et al., 2007; Saito et al., 2007). Taip pat Hen1 modifikuoja ir Ago pošeimio *DmAGO2* turinčio RISC komplekse esančią viengrandinę siRNR ir tokiu būdu apsaugo subrendusias

siRNR nuo jų 3' galo sutrumpėjimo ir mono- ar oligouridilinio (Ameres et al., 2010, 2011; Horwich et al., 2007).

Taigi, pirmo pošeimio HEN1 baltymų N domenai užtikrina metiltransferazių specifiškumą 21-24 nt ilgio dvigrandinėms RNR. Tuo tarpu antro pošeimio metiltransferazių C galiniai domenai sąlygoja jų sąveiką su konkrečiu Ago šeimos baltymu, kuris suriša tik tam tikro tipo viengrandines mncRNR, taip apsprendžiant šių metiltransferazių specifiškumą RNR substratams. Nustatyta, kad, kai mncRNR yra visiškai komplementarios taikiniams, jų 3' galinė sritis „išsikiša“ iš Ago baltymo PAZ domeno. Tokiu būdu jų 3' galas tampa lengvai prieinamu nukleotidiltransferazėms ar 3'-5' egzozonukleazėms ir taip yra inicijuojama degradacija. Tai paaiškina, kodėl augalų siRNR ir miRNR bei gyvūnų piRNR ir siRNR funkcionavimui yra būtinas 3' galinių nukleotidų metilinimas, o tuo tarpu idealaus komplementarumo su taikiniais nesusidarančioms gyvūnų miRNR ši modifikacija tarsi ir nereikalinga. Nemetilintų mncRNR degradacija bei uridilinis yra konservatyvūs procesai, prisidedantys prie mažųjų RNR homeostazės palaikymo žaliadumbliuose, augaluose bei gyvūnuose. Jie užtikrina su netinkamais Ago baltymais gyvūnuose susijungusių ir todėl nemetilintų mažųjų RNR ar per klaidą nemetilintų arba metilgrupę praradusių RNR pašalinimą. Pažymėtina, kad gyvūnuose ir augaluose vyksta ne tik mncRNR destabilizuojantis uridilinis, bet ir A nukleotidų prijungimas prie jų 3' galų, kuris, pavyzdžiui, stabilizuoja tuopos *Populus trichocarpa* miRNR apsaugant jas nuo 3'-5' degradacijos (Ibrahim et al., 2010; Kai et Pasquinelli, 2010; Ren et al., 2014; Scott et Norbury, 2013).

Trečias pošeimis. Daugiau nei šešiasdešimt bakterijų rūšių, priskiriamų dešimčiai filogenetinio medžio šakų, turi Pnkp/HEN1 sistemą, kuri nuo kitose bakterijose aptinkamų ribotoksinais (endonukleazių) kirptų tRNR reparacijos sistemų išsiskiria tuo, kad joje be polinukleotidkinazės fosfatazės (Pnkp) dalyvauja trečiam HEN1 baltymų pošeimiui priskiriama metiltransferazė. Abu šios sistemos baltymai yra koduojami to paties operono (1.28 pav. A). *In vitro* nustatyta, kad po ribotoksino kirpimo susidariusius RNR galus atpažįsta

Anabaena variabilis ir *Clostridium thermocellum* Pnkp kinazinis ir fosfatazinis domenai, kurie paruošia ligavimui atitinkamai 5' galą, pernešant fosforilgrupę nuo ATP prie monosacharido 5'-hidroksigrupės, ir 3' galą, hidrolizuojant nukleozido 2',3'-ciklofosfatą (1.28 pav. B). Pastarosios hidrolizės metu susiformavusios kirptos RNR 3' galinio nukleotido 2'-O metilina HEN1 C galinis metiltransferazinis domenas. Tuo tarpu HEN1 N galinio domeno sąveika su Pnkp C galiniu adeniltransferaziniu domenu aktyvuoja pastarąjį domeną: susiformuoja HEN1 ir Pnkp kompleksas, turintis dviejų RNR grandinių pločio ir dviejų nukleotidų gylio ligavimo kišenę, kurioje, prisijungus AMP iš ATP, per tris ligavimo etapus sujungiami paruošti kirptos RNR 3' ir 5' galai susidarant 3',5'-fosfodiesteriniam ryšiui. Po ligavimo metilgrupė tampa žymeniu, kuris neleidžia ribotoksinams pakartotinai atpažinti šios vietos (Smith et al., 2012; Wang et al., 2013b, 2012).



1.28 pav. Pnkp/HEN1 sistema ir jos vykdomos RNR reparacijos schematinis mechanizmas (Wang et al., 2013b). (A) Pnkp/HEN1 RNR reparacinę sistemą sudarančių metiltransferazės HEN1 ir polinukleotidkinazės fosfatazės (Pnkp) domenų koduojančių sekų išsidėstymas tame pačiame operone. (B) Ribotoksino (ribonukleazės) kirptos RNR 3' ir 5' galų paruošimo ir jų sujungimo schematinis mechanizmas. Šalia rodyklių nurodytas už vykstančią reakciją atsakingas Pnkp ar/ir HEN1 domenas. Santrumpos: M – metiltransferazinis domenas; B – heterociklinė bazė.

MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

Thermo Fischer Scientific: TopVision Agarose; 6x DNA Loading Dye; IPTG; ditionitritolis (DTT); RNR denatūruojantis dažas 2x RNA Loading Dye; 5-bromo-4-chloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozidas (X-gal); Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate.

Carl Roth: H₃BO₃; scinciliacinis skystis Rotiszint Eco Plus; NaCl; glicerolis; MgSO₄; Na₂HPO₄; KH₂PO₄; NH₄Cl; kanamicinas; chloramfenikolis; Triton X-100; NaH₂PO₄; imidazolas; Tris-HCl; D(+)-gliukozė; redukuotas glutationas (GSH); akrilamido/bisakrilamido tirpalas Rotiphorese Gel 30 (37,5:1); amonio persulfatas; 10x Tris-glicino-NDS buferis Rotiphorese 10x SDS-PAGE; D(+)-sacharozė; dažas Coomassie Brilliant Blue R-250; Roti-Nanoquant; DEPC; HEPES; KCl; akrilamido/bisakrilamido tirpalas Rotiphorese Gel 40 (19:1); urija; CH₃COONa; polietilenglikolis 4000; minimaliai mielių terpei skirtas vitaminų, mikroelementų ir druskų rinkinys (YNB); Tween-20; Na₂SO₃; hidrochinonas; Na₂CO₃; KBr; NaOH.

Amresco: etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA); CaCl₂; natrio dodecilsulfatas (NDS).

Fluka: CH₃COOH; MgCl₂; fenilmetilsulfonilfluoridas (PMSF); tetrametiletilendiaminas (TEMED); Na₂B₄O₇; N,N-dimetilformamidas.

Sigma-Aldrich: 10 mg/ml etidžio bromidas; 14,3 M β-merkaptioetanolis; NaIO₄; CH₃COOLi; 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB) tirpalas; metolas.

Vilniaus degtinė: 96 % etanolis.

BD-Difco: agaras; peptonas; mielių ekstraktas.

Roche: proteazių inhibitorių mišinys cOplete, EDTA-free.

Fisher Scientific: ampicilinas; tiaminas (vitaminas B1); D(+)-galaktozė; D(+)-rafinozė.

AppliChem: bromfenolio mēlis.

Standard: acetonas.

Reachim Ltd: Na₂S₂O₃.

2.1.2. Sistema, rinkiniai ir priemonės

Sistema

„DupLex-A“ mielių dviejų hibridų sistema (*OriGene Technologies*; gauta iš dr. A. Gedvilaitės (Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas)).

Rinkiniai

Thermo Fischer Scientific: GeneJET Plasmid Miniprep Kit; GeneJET Gel Extraction Kit.

Priemonės

Whatman: 23 mm skersmens DE-81 dietilaminoetil(DEAE)-celiuliozės filtrinis popierius; poliakrilamido gelių džiovavimo popierius Whatman 3MM Chr.

GE Healthcare Life science: GStrap HP (5 ml) kolonėlė; HiTrap IMAC HP (5 ml) kolonėlė; nitroceliuliozinė membrana Amersham Hybond-ECL; redukuotu glutationu (GSH) padengtas sorbentas Glutathione Sepharose 4B.

Carl Roth: 0,45 μm ir 0,22 μm filtrai.

Thermo Fisher Scientific: Slide-A-Lyzer dializės kasetės (10 kDa MWCO; 3 ml); koncentravimo mėgintuvėliai (9 kDa ir 20 kDa MWCO; 20 ml).

Phosphoimager: radioaktyvumui jautrus ekranai.

Kodak: rentgeno lakštai.

2.1.3. Nukleorūgščių preparatai

Thermo Fisher Scientific: DNR fragmentų ilgio žymeklis Gene Ruler DNA Ladder Mix; deoksinukleozidų monofatų mišinys „dNTP Mix“.

PerkinElmer: [γ -³²P]-ATP (6000Ci/mmol); [γ -³³P]-ATP (3000Ci/mmol); [³H-metil]-AdoMet (10 Ci/mmol; 55 μM).

Sigma-Aldrich: AdoMet (AdoMet nuo AdoHcy papildomai išgrynintas A. Osipenko, Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas); AdoHcy; uracilas; silkių sėklidžių DNR; mielių RNR.

Carl Roth: adeninas.

Plazmidės ir vektoriai

pGEX-HYL1, pET28b-SE, pET28b-SE-core ir pBA-DCL1 plazmidės gautos iš dr. S. Machida ir prof. Y. A. Yuan (Singapūro nacionalinis universitetas).

pET-HEN1 ir pET-HYL1 - pET-15b vektoriaus pagrindu sukurtos plazmidės, gautos iš dr. G. Vilkaičio (Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas).

pET-HEN1-M, pET-HEN1-LR²PM ir pET-HEN1-PM – pET-HEN1 plazmidės pagrindu sukurtos plazmidės, gautos iš dr. G. Vilkaičio (Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas).

pGEX-5X-1 vektorius pirktas iš *GE Healthcare Life Science*.

pET-15b – *Novagen-Merck Millipore*.

pET-43.1a(+) vektorius, gautas iš dr. G. Žvirblio (Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas).

pEG202-NLS, pJG4-5, pEG202, pSH18-34, pSH17-4, pJK101, pRHF1 - *OriGene Technologies* plazmidės, gautos iš dr. A. Gedvilaitės (Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas).

Sintetiniai RNR ir DNR oligonukleotidai

Visų darbe naudotų sintetinių oligonukleotidų gamintojas – *Metabion*.

2.1 lentelė. Plazmidžių konstravimui naudoti oligonukleotidai

Plazmidė	Jos konstravimui naudotų pradmenų nukleotidų sekos (parašytos 5'→3' kryptimi)
pET-HEN1-R ¹	AATACGACTCACTATAGGG GGCGGGATCCTTACTTGTCAAGAGCCAATTC
pET-HEN1-R ¹ L	AATACGACTCACTATAGGG TTGGATCCTCAAGTGAATGCAAAAGG
pET-HEN1-L	GAATGATCATATGACTGTGGATG GTAGGATCCTTAGGGTGAC
pET-HEN1-R ²	TTGCACATATGACAAAATCTAATTGGAGAG GCTCGGATCCTTAATCCAGGTCAGCAAAAAAC
pET-HEN1-R ¹ LR ²	AATACGACTCACTATAGGG CTCCGTCGACTTACAGGTCAGCAAAAACTTAC
pET-HEN1-P	AATACGACTCACTATAGGG CCAGCTCAGCTCATGATGGCCCTTTCCTCC
pET-43.1a(+)-HEN1-R ¹	AATACGACTCACTATAGGG GGTTATGCTAGTTATTGC
pET-HEN1-K22A	TACATCAGAAGTTTGGTGCTGCAGCAAGC AGCATATTCACCCACAGTC
pET-HEN1-KK69-70AA	AATACGACTCACTATAGGG CAGAATCCTTCGCCGCCTTGAAGACATTTG AATACGACTCACTATAGGG
pET-HEN1-KKKK68-71SAAS	AGCATATTCACCCACAGTC TTCAGAATCCGACGCCGCCGAGAAGACATTTGAC

AATACGACTCACTATAGGG
 AGCATATTCACCCACAGTC
 pET-HEN1-H397A CGGCCTGTTCTGCGCTCAGCACCGACTAG
TGCATATTCAACACGTTGTTTTGAAAG
 GTGGAGTCAGATCCTTTCTTGG
 pET-HEN1-RH389,397AA GGTCCACTCCCCGCAGAGATTCTCGGC
TGCATATTCAACACGTTGTTTTGAAAG
 GTGGAGTCAGATCCTTTCTTGG
 pET-HEN1-RHK389,397,477AAA GAAAATTCTATGAGGCAGAAAATGATGC
TGCATATTCAACACGTTGTTTTGAAAG
 GTGGAGTCAGATCCTTTCTTGG
 pET-HEN1-*mut* GATTGTGCACGCTTCTCTGCCGATGCTGCATTG
TCTGTGGTTACCGATGGAAG
 ATGCTTTTCTGTGACTGG
 pET-HEN1-PM-*mut* GATTGTGCACGCTTCTCTGCCGATGCTGCATTG
TTTCGCAGAAACGTGGCTG
 AGCATATTCACCCACAGTC
 pET-HEN1-Δ38-45 ACTCTTCTCAGAGTGGTGGAAAAGGTCCATGTCTC
CTTTGGATCCTTACCTGGATATCATCACTTG
 AATACGACTCACTATAGGG
 pET-HEN1-PM-*mut2* CAATTAGCCGATTCCAGGATCCACTGCCAAAGACAAA
AATACGACTCACTATAGGG
 GGTTATGCTAGTTATTGC
 pJG4-5-HEN1 GCGAATTCATGGCCGGTGGTGGGAAGCATACTCC
 CCTCGCTCGAGTCAAAGATCAGTCTTTTTCTTTTC
 pEG202-HEN1 GCGAATTCATGGCCGGTGGTGGGAAGCATACTCC
 CCTCGCTCGAGTCAAAGATCAGTCTTTTTCTTTTC
 pJG4-5-HEN1-P GCGAATTCATGAAGGAACACAGTTCTGAATC
 TTGGTCGACTCATGATGGCCCTTCACTCCC
 pGEX-HYL1-R^{1R2} IGGATCCCCCGTGAAAATGACCTCCACTG
 GAATTCTCAAGTGTCTGACTGGATCGCTAAAA
 pGEX-HYL1-R¹ IGGATCCCCCGTGAAAATGACCTCCACTG
 GGAATTCTCATTTTGTAAATCCCGGAGAGC
 pGEX-HYL1-R² GTTGGATCCATGGGATTATGCAAGAACCTAC
 GAATTCTCAAGTGTCTGACTGGATCGCTAAAA
 pJG4-5-HYL1 GCGAATTCATGACCTCCACTGATGTTTCCTC
 CTCCTCGAGCTATGCGTGGCTTGCTTCTGT
 pJG4-5-HYL1-R² GTTGAATTCATGGGATTATGCAAGAACCTAC
 GGCTCGAGTCAAGTGTCTGACTGGATCGCTAAAAAG
 pEG202-HYL1 GCGAATTCATGACCTCCACTGATGTTTCCTC
 CTCCTCGAGCTATGCGTGGCTTGCTTCTGT
 pEG202-HYL1-R² GTTGAATTCATGGGATTATGCAAGAACCTAC
 GGCTCGAGTCAAGTGTCTGACTGGATCGCTAAAAAG
 pGEX-DCL1-Helikazinis CGCTGCCATATGTTAATTCCTCTCTCAACC
 GTAAGCATATGGAACGTAAAGAG
 pGEX-DCL1-DUF283 CAGGCATATGTTAATCATCTTGGTC
 GGTGCCCATATGAGCTTGAATTCC
 pGEX-DCL1-PAZ GAATCTTTGACATATGTTAAGGATAACTAATC
 CGATGTTTCATATGGCTTCTGGATTG
 pGEX-DCL1-R^{1R2} GAGACACTTCATATGCATCC
 CAGTGGTGGTGCATATGTTAAGAAAAAG
 pJG4-5-DCL1-Helikazinis GAGTGAATTCATGGAACGTAAAG
 GAGATGAATTCTCATGTATCTTTG
 pJG4-5-DCL1-PAZ TTCGATGAATTCATGGCTTCTGG
 TGAGAATTCTCAAGGATAACTAATC
 pJG4-5-DCL1-R^{1R2} AGAGACAGAATTCATGCATCCGG
 TGGTGGTGGAAATTCAGAAAAAG
 pJG4-5-DCL1-DUF283 GCAACTGGTCTCGAGATGAGCTTG
 AGGAACAGGCTCGAGTCAATCATC
 pGEX-SE-core AGAATTCATGGGATTGATGTCATACAAAAC

pJG4-5-SE	GTGCTCGAGTCAATAGTTCTGAAAATACAGTTCTT CGAAGAATTCATGGCCGATGTTAATCTTCCTCC
pEG202-NLS-SE-core	GTGCTCGAGTCACAAGCTCCTGTAATCAATAACGGT AGAATTCATGGGATTGATGTCATACAAAC GTGCTCGAGTCAATAGTTCTGAAAATACAGTTCTT

2.2 lentelė. Sintetiniai RNR ir DNR oligonukleotidai, skirti viengrandinių, dvigrandinių RNR ir DNR substratų paruošimui

Oligonukleotido pavadinimas	Jo nukleotidų seka (parašyta 5'→3' kryptimi)	Tikslas, kuriam oligonukleotidas naudotas
miR173	UUCGCUUGCAGAGAGAAAUCAC	Viengrandinė miR173 ir dvigrandinės miR173/miR173* gavimas
miR173*	GAUUCUCUGUGUAAGCGAAAG	Viengrandinė miR173* ir dvigrandinės miR173/miR173* gavimas
miR173 ^{CH3}	UUCGCUUGCAGAGAGAAAUCAmC	Dvigrandinių hemimetilintos miR173 ^{CH3} /miR173* ir pilnai metilintos miR173 ^{CH3} /miR173* ^{CH3} gavimas
miR173* ^{CH3}	GAUUCUCUGUGUAAGCGAAAmG	Dvigrandinių hemimetilintos miR173/miR173* ^{CH3} ir pilnai metilintos miR173 ^{CH3} /miR173* ^{CH3} gavimas
siR173	UUAACGCUUGCAGAGAGAAUCAC	Viengrandinė siR173 ir dvigrandinės siR173/siR173* gavimas
siR173*	GAUUCUCUCUGCAAGCGUUAAG	Dvigrandinės siR173/siR173* gavimas
piRNR let-7a2	UGAGAGUGGCAUCUAAAUGUUUAGUGGA UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	Viengrandinė piRNR Dvigrandinės let-7a2/let-7a2* gavimas
let-7a2*	CUAUACAAUCUACUGUCUUUCC	Dvigrandinės let-7a2/let-7a2* gavimas
siR173DNR	TTAACGCTTGCAAGCGTAAAG	Viengrandinė siR173DNR ir dvigrandinės siR173DNR/siR173*DNR gavimas
siR173*DNR	GATTCTCTCTGCAAGCGTAAAG	Dvigrandinės siR173DNR/siR173*DNR gavimas
miR173DNR	TTCGCTTACACAGAGAATCAC	Viengrandinė miR173DNR ir dvigrandinės miR173DNR/miR173*DN R gavimas
miR173*DNR	GATTTCTCTCTGCAAGCGAAAG	Dvigrandinės miR173DNR/miR173*DN R gavimas

Pastaba: mC ir mG pažymėti RNR oligonukleotidų 3' galiniai citozinas ir guaninas, turintys metilgrupę ribozės 2'-O padėtyje.

2.1.4. Baltymų preparatai

Thermo Fischer Scientific: visos darbe naudotos restrikcijos endonukleazės; DNR polimerazių mišinys High Fidelity PCR Enzyme Mix; Phusion High-Fidelity DNA Polymerase; Taq DNA Polymerase; T4 DNA Polymerase; šarminė fosfatazė FastAp; T4 DNA Ligase; Proteinase K; polinukleotidkinazė T4 PNK; ribonukleazių inhibitorius RiboLock; nudažytų baltymų molekulinės masės žymeklis PageRuler Prestained Protein Ladder; nedažytų baltymų molekulinės masės žymeklis Protein Molecular Weight Marker.

Pierce: jaučio serumo albuminas (JSA; 2 mg/ml).

GE Healthcare Life Sciences: trombinas (1 U/μl); ožio polikloniniai antikūnai specifiniai glutationo S-transferazei (anti-GST).

Merck: L-metioninas.

Carl Roth: L-valinas; L-treoninas; L-fenilalaninas; L-leucinas; L-histidinas; L-argininas; L-izoleucinas; L-tirozinas; glicinas.

Fluka: L-triptofanas; L-lizinas.

Dako: triušio polikloniniai antikūnai specifiniai ožio antikūnams (anti-goat), konjuguoti su krienų peroksidaze; ožio polikloniniai antikūnai specifiniai triušio antikūnams (anti-rabbit), konjuguoti su krienų peroksidaze.

Qiagen: pelės monokloniniai antikūnai specifiniai 4xHis (anti-His).

Bio-Rad: ožio polikloniniai antikūnai specifiniai pelės antikūnams (anti-mouse), konjuguoti su krienų peroksidaze.

Clontech: triušio polikloniniai antikūnai specifiniai hemaglutinino (HA) epitopui (anti-HA).

Sigma-Aldrich: jaučio serumo albuminas.

Amresco: pepstatinas.

2.1.5. Ląstelės

Escherichia coli ER2267: F' *proA*⁺*B*⁺*lacI*^qΔ(*lacZ*)*M15zzf*::mini-Tn10 (Km^r) Δ(*argF-lac*)*U169glnV44* e14⁻(McrA⁻) *recA1* *endA1**thi-1*Δ(*mcrC-mrr*)*114::IS10rfbD1?* *relA1?* *spoT1?* (*New England Biolabs*).

Escherichia coli BL21-CodonPlus(DE3)-RIL: F⁻ *ompT* *hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r*gal* λ(DE3) *endA* Hte [*argU* *ileY* *leuW* Cam^r] (*Agilent Technologies*).

S. cerevisiae EGY48: MATa, *ura3*, *his3*, *trp1*, *leu2*, 6 *LexAop-LEU2* (*OriGene Technologies*; gautos iš dr. A. Gedvilaitės (Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas)).

2.1.6. Mitybinės terpės ir joms skirti tirpalai

Agarizuota LB terpė: 2 % agarą; 1 % peptono; 0,5 % mielių ekstrakto; 0,5 % NaCl tirpalas vandenyje.

LB terpė: 1 % peptono; 0,5 % mielių ekstrakto; 0,5 % NaCl tirpalas vandenyje.

Agarizuota M9 terpė: 1,5 % agarą; 1× M9 druskų tirpalo; 0,4 % gliukozės; 2 mM MgSO₄; 0,1 mM CaCl₂; 0,02 g/L Trp, His ir Met ar. ir 0,0006 % tiamino tirpalas vandenyje.

M9 terpė: 1× M9 druskų tirpalo; 0,4 % gliukozės; 2 mM MgSO₄; 0,1 mM CaCl₂; 0,02 g/L Trp, His ir Met ar.; 0,0006 % tiamino tirpalas vandenyje.

5x M9 druskų tirpalas: 42,6 g/L Na₂HPO₄×2H₂O; 15 g/L KH₂PO₄; 2,5 g/L NaCl ir 5 g/L NH₄Cl tirpalas vandenyje.

4,05 % agarą tirpalas: 15 g agarą 370 ml vandens.

Ampicilino tirpalas: 100 mg/ml ampicilino tirpalas vandenyje.

Kanamicino tirpalas: 30 mg/ml kanamicino tirpalas vandenyje.

Chloramfenikolio tirpalas: 25 mg/ml chloramfenikolio tirpalas 96 % etanolyje.

IPTG tirpalas: 1 M IPTG vandenyje.

YPD terpė: 20 g/L peptono; 10 g/L mielių ekstrakto; 20 g/L gliukozės tirpalas vandenyje.

Agarizuota YPD terpė: 20 g/L peptono; 10 g/L mielių ekstrakto; 20 g/L gliukozės; 20 g/L agarą tirpalas vandenyje.

10x aminorūgščių ir heterociklinių bazių tirpalas: 200 mg/L L-adenino; 200 mg/L L-arginino; 300 mg/L izoleucino; 300 mg/L L-lizino; 200 mg/L metionino; 500 mg/L fenilalanino; 2000 mg/L L-treonino; 300 mg/L L-tirozino; 1500 mg/L L-valino tirpalas vandenyje.

Gliukozinė terpė*: 1,7 g/L YNB; 1x aminorūgščių ir heterociklinių bazių tirpalo; 20 g/L gliukozės tirpalas vandenyje.

Agarizuota gliukozinė terpė*: 1,7 g/L YNB; 20 g/L gliukozės; 1x aminorūgščių ir heterociklinių bazių tirpalo; 20 g/L agaro tirpalas vandenyje.

10x DM-P tirpalas: 70 g/L Na₂HPO₄; 30 g/L NaH₂PO₄ tirpalas vandenyje.

X-gal tirpalas: 10 mg/ml X-gal N, N-dimetilformamide.

Agarizuota galaktozinė terpė*: 1,7 g/L YNB; 20 g/L galaktozės; 10 g/L rafinozės; 1x aminorūgščių ir heterociklinių bazių tirpalo; 1x DM-P tirpalo; 0,08 mg/ml X-gal; 20 g/L agaro tirpalas vandenyje.

Ura tirpalas: 4 g/L L-uracilo tirpalas vandenyje.

His tirpalas: 4 g/L L-histidino tirpalas vandenyje.

Trp tirpalas: 4 g/L L-triptofano tirpalas vandenyje.

Leu tirpalas: 20 g/L L-leucino tirpalas vandenyje.

Gal/-Leu terpė: 1,7 g/L YNB; 20 g/L galaktozės; 10 g/L rafinozės; 1x aminorūgščių ir heterociklinių bazių tirpalo; 1x DM-P tirpalo; 0,08 mg/ml X-gal; 20 g/L agaro tirpalas vandenyje.

Gal/+Leu terpė: 1,7 g/L YNB; 20 g/L galaktozės; 10 g/L rafinozės; 1x aminorūgščių ir heterociklinių bazių tirpalo; 1x DM-P tirpalo; 0,08 mg/ml X-gal; 20 g/L agaro; 100 mg/L Leu tirpalas vandenyje.

Glu/-Leu terpė: 1,7 g/L YNB; 20 g/L gliukozės; 1x aminorūgščių ir heterociklinių bazių tirpalo; 1x DM-P tirpalo; 0,08 mg/ml X-gal; 20 g/L agaro tirpalas vandenyje.

Gliukozinė terpė*: 1,7 g/L YNB; 1x aminorūgščių ir heterociklinių bazių tirpalo; 20 g/L galaktozės; 10 g/L rafinozės tirpalas vandenyje.

* Ruošiant gliukozinę, galaktozinę ar agarizuotas gliukozinę, galaktozinę terpes mielių, turinčių tam tikras "DupLex-A" sistemos plazmidines DNR, auginimui į jas pridėta atitinkamos aminorūgšties ar heterociklinės bazės iki tokių galutinių koncentracijų: 20 mg/L Ura, 20 mg/L His, 20 mg/L Trp, 100 mg/L Leu. Pažymėtina, norint palaikyti pSH18-34, pJK101 plazmides EGY48 ląstelėse jų auginimui naudojamoje terpėje neturi būti uracilo, norint palaikyti pEG202-NLS pagrindu sukonstruotas plazmides bei pRHF1, pSH17-4 – histidino, o pJG4-5 vektoriaus pagrindu sukonstruotas – triptofano aminorūgšties.

2.1.7. Tirpalai

Darbe naudojami vandeniniai tirpalai, jei nenurodyta kitaip.

Tirpalai DNR elektroforezei

BE buferis (pH 8,2; 1x): 100 mM H₃BO₃; 2 mM EDTA; 15 mM CH₃COOH.

Agarozė: 0,8 – 1,5 % agarozės “TopVision Agarose” BE buferyje.

Etidžio bromidas: 2 mg/ml.

Tirpalai, skirti rekombinantinių baltymų gryninimui iš *E. coli* ląstelių

Biomasės ardymo buferis (pH 7,6): 50 mM Na₂HPO₄; 10 % (w/v) sacharozė; 3 mM MgCl₂·6H₂O; 1M NaCl.

Pepstatino tirpalas: 2 mM pepstatino metanolyje.

PMSF tirpalas: 250 mM PMSF metanolyje.

Triton X-100 tirpalas: 20 % (v/v) Triton X-100 tirpalas.

His-A buferis (pH 6,2): 50 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 10 % (w/v) sacharozė; 3 mM MgCl₂·6H₂O; 1 M NaCl; 5,6 mM β-merkaptioetanolis; 0,1 % (v/v) Triton X-100.

His-B buferis (pH 6,2): 50 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 10 % (w/v) sacharozė; 3 mM MgCl₂·6H₂O; 1 M NaCl; 5,6 mM β-merkaptioetanolis; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 1 M imidazolas.

His-C buferis (pH 6,2): 50 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 10 % (w/v) sacharozė; 3 mM MgCl₂·6H₂O; 250 mM NaCl; 5,6 mM β-merkaptioetanolis; 0,1 % (v/v) Triton X-100.

His-D buferis (pH 7,5): 50 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 250 mM NaCl; 2 mM DTT; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 50 % (v/v) glicerolis.

GST-A buferis (pH 7,2): 50 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 10 % (w/v) sacharozė; 0,5 M NaCl; 1 mM DTT; 0,1 % (v/v) Triton X-100.

GST-B buferis (pH 7,2): 50 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 10 % (w/v) sacharozė; 0,5 M NaCl; 1 mM DTT; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 10 mM redukuotas glutationas.

GST-C buferis (pH 7,2): 10 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 10 % (w/v) sacharozė; 0,25 M NaCl; 1 mM DTT; 0,1 % (v/v) Triton X-100.

Pastaba: gryninant HYL1-R² baltymą sulietą su GST, naudoti GST-A, GST-C buferiai, kurių pH 6,5, o GST-B buferis – pH 8,0. Gryninant sutrumpintus DCL1 baltymus (DCL1-Helikazinis, DCL1-PAZ, DCL1-DUF283 ir DCL1-R¹R²) sulietus su GST, naudoti GST-A, GST-B ir GST-C buferiai, turintys 5 mM MgCl₂.

Tirpalai baltymų elektroforezei PAAG denatūruojančiomis sąlygomis

2,5x baltymų dažo tirpalas: 0,25 M Tris-HCl (pH 6,8); 12 % (v/v) glicerolis; 2 % (w/v) NDS; 1,5 % (w/v) DTT; 0,0005 % (w/v) bromfenolio mėlis; 0,36 M β -merkaptoetanolis.

4x skiriamąjo gelio buferis (pH 8,8): 1,5 M Tris-HCl; 0,4 % (w/v) NDS.

4x koncentruojamojo gelio buferis (pH 6,8): 0,5 M Tris-HCl; 0,4 % (w/v) NDS.

Amonio persulfato tirpalas: 10 % (w/v) amonio persulfato tirpalas.

NDS tirpalas: 10 % (w/v) natrio dodecilsulfato tirpalas.

Skiriamasis gelis: 8-12 % (v/v) akrilamido/bisakrilamido tirpalas Rotiphorese Gel 30 (37,5:1); 1x skiriamąjo gelio buferis; 0,04 % (w/v) amonio persulfatas; 0,2 % (v/v) TEMED.

Koncentruojamasis gelis: 4 % (v/v) akrilamido/bisakrilamido tirpalas Rotiphorese Gel 30 (37,5:1); 1x koncentruojamojo gelio buferis; 0,04 % (w/v) amonio persulfatas; 0,2% (v/v) TEMED.

Coomassie brilliantinio mėlio dažymo tirpalas: 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 50 % (v/v) etanolis; 10 % (v/v) CH_3COOH .

Gelio plovimo tirpalas: 10 % (v/v) CH_3COOH tirpalas.

Tirpalai viengrandinių, dvigrandinių RNR ir DNR substratų paruošimui

TE buferis (pH 7,4): 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA.

Sulydymo buferis (pH 7,4; 4x): 30 mM HEPES; 100 mM KCl; 2 mM MgCl_2 ir 0,05 U/ μl RiboLock RNazių inhibitorius.

Metilinimo aktyvumo įvertinimui, naudojant tričiu žymėtą kofaktorių AdoMet, skirti tirpalai

Stabdymo buferis (pH 7,4; 2x): 2x FEN; 0,5 % (w/v) NDS; 2 mg/ml proteinazės K; 0,4 mM AdoMet.

FEN buferis (pH 7,4; 10x): 200 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA; 100 mM NaCl.

NDS tirpalas: 10 % (w/v) natrio dodecilsulfato tirpalas.

Natrio fosfatinis buferis (pH 7,0; 200 mM): 0,115 M Na_2HPO_4 ; 0,085 M NaH_2PO_4 .

Tirpalai metilintos miR173/miR173* duplekso grandinės nustatymui denatūruojančiame poliakrilamido gelyje, atlikus IO₄⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakciją

Boratinis buferis (pH 8,6): 4,375 mM Na₂B₄O₇; 50 mM H₃BO₃.

Boratinis buferis (pH 9,5): 33,75 mM Na₂B₄O₇; 50 mM H₃BO₃.

TBE buferis (pH 8,0; 5x): 445 mM Tris-HCl; 445 mM H₃BO₃; 10 mM EDTA.

Amonio persulfato tirpalas: 10 % (w/v) amonio persulfato tirpalas.

13 % denatūruojantis poliakrilamido gelis: 13 % (v/v) akrilamido/bisakrilamido tirpalas Rotiphorese Gel 40 (19:1); 1x TBE buferis; 40 % (w/v) uriija; 0,05 % (w/v) amonio persulfatas; 0,04 % (v/v) TEMED.

Tirpalai, skirti individualių miRNR/miRNR* grandinių metilinimo greičio konstantų nustatymui, esant fermento pertekliui

FEN buferis (pH 7,4; 10x): 200 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA; 100 mM NaCl.

NDS tirpalas: 10 % (w/v) natrio dodecilsulfato tirpalas.

Proteinazės K buferis (pH 7,4; 3x): 1x FEN buferis; 1,5 % (w/v) NDS.

Tirpalai nukleorūgšties elektroforetinio judrumo pokyčio poliakrilamido gelyje (EMSA-PAAG) tyrimams

TB buferis (pH 8,3; 5x): 0,45 M Tris-HCl; 0,45 M H₃BO₃.

Amonio persulfato tirpalas: 10 % (w/v) amonio persulfato tirpalas.

Natvyvus poliakrilamido gelis: 6-8 % (v/v) akrilamido/bisakrilamido tirpalas Rotiphorese Gel 40 (19:1); 0,5x TB buferis; 0,09 % (w/v) amonio persulfatas; 0,083 % (v/v) TEMED.

Tirpalai, skirti mielių transformacijai

TE buferis (pH 7,5; 10x): 1 M Tris-HCl; 0,5 M EDTA.

LiOAc tirpalas (10x): 1,546 M CH₃COOLi.

TE-LiOAc tirpalas: 1x TE buferis; 1x LiOAc.

PEG tirpalas: 50 % (w/v) polietilenglikolio 4000 tirpalas.

TE-LiOAc-PEG tirpalas: 1x TE buferis; 1x LiOAc PEG tirpale.

Silkių sėklidžių DNR tirpalas: 10 mg/ml silkių sėklidžių DNR tirpalas.

Imunoblotui skirti tirpalai

Pernešimo buferis (pH 8,3): 19,3 mM Tris-HCl; 192 mM glicino; 15 % (v/v) metanolio.

Blokavimo buferis (pH 7,4): 3 % (w/v) jaučio serumo albumino (JSA) PBS-T buferyje.

PBS-T buferis (pH 7,4): 0,1 % (v/v) Tween-20 PBS buferyje.

PBS buferis (pH 7,4): 80 mM Na₂HPO₄; 20 mM NaH₂PO₄; 100 mM NaCl.

Ryškinimo tirpalas: 2,2 g/L metolo; 72 g/L Na₂SO₃; 8,8 g/L hidrochinono; 48 g/L Na₂CO₃; 4 g/L KBr.

Fiksavimo tirpalas: 160 g/L Na₂S₂O₃; 40 g/L NH₄Cl.

Kiti tirpalai

DMTL buferis (pH 7,4): 10 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 5 % (v/v) glicerolis DEPC veiktame vandenyje.

DMTL baltymų skiedimo buferis (pH 7,4): 10 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 0,1 mg/ml JSA; 0,02 U/μl RiboLock RNazių inhibitorius; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 2 mM DTT; 50 % (v/v) glicerolis DEPC veiktame vandenyje.

DMTL-G buferis (pH 7,4; 10x): 100 mM Tris-HCl; 500 mM NaCl; 1 mM DTT; 1% (v/v) Triton X-100.

2.1.8. Prietaisai

Thermo Fisher Scientific: spektrofotometras „NanoDrop 2000“; termostatai-inkubatoriai „Heratherm“.

Grant Instruments: vandens termostatas „Grant Y14“.

Thermolyne: blokinis termostatas „Thermolyne 17600“.

Biosan: minicentrifuga „Microspin FV-2400“; boksas darbui su DNR/RNR „UVC/T-M-AR“.

Eppendorf: centrifugos „Centrifuge 5424“ ir „Centrifuge 5417R“; PGR prietaisas „Mastercycler gradient“; blokinis termostatas-purtyklė „Thermomixer Comfort“.

BIO-RAD: vertikalios elektroforezės aparatas natyviems poliakrilamido geliams „Protean II“; horizontalios elektroforezės aparatas agarozės geliams „HU15“; vertikalios elektroforezės aparatas baltyminiams poliakrilamido geliams „Mini-PROTEAN Tetra Cell“; baltymų šlapio pernešimo aparatas „Tetra Blotting Module“;

vertikalios elektroforezės aparatas denatūruojantiems poliakrilamido geliams „Sequigen GT“.

BioTek Instruments: plokštelių skaitytuvas „Synergy H4 Hybrid Reader“.

A&D Instruments: analitinės svarstyklės “GR-202-EC”.

Consort: srovės šaltinis „Consort E833“.

Fisher Scientific: „Gel Dryer FBGD45“ vakuuminis gelių džiovavimo aparatas.

Thermo Electron: „Unicam UV 500“ spektrofotometras.

Vacuubrand: „MZ2C NT+2AK“ vakuuminis siurblys.

Hidex: scinciliacinis skaičiuoklis „Hidex 300 SL“.

Scientific Industries: maišyklė-vartyklė „Roto-Shake Genie“.

Sonics & Materials: “Vibra-Cell” ultragarso aparatas.

GE Healthcare Life Science: chromatografinė sistema “ÄKTA Prime“.

New Brunswick Scientific: „C25KC“ purtyklė; -70 °C šaldiklis „Premium U410“.

Beckman Coulter: „Avanti J-30I“ centrifuga.

Snaigė: -20 °C šaldiklis „Design Line“; šaldytuvas „Active Soft“.

Gilson: automatiniai dozatoriai.

Memmert: vandens vonelė „WB7“;

IKA-Labortechnik: maišyklė-siūbuoklė „KS-250 Basic; magnetinė maišyklė „RCT Basic S1“.

Sharp: mikrobangų krosnelė „Inverter“.

Fujifilm Life Science: radioaktyvumui jautrių ekranų skaitytuvas “FLA-5100”.

Kern & Sohn: svarstyklės “EW 2200-2NM“.

KinTek Corporation: greitų cheminių reakcijų eigos stabdymo aparatas „RQF-3“.

Edmund Buchler: vartyklė „TL-10“.

2.2. Metodai

2.2.1. Plazmidžių konstravimas

Plazmidžių konstravimui ir analizei naudoti klasikiniai genų inžinerijos, molekulinės biologijos metodai (Sambrook et Russell, 2001). Plazmidinė DNR iš *E. coli* ER2267 kamieno ląstelių išskirta naudojant “GeneJET Plasmid

Miniprep Kit” rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. Jos koncentracija nustatyta spektrofotometru “NanoDrop 2000”. DNR elektroforezė vykdyta 0,8 – 1,5 % agarozės geliuose frakcionuojant mėginius, sumaišytus su dažu „6x DNA Loading Dye“, kartu su DNR molekulinės masės žymekliu „Gene Ruler DNA Ladder Mix“, paruoštu pagal gamintojo rekomendacijas. DNR fragmentai iš agarozės gelių išgryninti vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis naudojant rinkinį „GeneJET Gel Extraction Kit“. Plazmidinės DNR kirpimui, polimerazinėms grandininėms reakcijoms, DNR viengrandinių galų bukinimui, 5‘ galinių fosfatų pašalinimui, DNR siuvimui naudoti „Thermo Fischer Scientific“ DNR preparatai, fermentai ir jų standartiniai buferiai, procedūros atliktos pagal gamintojo rekomendacijas. Ligatas, plazmidės transformuotos į imliąsias *E. coli* ER2267 kamieno ląsteles. Imliųjų, -70 °C temperatūroje saugomų, *E. coli* ląstelių paruošimui naudota Inoue metodika (Inoue et al., 1990). Sukonstruotų plazmidžių DNR nukleotidų sekos nustatytos Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Sekvenavimo centre.

2.2.1.1. HEN1 ir jo mutantinių baltymų koduojančias sekas turinčių plazmidžių konstravimas

Visos plazmidės, išskyrus skirtas tarpbaltyminės sąveikos tyrimams mielių dviejų hibridų sistema, konstruotos taip, kad koduotų mutantinį HEN1 baltymą su šešias histidino liekanas turinčiu dvidešimties aminorūgščių polipeptidu N gale.

Konstruojant pET-HEN1-R¹ (P1 pav. A), pET-HEN1-R¹L (P2 pav. A), pET-HEN1-L (P1 pav. B), pET-HEN1-R² (P1 pav. C), pET-HEN1-R¹LR² (P2 pav. B) bei pET-HEN1-P (P1 pav. D) plazmides, HEN1-R¹, HEN1-R¹L, HEN1-L, HEN1-R², HEN1-R¹LR² bei HEN1-P baltymus koduojančios sekos padaugintos polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metu panaudojant restrikcijos endonukleazių BamHI ir NdeI bei Bpu1102I ir NcoI atpažinimo sekas turinčius pradmenius (2.1 lentelė) ir atitinkamai pET-HEN1 bei pET-HEN1-PM matricas. Gauti PGR produktai kirpti BamHI, NdeI bei Bpu1102I,

NcoI fermentais ir įterpti į tomis pačiomis restrikcijos endonukleazėmis sukirtas pET-HEN1 bei pET-HEN1-PM plazmides. Norint gauti pET-43.1a(+)-HEN1-R¹ plazmidę (P1 pav. E), koduojančią metiltransferazės R¹ domeną N gale sulietą su NusA baltymu, HEN1-R¹ baltymo genas padaugintas PGR pasitelkus pradmenis (2.1 lentelė) bei matricą pET-HEN1-R¹ plazmidę. Po PGR produkto kirpimo NcoI ir susidariusio lipnaus galo bukinimo T4 DNR polimeraze, atliktas jo kirpimas BamHI. Gautas DNR fragmentas turintis buką ir lipnų galą susiūtas su BoxI ir BamHI kirptu pET-43.1a(+) vektoriumi.

Norint gauti plazmides su pakeistas ar. ar aminorūgščių delecijas turinčių baltymų genais, pasitelktas taikiniui specifinės mutagenezės, naudojant megapradmenį, metodas (Sambrook et Russell, 2001). Šiuo metodu konstruojant pET-HEN1-K22A (P3 pav. A), pET-HEN1-KK69,70AA (P3 pav. B), pET-HEN1-KKKK68-71SAAS (P3 pav. C), pET-HEN1-H397A ar pET-HEN1-RH389,397AA, pET-HEN1-RHK389,397,477AAA (P3 pav. D) plazmides, mutaciją turintis (2.1 lentelė; keičiami nukleotidai pabraukti) ir antrasis (2.1 lentelė; nukleotidų seka parašyta pajuodintu šriftu) pradmenys bei pET-HEN1 ar pET-HEN1-H397A, pET-HEN1-RH389,397AA matrica panaudoti pirmosios PGR reakcijos, skirtos megapradmens gavimui, metu. Su gautu megapradmeniu bei antruoju, trečiuoju (2.1 lentelė) pradmenimis bei trūkį turinčia atitinkama matrica atliekama antroji polimerazės grandininė reakcija. Padauginti, HEN1-K22A, HEN1-KK69,70AA, HEN1-KKKK68-71SAAS baltymus koduojantys fragmentai kirpti su NdeI ir įstatyti į tokia pačia restrikcijos endonukleaze kirptą pET-HEN1 plazmidę, o PGR produktai su HEN1-H397A ar HEN1-RH389,397AA, HEN1-RHK389,397,477AAA baltymus koduojančiomis sekomis po kirpimo OliI, Mph1103I susiūti su pastaraisiais fermentais kirptomis pET-HEN1 ar atitinkamai pET-HEN1-H397A, pET-HEN1-RH389,397AA plazmidėmis. Tuo pačiu metodu konstruotos pET-HEN1-*mut* (P3 pav. E) bei pET-HEN1-PM-*mut* (P2 pav. C) plazmidės. Dviejų PGR metu, panaudojant atitinkamai pET-HEN1 bei pET-HEN1-PM matricas ir pradmenis (2.1 lentelė), padaugintas HEN1-*mut* koduojantis produktas kirptas su PasiI, AatII, o HEN1-PM-*mut* – su Ecl136II,

XagI. Šie kirpti fragmentai atitinkamai susiūti su tomis pačiomis restrikcijos endonukleazėmis kirptomis pET-HEN1 bei pET-HEN1-PM plazmidėmis. Konstruojant pET-HEN1- Δ 38-45 (P3 pav. F) ir pET-HEN1-PM-*mut2* (P2 pav. D) plazmidės, polimerazės grandininės reakcijos atliktos pasitelkiant pradmenis (2.1 lenetelė) bei matricą pET-HEN1 ir pET-HEN1-PM. Po dviejų PGR HEN1- Δ 38-45 koduojanti seka kirpta NcoI, Mph1103I ir įterpta į su pastarosiomis restrikcijos endonukleazėmis kirptą pET-HEN1 plazmidę, o padauginta DNR seka turinti HEN1-PM-*mut2* geną, po paveikimo NcoI, Bpu1102I fermentais, susiūta su NcoI, Bpu1102I kirpta pET-HEN1-PM plazmide.

Norint nustatyti baltymus sąveikaujančius su metiltransferaze mielių dviejų hibridų sistema, konstruotos pilno ilgio HEN1 koduojančios pJG4-5-HEN1 (P4 pav. B) ir pEG202-HEN1 plazmidės. Polimerazės grandininės reakcijos metu, panaudojant pradmenis su įterptais EcoRI ir XhoI atpažinimo taikiniai (2.1 lenetelė) bei matricą pET-HEN1, padauginta metiltransferazę koduojanti seka. Ji sukirpta su EcoRI, XhoI ir įterpta į tais pačiais fermentais kirptus pJG4-5 ir pEG202 vektorius. pEG202-NLS-HEN1 (P4 pav. A) plazmidė gauta, po pEG202-HEN1 plazmidės kirpimo EcoRI, Sall išskirtą HEN1 koduojančią seką įklonavus į pastarosiomis restrikcijos endonukleazėmis kirptą pEG202-NLS vektorių. Baltymų tarpdomeninių sąveikų tyrimui mielių dviejų hibridų sistema, konstruota metiltransferazės P domeną koduojanti plazmidė pJG4-5-HEN1-P (P4 pav. C). Po PGR, pasitelkus matricą pET-HEN1-P ir pradmenis su EcoRI ir Sall atpažinimo taikiniai (2.1 lenetelė), gautas produktas veiktas EcoRI, Sall. Šiomis restrikcijos endonukleazėmis kirptas fragmentas susiūtas su EcoRI, Sall fermentais kirptu pJG4-5 vektoriumi.

2.2.1.2. HYL1 ir jo domenų koduojančias sekas turinčių plazmidžių konstravimas

Konstruojant pGEX-HYL1-R¹R² (P5 pav. A), pGEX-HYL1-R¹ (P5 pav. B) ir pGEX-HYL1-R² (P5 pav. C) plazmidės, PGR metu pasitelkiant matrica pGEX-HYL1 plazmidę ir pradmenis (2.1 lentelė) su EcoRI ir BamHI atpažinimo taikiniams padaugintos HYL1 abu R domenų R¹R², pirmąjį R¹ ir antrąjį R² domenų koduojančios sekos. Jos sukirtos su EcoRI, BamHI ir susiūtos su tokiais pačiais fermentais kirpta pGEX-HYL1 plazmidė suliejant su GST genu.

HYL1 ir jo antrojo dgRNR surišančio domeno R² tarpbaltyminės sąveikos tyrimams mielių dviejų hibridų sistema, konstruotos pilno ilgio HYL1 ir jo R² domeną koduojančios pJG4-5-HYL1 (P6 pav. A) ir pJG4-5-HYL1-R² bei pEG202-HYL1 ir pEG202-HYL1-R² plazmidės. PGR, panaudojant pradmenis turinčius EcoRI ir XhoI atpažinimo sekas (2.1 lentelė) bei atitinkamą matricą pET-HYL1 ir pGEX-HYL1-R², produktai sukirti su EcoRI, XhoI ir įterpti į šiomis restrikcijos endonukleazėmis kirptus pJG4-5 bei pEG202 vektorius. pEG202-NLS-HYL1 (P6 pav. B) ir pEG202-NLS-HYL1-R² (P6 pav. C) plazmidės gautos, EcoRI ir Sall fermentais iškirpus iš pJG4-5-HYL1 ir pJG4-5-HYL1-R² plazmidžių pilno ilgio HYL1 ir jo R² domeną koduojančias sekas ir jas įterpus į tokiomis pačiomis restrikcijos endonukleazėmis kirptą pEG202-NLS vektorių.

2.2.1.3. SERRATE, jo centrinės dalies SE-core ir DCL1 domenų koduojančias sekas turinčių plazmidžių konstravimas

pGEX-DCL1 plazmidė sukonstruota, SmaI, PacI fermentais iškirpus DCL1 geną turinčią seką iš pBA-DCL1 plazmidės ir po bukinimo įterpus ją į restrikcijos endonukleazę Sall, o po to T4 DNR polimeraze veiktą pGEX-5x-1 vektorių. Gauta pGEX-DCL1 plazmidė panaudota matrica kartu su pradmenimis turinčiais NdeI atpažinimo sekas (2.1 lentelė) polimerazės grandininėje reakcijoje norint padauginti DCL1-Helikazinis, DCL1-DUF283,

DCL1-PAZ ir DCL1-R¹R² baltymų genus. Po kirpimo NdeI ir bukinimo, PGR produktai susiūti su EcoRI fermentu, o po to T4 DNR polimeraze paveiktu pGEX-5x-1 vektoriumi, atitinkamai gaunant pGEX-DCL1-Helikazinis (P7 pav. A), pGEX-DCL1-DUF283 (P7 pav. B), pGEX-DCL1-PAZ (P7 pav. C) ir pGEX-DCL1-R¹R² (P7 pav. D) plazmidės.

DCL1 ir HEN1 tarpbaltyminių sąveikų tyrimui mielių dviejų hibridų sistema, konstruotos pJG4-5-DCL1-Helikazinis (P8 pav. A), pJG4-5-DCL1-PAZ (P8 pav. B), pJG4-5-DCL1-R¹R² (P8 pav. C) ir pJG4-5-DCL1-DUF283 (P8 pav. D) plazmidės. Norint gauti DCL1 helikazinį, PAZ, R¹R² ir DUF283 domenus koduojančias sekas, atliktas PGR pasitelkiant matrica pGEX-DCL1 bei pradmenis atitinkamai turinčius EcoRI ir XhoI atpažinimo sekas (2.1 lentelė). Padauginti DCL1-Helikazinis, DCL1-PAZ, DCL1-R¹R² baltymų genai kirpti EcoRI ir įterpti į šia restrikcijos endonukleaze kirptą pJG4-5 vektorių, o DCL1-DUF283 baltymo genas, po veikimo XhoI, susiūtas su pastaruoju fermentu kirptu pJG4-5 vektoriumi.

Konstruojant pGEX-SE-core (P7 pav. E) plazmidę, koduojančią centrinę SERRATE (SE) baltymo dalį N gale sulietą su GST, SE-core genas padaugintas polimerazės grandininėje reakcijoje naudojant matrica pET28b-SE-core bei pradmenis su EcoRI ir XhoI atpažinimo taikiniais (2.1 lenetelė). Po kirpimo EcoRI, XhoI, gautas PGR produktas susiūtas su tokiais pačiais fermentais kirptu pGEX-5x-1 vektoriumi.

SE, SE-core sąveikos su HEN1 tyrimams mielių dviejų hibridų sistema, konstruotos pJG4-5-SE (P8 pav. E) ir pEG202-NLS-SE-core (P8 pav. F) plazmidės. Norint gauti pilno ilgio SE ir jo centrinės dalies koduojančias sekas, atliktas PGR pasitelkiant atitinkamai matrica pET28b-SE ir pET28b-SE-core plazmidės bei pradmenis turinčius EcoRI ir XhoI atpažinimo sekas (2.1 lentelė). Padauginti SE ir SE-core genai kirpti EcoRI, XhoI ir įterpti į šiomis restrikcijos endonukleazėmis kirptus pJG4-5 ir pEG202-NLS vektorius.

2.2.2. *E. coli* imliųjų ląstelių transformacija

Plazmidžių padauginimui ir išskyrimui naudotos imliosios *E. coli* ER2267 kamieno ląstelės, paruoštos pagal Inoue metodiką (Inoue et al., 1990) ir saugomos -70 °C temperatūroje. 0,2 ml šių ląstelių sumaišoma su iki 0,02 ml tūrio ligavimo mišinio arba ne daugiau nei 0,1 µg plazmidinės DNR ir 30 min. laikoma ledo vonioje. Po 1,5 min. temperatūrinio šoko 42 °C vandens termostate, mišinys 1 min. perkeliamas į ledo vonią. Tuomet įpilama maždaug 1,3 ml LB terpės ir ląstelės 1 val. inkubuojamos 37 °C temperatūroje 1400 rpm greičiu besisukančiame blokiniame termostate-purtyklėje. Nusodintos, centrifuguojant iki kol pasiekiamas 14000 rpm greitis, bakterijos užsėjamos ant agarizuotos LB terpės, turinčios 100 µg/ml ampicilino ir 15 µg/ml kanamicino. Transformuotos ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje per naktį (~14-16 val.).

2.2.3. Bakterijų auginimas ir rekombinantinių baltymų sintezės indukcija

Baltymų raiškai skirta *E. coli* kamieno BL21-CodonPlus(DE3)-RIL ląstelės transformuotos (2.2.2. skyrius) plazmidėmis, koduojančiomis su šešių histidino ar. inkaru ar GST sulietą tiriamą baltymą, išsėtos ant agarizuotos LB terpės, turinčios 100 µg/ml ampicilino ir 10 µg/ml chloramfenikolio. Po to producentai auginti 5 ml LB terpėje su atitinkamais antibiotikais per naktį 37 °C temperatūroje 200 rpm greičiu besisukančioje purtyklėje. Ryte naktinė kultūra 100 kartų praskiesta tokia pačia LB terpe ir toliau auginta kol pasiekia 0,6-0,8 optinį tankį ($\lambda = 600$ nm). Tada temperatūra sumažinta iki 16 °C ir rekombinantinių baltymų sintezė ląstelėse indukuota pridėjus 0,1 mM IPTG. Po 16-18 val. auginimo bakterijos atskirtos nuo terpės 15 min. jas centrifuguojant 3500 rpm greičiu 4 °C temperatūroje. Praplauta vandeniu ir nuo jo atskirta 15 min. centrifuguojant 4500 rpm greičiu 4 °C temperatūroje, surinkta biomasė užšaldyta ir laikyta -20 °C temperatūroje.

Su GST sulietų SE-core bei DCL1-Helikazinis, DCL1-R¹R², DCL1-DUF283 baltymų sintezė *E. coli* kamieno BL21-CodonPlus(DE3)-RIL

ląstelėse vykdyta panašiomis sąlygomis, tik vietoj LB naudota minimali M9 terpė ir baltymų indukcijai pridėta 0,4 mM IPTG.

2.2.4. Rekombinantinių baltymų gryninimas

Visos baltymų gryninimo procedūros atliktos +4°C.

2.2.4.1. *E. coli* ląstelių biomasės paruošimas gryninimui

Ant biomasės užpilama 25 ml biomasės ardymo buferio, turinčio Roche proteazių inhibitorių mišinio ir 1 μM pepstatino, 0,5 mM PMSF bei 0,1 % Triton X-100. Po suspendavimo ji ardoma ultragarsu, nustačius 6 min. pulsinį režimą (pulsas kas sekundę). Tuomet bakterijų ląstelių lizatas centrifuguojamas 20 min. 25000 rpm greičiu. Supernatantas surenkamas ir filtruojamas per 0,45 μm filtrą.

2.2.4.2. Šešių histidinių inkarą turinčių rekombinantinių baltymų gryninimas

Į pagal gamintojo rekomendacijas paruoštą HiTrap IMAC HP kolonėlę 1 ml/min. greičiu užnešamas perfiltruotas supernatantas. Kolonėlė prijungiama prie ÄKTA prime chromatografinės sistemos, paruoštos pagal gamintojo rekomendacijas. Priemaišiniai baltymai iš kolonėlės pašalinami ją plaunant 3 ml/min. greičiu His-A buferiu, o tuomet 5, 10 ir 15 procentų His-B buferiu. Tikslinis baltymas atplaunamas 1 ml/min. greičiu panaudojant 20 ml tiesinį gradientą: didinant His-B buferio koncentraciją nuo 15 % iki 100 %. Eliuatas surenkamas mažais tūriais (0,9 ml), frakcijomis. Eliucijos metu matuojant sugertį ($\lambda = 280$ nm) atsirinktos frakcijos, turinčios gryninamą baltymą, analizuojamos geliuose po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis. Tikslinio baltymo turinčios frakcijos apjungiamos ir panaudojant koncentravimo mėgintuvėlius, turinčius membranas, kurių MWCO yra 9000 Da arba 20000 Da, koncentruojamos pagal gamintojo rekomendacijas.

Šia metodika išgryninti pilno ilgio HYL1, HEN1 baltymai bei mutantiniai metiltransferazės baltymai N gale sulieti su šešių histidinių inkarą turinčiu dvidešimties aminorūgščių polipeptidu.

2.2.4.3. Su glutationo S-transferaze (GST) sulietų rekombinantinių baltymų gryninimas

Į pagal gamintojo rekomendacijas paruoštą GSTrap HP kolonėlę 0,2 ml/min. greičiu užnešamas perfiltruotas supernatantas. Kolonėlė prijungiama prie AKTA prime chromatografinės sistemos. Priemaišiniai baltymai iš kolonėlės pašalinami ją plaunant 3 ml/min. greičiu GST-A buferiu, o tuomet 5, 10 ir 15 procentų GST-B buferiu. Tikslinis baltymas eliuojamas plaunant kolonėlę 1 ml/min. greičiu GST-B buferiu. Eliuatas surenkamas mažais tūriais (0,9 ml), frakcijomis. Eliucijos metu matuojant sugertį ($\lambda = 280$ nm) atsirinktos frakcijos, turinčios gryninamą baltymą, analizuojamos geliuose po baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis. Tikslinio baltymo turinčios frakcijos apjungiamos ir panaudojant koncentravimo mėgintuvėlius, turinčius membranas, kurių MWCO yra 9000 arba 20000, koncentruojamos pagal gamintojo rekomendacijas.

Šia metodika išgryninta glutationo S-transferazė ir pilno ilgio HYL1, jo bei SE, DCL1 sutrumpinti baltymai N gale sulieti su GST.

2.2.4.4. Išgrynintų rekombinantinių baltymų paruošimas ilgalaikiam saugojimui

Sukoncentruoti baltymai dializuojami 10 kDa MWCO dializės kasetėse. Dializei naudojamas buferio tūris yra 130 kartų didesnis už dializuojamo baltymo tirpalo tūrį.

Norint iš baltyminio mėginio pašalinti AdoMet (endogeninį kofaktorių), metiltransferazinį domeną bei šešių His ar. inkarą turinčių baltymų dializė His-C buferyje vykdoma 2 val., per naktį ir 3 val. Tuomet baltymo tirpalas 4 val. dializuojamas prieš His-D buferį. Baltymo tirpalas surenkamas ir saugomas -20

°C temperatūroje. Metiltransferazinio domeno neturintys ir su šešių histidinių inkaru N gale sulieti baltymai po 2 val. dializės His-C buferyje perkeliama dializei į His-D buferį 4 val. Praėjus šiam laikui, surenkami ir saugomi -20 °C temperatūroje.

Su GST sulieti baltymai 2 val. dializuojami GST-C buferyje. Tuomet po išpilstymo mažais tūriais ir užšaldymo skystame azote, saugomi – 80 °C temperatūroje.

2.2.5. Baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (NDS-PAAG)

Į NDS turinčio PAAG takelius užnešami baltyminiai mišiniai sumaišyti su 2,5x baltymų dažo tirpalu santykiu 1,5:1 po jų denatūravimo 5 min. kaitinant 95 °C temperatūroje. Naudoti PAAG, sudaryti iš koncentruojamojo ir skiriamąjo gelių. Baltymų elektroforezė vykdoma denatūruojančiomis sąlygomis, Tris-glicino-NDS buferyje, vertikalios elektroforezės aparate naudojant: 10 min. 100 V įtampą, tuomet per 5 min. įtampą padidiant nuo 100 V iki 200 V ir dar 25 min. esant 200 V įtampai. Išfrakcionuotų baltymų molekulinės masės įvertinamos iš nudažyto gelio atsižvelgiant į šalia praleistus baltymų molekulinės masės žymenis arba iš nedažyto gelio, jei kartu frakcionuoti nudažytų baltymų molekulinės masės žymenis.

2.2.6. Baltymų poliakrilamido gelio dažymas

Po elektroforezės baltymų poliakrilamido gelis dažomas jį 3 min. kaitinant 500 W galia mikrobangų krosnelėje Coomassie brilantinio mėlio dažymo tirpale. Po to du kartus praplaunamas vandeniui jį kaitinant tokiomis pačiomis sąlygomis H₂O. Tuomet gelis blukinamas jį 3 min. kaitinant 500 W galia mikrobangų krosnelėje gelio plovimo tirpale. Po kiekvieno kaitinimo baltymų gelis 10 min. inkubuotas ant 150 rpm greičiu besisukančios maišyklės-siūbuoklės.

2.2.7. Baltymų koncentracijos nustatymas

Baltymų koncentracijos nustatytos Bradfordo metodu panaudojant plokštelių skaitytuvą ir Roti-Nanoquant tirpalą pagal gamintojo rekomendacijas. Tikslinio baltymo kiekis patikslintas išfrakcionavus baltyminį mišinį PAAG (2.2.5. ir 2.2.6. skyriai) ir įvertinus jo procentinę dalį mišinyje analizuojant elektroforegramą Multi Gauge 3.0 programa.

2.2.8. Rekombinantinio baltymo kirpimas trombino proteaze

Veikiant NusA-HEN1-R¹ baltymą trombino proteaze nuo HEN1-R¹ pašalintas NusA baltymas. 10 µg baltymo naudota 1 U/µl proteazės. Kirpimas vykdytas 24 val. kambario temperatūroje. Proteolizė įvertinta baltyminį mišinį frakcionuojant PAAG (2.2.5. ir 2.2.6. skyriai).

2.2.9. Radioaktyviu fosforu žymėtų viengrandinių, dvigrandinių RNR ir DNR substratų bei neradioaktyvaus miR173/miR173* duplekso paruošimas

Norint gauti radioaktyvų fosforą 5' gale turinčius viengrandinius RNR ar DNR substratus, į DEPC paveiktą vandenį su 1x T4 polinukleotidkinazės (PNK) A buferiu pridedama 5 µM sintetinio RNR ar DNR oligonukleotido, 10 % (v/v) [γ -³³P]-ATP ar [γ -³²P]-ATP bei 1 U/µl T4 PNK. Reakcijos mišinys 15 min. inkubuojamas 37 °C temperatūroje. Tuomet T4 PNK inaktyvavimui, jis 10 min. kaitinamas 70 °C temperatūroje. Gauti radioaktyvų fosforo izotopą 5' gale turintys RNR ar DNR oligonukleotidai saugomi -20 °C temperatūroje.

Norint paruošti radioaktyvius dvigrandinius RNR ar DNR substratus, į DEPC paveiktą vandenį su 1x sulydymo buferiu pridedama 2 µM radioaktyvų fosforo izotopą 5' gale turinčio RNR ar DNR oligonukleotido ir 4,8 µM neradioaktyvaus bei pastarajam pilnai ar dalinai komplementaraus oligonukleotido. Reakcijos mišinys 3 min. inkubuojamas 85 °C temperatūroje ir atvėsinaamas iki 4 °C mažinant temperatūrą 0,01 °C/s greičiu. Gauti radioaktyvūs 2 µM RNR ar DNR dupleksai saugomi 4 °C temperatūroje.

Neradioaktyvus miR173/miR173* dupleksas gaunamas sulydant nežymėtus miR173 ir miR173* oligonukleotidus. Naudojami vienodi šių RNR oligonukleotidų kiekiai, gaunant 50 μ M dvigrandinę miR173.

2.2.10. Pilno ilgio HEN1 ir jo mutantinių baltymų pernešamų nuo tričiu žymėto kofaktoriaus AdoMet ant miR173/miR173* metilgrupių palyginimas

Į reakcijos mišinį, sudarytą iš 1x DMTL buferio, 0,1 mg/ml JSA, 0,5 μ M miR173/miR173* duplekso ir 20 μ M [3 H-metil]-AdoMet (2,545 Ci/mmol arba 5650 dpm/pmol), pridėjus 1 μ M HEN1 ar jo mutantinio baltymo metilinimo reakcija vykdyta 30 min. 37 °C temperatūroje. Reakcija stabdyta lygiu tūriu sumaišant su stabdymo buferiu, turinčiu proteinazės K ir nežymėto AdoMet perteklių, ir inkubuojant 40 μ l mėginį 20 min. 55 °C temperatūroje. Kiekvienam mėginiui ruošiami 2-3 pakartojimai. Į kontrolinius mėginius baltymai nededami.

Mėginiai užnešami ant 2,3 cm skersmens DE-81 filtrinių popierių. Laisvas tričiu žymėtas AdoMet pašalinamas filtrinius popierius skalaujant 4 kartus po 15 min. 400 ml 50 mM natrio fosfatiniame buferyje. Po praplovimo vandeniu, 96 % etanoliu ir acetonu, išdžiovintas filtrinis popierius merkiamas į 3 ml Rotiszint Eco Plus scinciliacinio skysčio turinčią scinciliacinę kiuvetę. 3 H skilimų skaičius per minutę (dpm; angl. *desintegrations per minute*) išmatuotas scinciliaciniu skaičiuokliu Hidex 300 SL. Pilno ilgio HEN1 ir darbe naudotų mutantinių metiltransferazės baltymų, turinčių M domeną, mėginių skilimų skaičius per minutę artimas teoriškai apskaičiuotam maksimaliai įmanomam užmodifikuojant visų į mėginį įdėtų dgRNR abu 3' galus – 113000 dpm.

2.2.11. Pilno ilgio HEN1 ir jo mutantinių baltymų abiejų miR173/miR173* duplekso grandinių modifikacijos palyginimas

Norint nustatyti, ar metiltransferazinį domeną turintys mutantiniai HEN1 baltymai, kaip ir pilno ilgio metiltransferazė, modifikuoja miR173/miR173* duplekso kreipiančiąją miR173 grandinę, ruošti reakcijos mėginiai su atitinkamu baltymu. Kiekvienas jų gautas į 0,1 mg/ml JSA, 0,2 U/μl Ribolock RNazių inhibitoriaus, 100 μM neradioaktyvaus kofaktoriaus AdoMet mišinį DMTL buferyje pridėjus 0,1 μM **miR173/miR173*** duplekso, kurio kreipiančioji miR173 grandinė 5' gale pažymėta ³³P izotopu, ir 0,25 μM mutantinio HEN1 baltymo ar pilno ilgio metiltransferazės (teigiamos kontrolės mėginys). Neigiamos kontrolės mėginys paruoštas į reakcijos mišinį neįdedant baltymo. Norint palyginti mutantinių HEN1 baltymų miR173/miR173* duplekso lydinčiosios miR173* grandinės metilinimo aktyvumą su pilno ilgio metiltransferazės, ruošti tokie patys mėginiai, turintys 0,1 μM miR173/**miR173*** duplekso, kurio lydinčioji miR173* grandinė 5' gale pažymėta ³³P izotopu. Metilinimo reakcijos vykdytos mėginius 60 min. inkubuojant 37 °C temperatūroje. Praėjus šiam laikui, vykdoma IO₄⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakcija (2.2.12. skyrius). Tuomet po mėginių išfrakcionavimo 13 % denatūruojančiame poliakrilamido gelyje (2.2.12. skyrius), jis 3-36 val. eksponuojamas ant radioaktyvumui jautraus ekrano. Po jo nuskaitymo, iš gauto paveikslo miR173/miR173* duplekso metilintos, ³³P žymėtos grandinės dalis mėginyje su mutantiniu HEN1 baltymu palyginama su gautąja dalimi pilno ilgio metiltransferazės mėginyje.

2.2.12. Metilintos miRNR/miRNR* duplekso grandinės nustatymas denatūruojančiame poliakrilamido gelyje atlikus IO₄⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakciją

IO₄⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakcijos metu nuo miRNR grandinės 3' galo yra nuskeliamas paskutinis nukleozidas. Ši reakcija vyksta tik esant dviems nemodifikuotoms 3' galinio nukleotido 2'-OH ir 3'-OH grupėms. Vienu

nukleozidu sutrumpėjusi miRNR pasižymi didesniu elektroforetiniu judrumu poliakrilamido gelyje. Pažymėtina, kad denatūruojančiame PAAG frakcionuojant miRNR/miRNR* dupleksą yra stebimas tik 5' gale radioaktyviu fosforu žymėtos grandinės migravimas. Vadinasi, po **miRNR/miRNR*** duplekso metilinimo pilno ilgio metiltransferaze ar jos mutantiniu baltymu, kreipiančiosios ³³P žymėtos **miRNR** grandinės modifikacijos efektyvumas gali būti įvertintas frakcionuojant denatūruojančiame poliakrilamido gelyje metilinimo reakcijos produktą po IO₄⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakcijos: nemetilinta ir vienu nukleozidu sutrumpėjusi **miRNR** migruoja greičiau nei modifikuota **miRNR**. Pakartojus šią procedūrą su miRNR/**miRNR*** duplesku, galima įvertinti lydinčiosios ³³P žymėtos miRNR* grandinės metilinimo efektyvumą.

Prieš IO₄⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakciją mėginių dgRNR išsodinama. Tam į mėginio mišinį įpilama 1/10 jo tūrio išsodinimo mišinio, sudaryto iš 3 M NaOAc (pH 5,2) ir 10 mg/ml mielių tRNR sumaišytų santykiu 3:1. Tuomet į gautą mėginio mišinį pridedami tris tūriai 96 % etanolio. Po sumaišymo ir 30 sek. šaldymo skystame azote, mėginiai kambario temperatūroje 15 min. centrifuguojami 14000 rpm greičiu. Po supernatanto pašalinimo, pridedama keturi tūriai 75 % etanolio. Po to mėginiai kambario temperatūroje 5 min. centrifuguojami 14000 rpm greičiu. Supernatantas kruopščiai pašalinamas.

Į 17 μl boratinio buferio (pH 8,6) ištirpintas nuosėdas pridedama 3 μl 0,2 M NaIO₄ tirpalo ir kambario temperatūroje 15 min. inkubuojama tamsoje. Tiriant miR173/miR173* duplekso individualių grandinių metilinimo greičius, vieno iš dviejų (skirtų IO₄⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakcijos efektyvumo patikrinimui) kontrolinių mėginių nuosėdos ištirpinamos 20 μl boratinio buferio ir į jį nepridedama NaIO₄ tirpalo. Oksidacijos reakcija stabdoma pridedant 3 μl 66,6 % glicerolio tirpalo ir inkubuojant mėginį dar 10 min. tamsoje. Tuomet atliekamas RNR išsodinimas pagal aukščiau aprašytą išsodinimo procedūrą.

Nuosėdas kruopščiai ištirpinus 20 μ l boratinio buferio (pH 9,6), mėginiai 70 min. inkubuojami 45 °C vandens termostate. Atlikus β -eliminacijos reakciją, dalis mėginio panaudojama elektroforezei, o likusi – saugoma -20 °C temperatūroje.

Pasibaigus 13 % denatūruojančio poliakrilamido gelio 20 min. peforezei naudojant 65 W srovės galią, į takelius užnešama 3 μ l po IO_4^- oksidacijos/ β -eliminacijos gauto mėginio lygiu tūriu sumaišyto su $2\times$ RNR denatūruojančiu dažu ir 3 min. denatūruoto 90 °C temperatūroje bei 15 sek. atvėsinto ledo vonioje. Tuomet leidžiant 40 W galios srovę 5 min. užtikrinamas mėginio RNR patekimas į gelį. Po jo elektroforezė toliau tęsiama $1\times$ TBE buferyje 70 min. esant 65 W srovės galiai.

Po elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis PAAG 10 min. inkubuojamas 10 % acto rūgšties tirpale ir po nuplovimo po tekančio vandens srove bei perkėlimo ant gelių džiovinimo popieriaus jis 50–120 min. džiovinamas 65 °C temperatūros vakuuminiame gelių džiovinimo aparate. Išdžiovintas gelis suvyniojamas į polietileno plėvelę ir, uždėjus radioaktyvumui jautrų ekraną, eksponuojamas tamsoje 3-36 val. Praėjus atitinkamam laikui, ekranas nuskaitytuvu “FLA-5100”, pasirinkus raudoną lazerį ($\lambda=635$ nm) su IP filtru.

2.2.13. HEN1 ir jo mutantinių baltymų vykdomo miRNR/miRNR* duplekso individualių grandinių metilinimo greičio konstantų nustatymas esant fermento pertekliui

Eksperimentams pasirinkta nemetilinta *in vivo* HEN1 modifikuojama dvigrandinė miRNR – miR173/miR173*. Norint apskaičiuoti metilgrupės pernešimo nuo neradioaktyvaus kofaktoriaus ant ^{33}P žymėtos lydinčiosios (miRNR*) ar kreipiančiosios (miRNR) grandinės greičio konstantas, ruošiami du, A ir B mišiniai, kurių pagrindą sudaro $1\times$ DMTL buferis, 0,1 mg/ml JSA ir 0,2 U/ μ l RiboLock RNazių inhibitorius DEPC veiktame vandenyje. Į A mišinį pridedama 0,2 mM AdoMet. Į B mišinį 0,5 μ M baltymo ir 0,2 μ M

miRNR/**miRNR*** ar **miRNR**/miRNR* (pajuodintu šriftu žymima ³³P žymėta miRNR duplekso grandinė), atitinkamai norint nustatyti lydinčiosios ar kreipiančiosios grandinės metilinimo greitį. Mėginys gaunamas greitų cheminių reakcijų eigos stabdymo (RQF; angl. *rapid chemical-quench-flow*) aparatu RQF-3 sumaišant po 15 μl A ir B mišinius ir taip inicijuojant metilinimo reakciją, kuri stabdoma praėjus aparate nustatytam laikui praskiedžiant reakcijos mišinį 9,29 karto 1x proteinazės K buferiu bei degraduojant HEN1 baltymą ~0,35 mg/ml proteinaze K mėginį 20 min. inkubuojant blokiniame termostate 55 °C temperatūroje. Tokiu būdu vykdant metilinimo reakciją 37 °C temperatūroje skirtingą laiką (0,1-540 s), gaunama eilė 283,7 μl tūrio mėginių. Taip pat paruošiami du kontroliniai mėginiai, sudaryti iš 15 μl B mišinio, į kurį po sumaišymo su proteinaze K bei 20 min. inkubacijos blokiniame termostate 55 °C temperatūroje pridedama 15 μl A mišinio. Po IO₄⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakcijos mėginiai frakcionuojami 13 % denatūruojančiame poliakrilamido gelyje (2.2.12. skyrius). Pažymėtina, kad metilinta tiriami grandinė (t.y. radioaktyviu fosforo izotopu žymėta miRNR/miRNR* duplekso grandinė) gelyje migruoja lėčiau nei nemetilinta, vienu nukleozidu po IO₄⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakcijos sutrumpėjusi. Todėl iš gautos elektroforegramos Multi Gauge 3.0 kompiuterine programa galima įvertinti, kokia tiriamos grandinės dalis užmetilinama praėjus atitinkamam reakcijos laikui. Tuomet GraFit 5.0.6 kompiuterine programa braižoma metilintos substrato dalies priklausomybė nuo metilinimo reakcijos trukmės. Gauti duomenys aprašyti vienos ar dviejų eksponenčių lygtimis, nustatant ³³P žymėtos grandinės metilinimo greičio konstantą/-as ir jos/jų amplitudę/-es, kurios parodo, kiek procentiškai modifikacijų atvejų vyksta vienu ar kitu greičiu.

2.2.14. HEN1, jo mutantinių baltymų ir HYL1 sutrumpintų baltymų sąveikos su DNR, RNR tyrimas nukleorūgšties elektroforetinio judrumo pokyčio poliakrilamido gelyje metodu (EMSA-PAAG)

EMSA-PAAG metodas yra pagrįstas tuo, kad baltymo surištas substratas natyviame poliakrilamido gelyje migruoja lėčiau nei laisvas substratas. Tai greitas, nesudėtingas ir plačiai naudojamas metodas, leidžiantis tirti baltymo gebėjimą prisijungti, pavyzdžiui, radioaktyviu fosforo izotopu žymėtą nukleorūgštį.

Tiriant pilno ilgio metiltransferazės HEN1 sąveiką su viengrandiniais ir dvigrandiniais RNR bei DNR substratais pastaruoju metodu, į reakcijos mišinį, sudarytą iš 1x DMTL buferio, 0,5 U/μl RiboLock RNazių inhibitoriaus ir 0,05 μM ³²P žymėto RNR ar DNR substrato, pridėta 0,5 μM metiltransferazės. Kiekvienam 20 μl tūrio susirišimo mėginiui paruošti kontroliniai, baltymo neturintys, mėginiai.

HEN1-LR²PM, HEN1-R¹, HEN1-R¹L, HEN1-KKKK68-71SAAS, HEN1-KK69-70AA, HEN1-K22A ir HEN1-R², HEN1-RHK389,397,477AAA sąveikos su miR173/miR173* dupleksu tyrimams 20 μl tūrio susirišimo mėginiai gauti sumaišius iš 1x DMTL buferio, 0,5 U/μl RiboLock RNazių inhibitoriaus ir 0,05 μM ³²P žymėtos dvigrandinės miR173 sudarytą mišinį su 0,25 μM atitinkamu baltymu. Paraleliai paruošti 0,25 μM pilno ilgio metiltransferazės turintis teigiamos ir baltymo neturintis neigiamos kontrolės mėginiai.

Tiriant HEN1-Δ38-45 baltymo sąveiką su nemetilintu miR173/miR173* ar pilnai metilintu miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} dupleksu, į 100 μM AdoHcy turintį ar jo neturintį reakcijos mišinį, sudarytą iš 1x DMTL buferio, 0,5 U/μl RiboLock RNazių inhibitoriaus ir 0,05 μM ³²P žymėtos dvigrandinės RNR, pridėta 0,25 μM HEN1-Δ38-45. Taip pat paruošti tokio paties, 20 μl tūrio 0,25 μM pilno ilgio metiltransferazės turintis teigiamos ir baltymo neturintis neigiamos kontrolės mėginiai.

HEN1-RHK389,397,477AAA sąveikos su siR173/siR173* bei nemetilintu miR173/miR173*, pilnai metilintu miR173^{CH3}/miR173*^{CH3}

dupleksais tyrimams 20 μ l tūrio susirišimo mėginiai gauti sumaišius 100 μ M AdoHcy turintį ar jo neturintį mišinį, sudarytą iš 1x DMTL buferio, 0,5 U/ μ l RiboLock RNazių inhibitoriaus, 0,05 μ M 32 P žymėtos dvigrandinės mažos nekoduojančios RNR, su 7 μ M HEN1-RHK389,397,477AAA. Paruoštas ir teigiamos kontrolės mėginys – toks pats susirišimo mėginys vietoj mutantinio HEN1 baltymo turintis 0,25 μ M pilno ilgio metiltransferazės. Neigiamos kontrolės mėginys gautas į mišinį neįpilant baltymo.

Tiriant glutationo S-transferazės (GST) ir su ja sulieto pilno ilgio HYL1 ar jo sutrumpintų baltymų sąveiką su siR173/siR173* dupleksu, į reakcijos mišinį, sudarytą iš 1x DMTL buferio, 0,05 U/ μ l RiboLock RNazių inhibitoriaus, 0,1 mg/ml JSA ir 0,045 μ M 32 P žymėtos dvigrandinės siRNR, pridėta 0,5 μ M GST ar GST-HYL1, GST-HYL1-R¹R², GST-HYL1-R¹, GST-HYL1-R² baltymo. Tokio paties, 20 μ l tūrio paruoštas ir neigiamos kontrolės, baltymo neturintis, mėginys.

Pilno ilgio metiltransferazę ar jos mutantinį baltymą turintys susirišimo bei kontroliniai mėginiai 30 min. inkubuoti 25 °C temperatūroje. Šioje temperatūroje tokie patys tik GST ar su GST sulietus baltymus turintys mėginiai laikyti 20 min. Tuomet po 6% ar 8 % natyvaus poliakrilamido gelio 20 min. peforezės naudojant 200 V elektros srovės įtampą, susirišimo mėginiai užnešti į takelius. GST ar GST-HYL1, GST-HYL1-R¹R², GST-HYL1-R¹, GST-HYL1-R² baltymus turintys susirišimo bei kontrolinis mėginiai užnešti į 6 % PAAG takelius. Elektroforezės vykdytos 0,5x TB buferyje, vertikalios elektroforezės aparate 30-45 min. esant 200 V įtampai. Jai pasibaigus natyvus PAAG nusausintas rankšluostiniu popieriumi ir perkeltas ant poliakrilamido gelių džiovinimo popieriaus 31 min. džiovintas 62 °C temperatūros vakuuminiam gelių džiovinimo aparate. Išdžiovintas gelis suvyniotas į polietileno plėvelę ir, uždėjus radioaktyvumui jautrų ekraną, eksponuotas tamsoje 2-36 val. Praėjus atitinkamam laikui, ekranas nuskaitytas skaitytuvu “FLA-5100”, pasirinkus raudoną lazerį ($\lambda=635$ nm) su IP filtru.

2.2.15. HEN1, jo mutantinių ir HYL1 baltymų afiniškumo dvigrandinėms mažosioms nekoduojančioms RNR įvertinimas nukleorūgšties elektroforetinio judrumo pokyčio poliakrilamido gelyje metodu (EMSA-PAAG)

Norint apskaičiuoti dvinarių HEN1 kompleksų su miR173/miR173*, siR173/siR173* ir let-7a2/let-7a2* dupleksais disociacijos konstantas, mišinys, sudarytas iš 1x DMTL buferio, 0,5 U/μl RiboLock RNazių inhibitoriaus ir 0,05 nM ³²P žymėtos dvigrandinės mažosios nekoduojančios RNR (mnkRNR), išpilstytas į mėgintuvėlius turinčius nuo 0,4395 iki 3600 nM (3600 nM didžiausia baltymo koncentracija mažinta kas du kartus iki 0,4395 nM) DMTL baltymų skiedimo buferyje skiestos metiltransferazės. Kartu su gauta eile susirišimo mėginių, paruošti ir kontroliniai, baltymo neturintys, mėginiai.

Dvinarių ir trinarių HEN1-R¹, HEN1-Δ38-45 ar HEN1 kompleksų su nemetilintu, pilnai metilintu ar hemimetilintais miR173 dupleksais disociacijos konstantų apskaičiavimui, 100 μM AdoHcy (ar 100 μM AdoMet) turintis ar jo neturintis reakcijos mišinys, sudarytas iš 1x DMTL buferio, 0,5 U/μl RiboLock RNazių inhibitoriaus ir 0,05 nM ³²P žymėtos dvigrandinės miR173, sumaišytas su 0,03-250 nM (250 nM didžiausia baltymo koncentracija mažinta kas du kartus iki 0,03 nM) DMTL baltymų skiedimo buferyje skiestu atitinkamu baltymu. Paraleliai paruošti kontroliniai, baltymo neturintys, mėginiai.

Norint apskaičiuoti dvinarių ir trinarių HEN1-RHK389,397,477AAA kompleksų su miR173/miR173* ir siR173/siR173* dupleksais disociacijos konstantas, mišinys, sudarytas iš 1x DMTL buferio, 0,5 U/μl RiboLock RNazių inhibitoriaus ir 0,05 nM ³²P žymėto mnkRNR/mnkRNR* duplekso, išpilstytas į mėgintuvėlius turinčius nuo 1,7 iki 7000 nM (7000 nM didžiausia baltymo koncentracija mažinta kas du kartus iki 13,7 ar 1,7 nM) DMTL baltymų skiedimo buferyje skiesto mutantinio HEN1 baltymo. Kartu su gauta eile susirišimo mėginių, paruošti ir kontroliniai, baltymo neturintys, mėginiai.

Dvinarių HYL1•miR173/miR173* ar HYL1•siR173/siR173* kompleksų disociacijos konstantų apskaičiavimui reakcijos mišinys, sudarytas

iš 1x DMTL buferio, 0,05 U/μl RiboLock RNazių inhibitoriaus, 0,1 mg/ml JSA ir 45 nM ³²P žymėto miR173/miR173* ar siR173/siR173* duplekso, sumaišytas su 11,72 nM, 15,63 nM, 23,44 nM, 31,25 nM, 46,88 nM, 62,5 nM, 93,75 nM, 125 nM, 187,5 nM, 250 nM, 375 nM, 500 nM, 750 nM, 1000 nM DMTL baltymų skiedimo buferyje skiestu HYL1 baltymu turinčiu šešių His ar. inkarą N gale. Paraleliai paruošti kontroliniai, baltymo neturintys, mėginiai.

Gauti 20 μl tūrio mėginiai 30 min. inkubuoti 25 °C temperatūroje, išskyrus, HYL1 turinčius mėginius, kurie šioje temperatūroje laikyti 20 min. Tuomet po 8 % ar 6 % (naudoti HYL1 baltymą turinčių mėginių analizei) poliakrilamido gelio 20 min. peforezės naudojant 200 V elektros srovės įtampą, mėginiai užnešti į takelius. Elektroforezės vykdytos ir geliai išdžiovinti taip, kaip aprašyta 2.2.14. skyriuje. Išdžiovintas gelis suvyniotas į polietileno plėvelę ir, uždėjus radioaktyvumui jautrų ekraną, eksponuotas tamsoje 1-21 d. Praėjus atitinkamam laikui, ekranas nuskaitytas skaitytuvu "FLA-5100", pasirinkus raudoną lazerį (λ=635 nm) su IP filtru.

Gauta elektroforegrama analizuota Multi Gauge 3.0 programa procentiškai įvertinant surištos ir laisvos dgRNR dalis kiekviename mėginyje (išskyrus, kiekvieno mėginio, turinčio HEN1-R¹ ar HYL1 baltymą, surištos dgRNR dalis apskaičiuota iš 100 % atėmus laisvos dgRNR dalį išreikštą procentais palyginus jos juostelės intensyvumą su kontrolinio mėginio). Surištos dgRNR procentai perskaičiuoti į surišto su dgRNR baltymo koncentraciją kiekviename mėginyje. Tuomet šias koncentracijas atėmus iš pradinės baltymo koncentracijos, apskaičiuotos su substratu nesurišto baltymo koncentracijos, t.y. kiekvieno mėginio laisvo mišinyje baltymo koncentracija. GraFit 5.0.6 kompiuterine programa nubrėžtos gautos surišto su substratu baltymo kiekio priklausomybės nuo laisvo mišinyje baltymo kiekio. Dvinarių ir trinarių kompleksų disociacijos konstantos (K_d) apskaičiuotos šias priklausomybes aprašius vieno taikinio surišimo lygtimi:

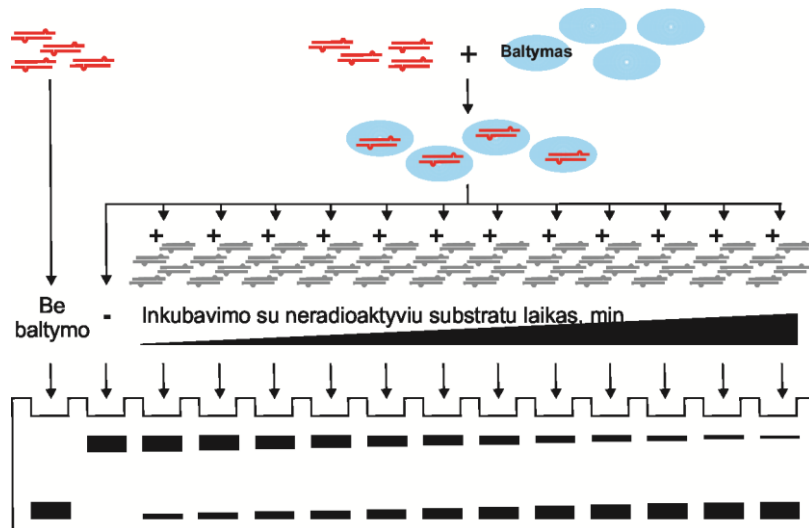
$$[S] = \frac{C \cdot [L]}{K_d + [L]}$$

kur C – maksimali galima surišto su dgRNR baltymo koncentracija, $[L]$ – laisvo mišinyje baltymo koncentracija, o $[S]$ – surišto su substratu baltymo koncentracija.

2.2.16. HYL1 ir HEN1 bei jo mutantinių baltymų dvinarių ir trinarių kompleksų stabilumo tyrimai nukleorūgšties elektroforetinio judrumo pokyčio poliakrilamido gelyje metodu (EMSA-PAAG)

EMSA-PAAG metodu tiriant baltymo ir nukleorūgšties komplekso stabilumą, reakcijos mišinys turintis, pavyzdžiui, radioaktyviu fosforu žymėtą dvigrandinę RNR (dgRNR) sumaišomas su baltymu ir tam tikrą laiką inkubuojamas atitinkamoje temperatūroje suformuojant baltymo•dgRNR kompleksus (2.1 pav.). Gautas, baltymo ir dgRNR kompleksus turintis mišinys išpilstomas į mėgintuvėlius su neradioaktyvios dgRNR pertekliumi ir mėginiai skirtingą laiką inkubuojami atitinkamoje temperatūroje. Tuomet jie analizuojami natyviame PAAG kartu su neigiamos kontrolės, baltymo neturinčiu, ir teigiamos kontrolės, baltymo•dgRNR kompleksų mišinio, mėginiu, po jo laikymo atitinkamoje temperatūroje tiek, kiek truko ilgiausia inkubacija su nežymėtos dgRNR pertekliumi. Elektroforegramos kiekvieno mėginio takelyje, dėl pridėto neradioaktyvios dgRNR pertekliaus sudaromos konkurencijos ir dėl įvairios su juo inkubacijos trukmės, stebimi skirtingi surištos ir laisvos (radioaktyvios) dgRNR dalies procentiniai santykiai. Nubrėžus kiekvieno mėginio surištos dgRNR kiekio išreikšto procentais priklausomybes nuo mėginio inkubacijos laiko ir ją aprašius vienos ar dviejų eksponenčių iširimo lygtimis, apskaičiuojama/-os baltymo•dgRNR komplekso iširimo greičio konstanta/-os.

Dvinarių pilno ilgio metiltransferazės ir miR173/miR173*, miR173^{CH3}/miR173*, miR173/miR173*^{CH3}, miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} bei siR173/siR173* kompleksų iširimo greičio konstantų nustatymui reakcijos mišinys, sudarytas iš 1x DMTL buferio, 0,5 U/μl RiboLock RNazių inhibitoriaus, 0,05 mg/ml JSA ir 0,15 nM ³²P žymėtos dgRNR, sumaišytas su 250 nM HEN1. Po 30 min. inkubacijos 25 °C temperatūroje, gauti mišiniai,



2.1 pav. Baltymo su dvigrandine mažąja nekoduojančia RNR (mnkRNR) kompleksų stabilumo tyrimo EMSA-PAAG metodu schema. „Be baltymo“ – neigiamos, baltymo neturinčios, kontrolės mėginio takelis; minuso ženklu pažymėtas teigiamos kontrolės mėginio takelis, į kurį užnešta baltymo•dgRNR kompleksų mišinio po jo laikymo atitinkamoje temperatūroje tiek, kiek truko ilgiausia inkubacija su nežymėtos dgRNR pertekliumi. Pilkai pažymėta dvigrandinė mnkRNR, raudonai – tas pats substratas pažymėtas ³²P.

turintys dvinarius kompleksus. Pakartojus šią procedūrą į reakcijos mišinį pridėjus 100 μM AdoHcy, po 30 min. inkubacijos 25 °C temperatūroje suformuoti atitinkami trinariai HEN1•dgRNR•AdoHcy kompleksai. Mėginiai gauti mišinius, turinčius dvinarius, trinarius kompleksus, išpilstant į mėgintuvėlius su 2 μM neradioaktyvia dgRNR ir skirtingą laiką inkubuojant 25 °C temperatūroje. Dvinarių HEN1•miR173/miR173*, HEN1•miR173^{CH3}/miR173*, HEN1•miR173/miR173*^{CH3} ir jų trinarių kompleksų inkubacijos su atitinkamo miR173/miR173*, miR173^{CH3}/miR173*, miR173/miR173*^{CH3} pertekliumi laikai – 15 min., 30 min., 45 min., 60 min., 120 min., 180 min., 240 min., 300 min., 360 min., 420 min., 480 min.; HEN1•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} su miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} pertekliumi – 10 min., 20 min., 30 min., 40 min., 50 min., 60 min., 70 min., 80 min., 90 min., 100 min., 110 min., 120 min.; HEN1•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3}•AdoHcy su miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} pertekliumi – 30 min., 60 min., 90 min., 120 min., 150 min., 180 min., 210 min., 240 min., 270 min., 300 min., 360 min., o HEN1•siR173/siR173* ir HEN1•siR173/siR173*•AdoHcy kompleksų su

neradioaktyvaus siR173/siR173* pertekliumi – 10 min., 15 min., 30 min., 45 min., 60 min., 90 min., 120 min., 180 min., 240 min., 300 min., 360 min., 420 min., 480 min.

Trinariai ar dvinariai HEN1- Δ 38-45 kompleksai su nemetilinta ir pilnai metilinta dvigrandine miR173 gauti, 100 μ M AdoHcy turintį ar neturintį reakcijos mišinį, sudarytą iš 1x DMTL buferio, 0,5 U/ μ l RiboLock RNazių inhibitoriaus, 0,05 mg/ml JSA ir 0,15 nM atitinkamos 32 P žymėtos dgRNR, 30 min. inkubuojant su 250 nM HEN1- Δ 38-45 25 °C temperatūroje. Tuomet mišinio, turinčio HEN1- Δ 38-45•miR173/miR173* ar HEN1- Δ 38-45•miR173/miR173*•AdoHcy kompleksus, dalys sumaišytos su 2 μ M miR173/miR173* ir inkubuotos 25 °C temperatūroje: 15 min., 30 min., 45 min., 60 min., 120 min., 180 min., 240 min., 300 min., 360 min., 420 min., 480 min. Toje pačioje temperatūroje HEN1- Δ 38-45•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} kompleksai su neradioaktyvaus miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} duplekso pertekliumi inkubuoti 10 min., 20 min., 30 min., 40 min., 50 min., 60 min., 70 min., 80 min., 90 min., 100 min., 110 min., 120 min., o trinariai HEN1- Δ 38-45•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3}•AdoHcy kompleksai – 15 min., 30 min., 45 min., 60 min., 90 min., 120 min., 150 min., 180 min., 210 min.

Reakcijos mišinį, sudarytą iš 1x DMTL buferio, 0,5 U/ μ l RiboLock RNazių inhibitoriaus, 0,05 mg/ml JSA ir 0,15 nM 32 P žymėtos miR173/miR173* ar siR173/siR173*, sumaišius su 7000 nM HEN1-RHK389,397,477AAA ir 30 min. palaikius 25 °C temperatūroje, suformuoti dvinariai kompleksai. Pakartojus šią procedūrą į reakcijos mišinį pridėjus 100 μ M AdoHcy, gauti trinariai mutantinio HEN1 baltymo kompleksai. Mėginiai gauti mišinių, turinčių dvinarius HEN1-RHK389,397,477AAA kompleksus, dalis sumaišant su 2 μ M atitinkama dgRNR ir skirtingą laiką inkubuojant 25 °C temperatūroje. HEN1-RHK389,397,477AAA•miR173/miR173* kompleksų inkubacijos su neradioaktyvios miR173/miR173* pertekliumi laikai - 10 min., 15 min., 30 min., 45 min., 60 min., 90 min., 120 min., 150 min., 210 min., 240 min., 270 min., 300 min.; HEN1-RHK389,397,477AAA•siR173/siR173* kompleksų su siR173/siR173* pertekliumi – 10 min., 20 min., 30 min., 40

min., 50 min., 60 min., 70 min., 80 min., 90 min., 100 min., 110 min., 120 min., o jų trinarių kompleksų su atitinkamos dgRNR pertekliumi – 10 min., 15 min., 30 min., 45 min., 60 min., 90 min., 120 min., 180 min., 240 min., 300 min., 360 min., 420 min., 480 min.

Norint gauti dvinarius HYL1•siR173/siR173* kompleksus, reakcijos mišinys, sudarytas iš 1x DMTL buferio, 0,05 U/μl RiboLock RNazių inhibitoriaus, 0,1 mg/ml JSA 45 nM ³²P žymėto siR173/siR173* duplekso, sumaišytas su 250 nM HYL1, N gale turinčiu šešių His ar. inkarą. Po 20 min. inkubacijos 25 °C temperatūroje, mišinio, turinčio suformuotus dvinarius kompleksus, dalys sumaišytos su 2,5 μM neradioaktyviu siR173/siR173* duplektu ir inkubuotos pastaroje temperatūroje 15 min., 30 min. ir 45 min.

Gauti 20 μl tūrio mėginiai, po 8 % ar 6 % (naudoti HYL1 baltymą turinčių mėginių analizei) poliakrilamido gelio 20 min. peforezės naudojant 200 V elektros srovės įtampą, užnešti į takelius. Elektroforezės vykdytos ir geliai išdžiovinti taip, kaip aprašyta 2.2.14. skyriuje. Išdžiovintas gelis suvyniotas į polietileno plėvelę ir, uždėjus radioaktyvumui jautrų ekraną, eksponuotas tamsoje 1-15 d. Praėjus atitinkamam laikui, ekranas nuskaitytas skaitytuvu “FLA-5100”, pasirinkus raudoną lazerį (λ=635 nm) su IP filtru.

Gautos elektroforegramos analizuotos Multi Gauge 3.0 programa procentiškai įvertinant surištos ir laisvos dgRNR dalis kiekviename mėginyje. GraFit 5.0.6 kompiuterine programa nubrėžtos kiekvieno mėginio HEN1 ar jo mutantinio baltymo surištos dgRNR kiekio išreikšto procentais priklausomybės nuo mėginio inkubacijos su neradioaktyvios dgRNR pertekliumi laiko. Gautus duomenis aprašius dviejų eksponenčių iširimo lygtimi, apskaičiuotos dvi dvinarių pilno ilgio metiltransferazės, mutantinių HEN1 baltymų ir jų trinarių kompleksų iširimo greičio konstantos ir jų amplitudės, parodančios kokia dalis procentais kompleksų išyra vienu ar kitu greičiu. Trinarių HEN1•RNR•AdoHcy kompleksų iširimo dinamika aprašyta vienos eksponentės iširimo lygtimi, apskaičiuojant vieną šių kompleksų iširimo greičio konstantą.

2.2.17. HEN1 ir HYL1 sąveikos tyrimas nukleorūgšties elektroforetinio judrumo pokyčio poliakrilamido gelyje metodu

Nukleorūgšties elektroforetinio judrumo pokyčio poliakrilamido gelyje(EMSA-PAAG) metodas naudojamas tarpbaltyminių sąveikų tyrimui, kai bent vienas iš eksperimente naudojamų baltymų suriša nukleorūgštį. Tiek HEN1, tiek HYL1 sudaro kompleksus su dvigrandine mažąja nekoduojančia RNR (mnkRNR), todėl EMSA-PAAG metodas naudotas jų tarpbaltyminės sąveikos tyrimams, kai suformuotas baltymo•mnkRNR/mnkRNR* kompleksas titruojamas kitu baltymu. Natyviame PAAG matoma nauja, mažesnio elektroforetinio judrumo juostelė leidžia manyti apie galimą tiriamų baltymų tarpusavio sąveiką.

Reakcijos mišinys, sudarytas iš DMTL buferio, 0,05 U/μl RiboLock RNazių inhibitoriaus, 0,1 mg/ml JSA ir 45 nM ³²P žymėto siR173/siR173* duplekso, sumaišytas su 94 nM HYL1 ar 250 nM HEN1 baltymais turinčiais šešių His ar. inkarą N gale. Po 10 min. inkubacijos 25 °C temperatūroje, suformuoti HEN1•siR173/siR173* ar HYL1•siR173/siR173* kompleksai. Pastaruosius kompleksus turintis mišinys išpilstytas į mėgintuvėlius su 7,81 nM, 11,72 nM, 15,62 nM, 23,44 nM, 31,25 nM, 46,87 nM, 62,5 nM, 93,75 nM, 125 nM, 187,5 nM, 250 nM DMTL baltymų skiedimo buferyje skiestu HEN1 baltymu. Dvinarių HEN1•siR173/siR173* kompleksų mišinys sumaišytas su 50-900 nM (900 nM didžiausia baltymo koncentracija mažinta kas 1,33 kartus iki 50 nM) DMTL baltymų skiedimo buferyje skiestu HYL1 baltymu. Gauti 20 μl tūrio mėginiai kartu su mišiniais, turinčiais HEN1•siR173/siR173* ar HYL1•siR173/siR173* kompleksus, ir paruoštu neigiamos kontrolės, baltymų neturinčiu, mėginiu 20 min. inkubuoti 25 °C temperatūroje. Tuomet, po 6 % poliakrilamido gelio 20 min. peforezės naudojant 200 V elektros srovės įtampą, užnešti į takelius. Elektroforezė vykdyta ir geliai išdžiovinti taip, kaip aprašyta 2.2.14. skyriuje. Išdžiovinti PAAG suvynioti į polietileno plėvelę ir, uždėjus radioaktyvumui jautrų ekraną, eksponuoti tamsoje. Praėjus atitinkamam laikui, ekranai nuskaityti skaitytuvu "FLA-5100", pasirinkus raudoną lazerį (λ=635 nm) su IP filtru.

2.2.18. *Saccharomyces cerevisiae* EGY48 ląstelių transformacija ir mielių kolonijų paruošimas analizei

EGY48 kamieno mielės augintos 30 °C temperatūroje.

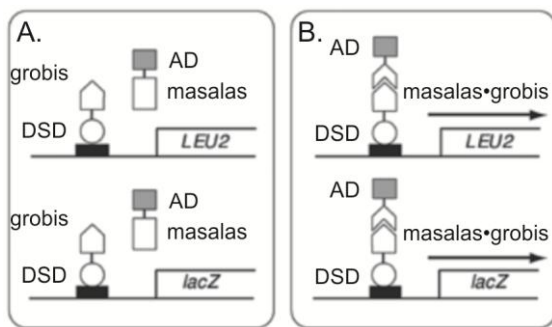
Į 3 ml YPD terpės užsėta viena EGY48 ląstelių kolonija 21-22 val. auginta 220 rpm greičiu besisukančioje purtyklėje. Naktinė kultūra praskiesta terpe santykiu 1:4000 maždaug 16 val. auginta 220 rpm greičiu besisukančioje purtyklėje kol pasiekė 1,8-2,0 optinį tankį ($\lambda = 600$ nm). Tuomet 2 ml tokios ląstelių suspensijos 14 sek. centrifuguotos 14000 rpm greičiu kambario temperatūroje. Surinktos ląstelės praplautos 500 μ l 1x TE-LiOAc tirpalu ir nuo jo atskirtos centrifuguojant pastarosiomis sąlygomis. Į 100 μ l 1x TE-LiOAc tirpalo suspenduotas ląsteles pridedama 1,5 μ g plazmidinės DNR (transformuojant dvi plazmides, kiekvienos pridedama po 1,5 μ g), 0,2 mg silkių sėklidžių DNR ir įpilama 600 μ l 1x TE-LiOAc-PEG tirpalo. Po kruopštaus sumaišymo mišinys 2-5 val. inkubuojamas 30 °C temperatūros termostate-inkubatoriuje kas valandą jį sumaišant. Perkeliamas 15 min. į 43 °C temperatūros vandens vonelę. Po temperatūrinio šoko ląstelės praplautos 2 ml vandens, nuo kurio atskirtos 14 sek. centrifuguojant 14000 rpm greičiu kambario temperatūroje. Suspenduotos 100 μ l vandens išsėtos ant agarizuotos gliukozinės terpės neturinčios Ura (transformuojant pSH18-34 ar pJK101 plazmidę) ar His (transformuojant plazmides, kodujančias darbe tiriamus baltymus sulietus su LexA) ir 2-3 paras augintos 30 °C temperatūros termostate-inkubatoriuje.

Norint EGY48 mieles turinčias pJK101 (EGY48[pSH18-34]) ar pSH18-34 (EGY48[pJK101]) plazmidę transformuoti viena ar dvejomis plazmidėmis, vienas šių ląstelių klonas užsėjamas į 3 ml gliukozinės terpės neturinčios Ura ar. ir auginamas 25-28 val. 220 rpm greičiu besisukančioje purtyklėje. Naktinė kultūra praskiesta tokia pačia terpe santykiu 1:3000 maždaug 21-22,5 val. auginta 220 rpm greičiu besisukančioje purtyklėje kol pasiekė 0,9-1,0 optinį tankį ($\lambda = 600$ nm). Tuomet 6 ml tokios ląstelių suspensijos 14 sek. centrifuguotos 14000 rpm greičiu kambario temperatūroje. Toliau atliekama tokia pati, aukščiau aprašyta transformacijos procedūra. Ląstelės išsėtos ant

agarizuotos gliukozinės terpės neturinčios Ura, His ar Ura, His, Trp aminorūgščių ir 2-3 paras augintos 30 °C temperatūros termostate-inkubatoriuje.

Transformantų analizei, atsitiktinai pasirinkti 4-5 ląstelių klonai ant šviežiai paruoštų jų auginimui naudotų agarizuotų terpių užsėjami 1,5 cm x 0,5 cm stačiakampiais. Vieno jo biomasė suspenduojama 100 µl vandens ir užlašinama po 2,5 µl ant Gal/+Leu, Gal/-Leu, Glu/-Leu terpių (tiriant dviejų baltymų sąveiką „DupLex-A“ sistema) ar ant agarizuotos galaktozinės terpės neturinčios Ura, His ar tik uracilo (atliekant „DupLex-A“ sistemos kontrolinius eksperimentus).

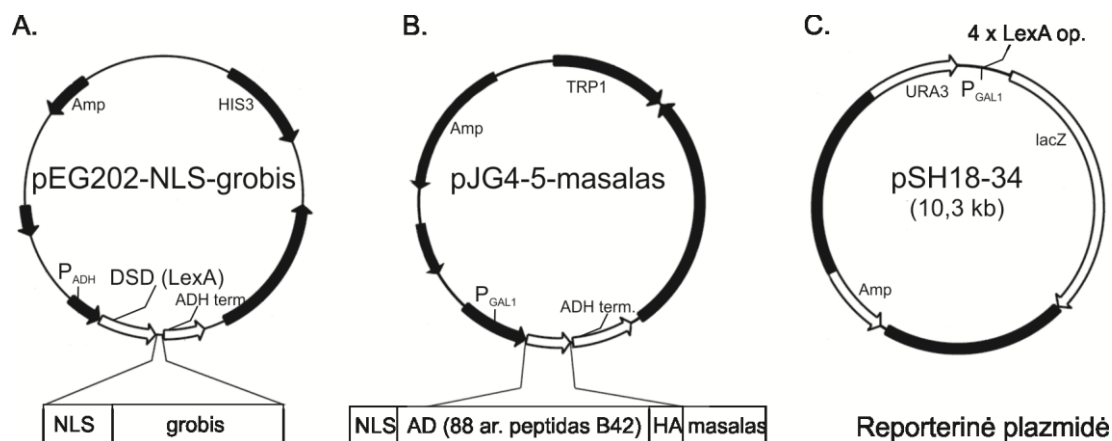
2.2.19. Tarpbaltyminių sąveikų tyrimai „DupLex-A“ mielių dviejų hibridų sistema



2.2 pav. „DupLex-A“ mielių dviejų hibridų sistemos principinė schema (parengta pagal Golemis et al., 2011). Juodu stačiakampiu pažymėti keli *LexA* operatoriai. DSD – DNR surišantis domenas, AD – transkripciją aktyvinantis domenas.

šioms mielėms augti ant leucino neturinčios terpės, antras – į mielių ląsteles įterpiamoje pSH18-34 plazmidėje (2.3 pav. C) esantis *lacZ* genas, koduojantis β-galaktozidazę, kuri hidrolizuoja terpėje esantį X-gal, susidarant mėlynos spalvos hidrolizės produktui. Taip pat šioje sistemoje DNR surišančio domeno (DSD) funkciją atlieka DNR surišantis bakterijų transkripcijos veiksnys LexA. Šio baltymo įprastinė funkcija yra SOS genų represija *E. coli* ląstelėse, sąveikaujant su *LexA* geno operatoriaus seka.

Mielių dviejų hibridų sistema leidžia, be tiriamų baltymų išgryninimo, nustatyti tarpbaltyminę sąveiką *in vivo*. Darbe pasirinktoje „DupLex-A“ sistemoje yra naudojami du skirtingi reporteriniai genai, reguliuojami keletu *LexA* operatorių (2.2 pav.). Vienas jų yra į *Leu⁻* auksotrofinio mielių kamieno EGY48 genomą integruotas *LEU2* genas, kurio raiška būtina norint



2.3 pav. Plazmidės naudojamos „DupLex-A“ dviejų hibridų sistemoje. Išskirtos DNR sekos, koduojančios: NLS – branduolio lokalizacijos signalą; DSD, kuris yra DNR surišantis domenas, - prokariotinį LexA baltymą, kurio įprastinė funkcija yra SOS genų represija *E. coli* ląstelėse sąveikaujant su LexA geno operatoriaus seka; AD, kuris yra transkripciją aktyvinantis domenas, - 88 ar. rūgštinį *E. coli* peptidą B42, aktyvinantis transkripciją mielėse; HA - hemaglutinino epitopą.

Sistemos reporterinių genų transkripciją aktyvinantis domenas (AD) yra *E. coli* 88 aminorūgščių rūgštinis peptidas B42. Pati sistema paremta tuo, kad fiziškai atskirti ir ląstelėje nepriklausomai sintetinami to paties ar hibridinio transkripcijos veiksnio AD ir DSD nesąveikauja tarpusavyje ir transkripcijos neaktyvuoja. Vadinasi, šios sistemos mielės EGY48[pSH18-34] (EGY48 mielės turinčios reporterinę pSH18-34 plazmidę (2.3 pav. C)) transformavus DSD bei AD vektoriais, atitinkamai koduojančiais LexA baltymą ir rūgštinį peptidą B42, jose sintetinami AD ir DSD nesudaro kompleksų ir reporterinių genų transkripcijos neaktyvuoja, nors DSD ir susiriša su prieš *LEU2* ir *lacZ* esančiais LexA operatoriais. Tiriant dviejų „grobis“ ir „masalal“ baltymų sąveiką, DSD vektorius pEG202-NLS naudojamas „grobis“ geno suliejimui su LexA, o AD vektorius pJG4-5 – „masalalo“ geno suliejimui su B42 koduojančia seka (2.3 pav. A, B) ir/ar atvirkščiai. Transformavus EGY48[pSH18-34] mielės pEG202-NLS-grobis ir pJG4-5-masalal plazmidėmis (2.3 pav. A, B), jei jų atitinkamai koduojami baltymai „grobis“ sulietas su DSD ir „masalal“ sulietas su AD sąveikauja vienas su kitu, tai su jais sulieti AD ir DSD domenai suartėja erdvėje taip, kad sudaro kompleksą, kuris per DSD jungiasi prie LexA operatoriaus sekų (2.2 pav. B), o AD sąveikaujant su RNR II polimerazės kompleksu, nukreipia jį šalia esančio geno nuskaitymui. Taigi, chimeriniams

„grobio“ ir „masalo“ baltymams sąveikaujant aktyvinama sistemos reporterinių genų raiška (2.2 pav. B), dėl kurių mielės auga ant galaktozinės leucina neturinčios terpės (Gal/-Leu) ir dėl joje esančio X-gal hidrolizės nusidažo mėlynai. Nesant sąveikos, reporterinių genų raiška nevyksta (2.2 pav. A) ir dėl to mielių ląstelės auga, bet nemėlynuoja ant Gal/+Leu bei neauga ant agarizuotos Gal/-Leu terpių.

Kontroliniai eksperimentai

Norint nustatyti ar su LexA baltymu sulieti darbe tiriami HEN1, HYL1-R², SE-core ar HYL1 baltymai neaktyvina *lacZ* transkripciją, EGY48[pSH18-34] mielės transformuotos atitinkamomis plazmidėmis: pEG202-NLS-HEN1, pEG202-NLS-HYL1-R², pEG202-NLS-SE-core ar pEG202-NLS-HYL1. Taip pat į šias mieles įvestos teigiamos kontrolės pSH17-4 ir neigiamos kontrolės pRHF1 plazmidės. Pastaroji plazmidinė DNR koduoja LexA baltymą sulietą su už susirišimą su nukleorūgštimi užtikrinančia vaisinių muselių bicoid baltymo dalimi, o pSH17-4 – su mielių aktyvinančio baltymo GAL4 AD. Kiekvieno atvejo analizuotos 5 atsitiktinai pasirinktos ląstelių kolonijos. Visų penkių kolonijų ląstelės, turinčios pSH17-4 plazmidės, po 2-3 parų auginimo ant agarizuotos galaktozinės terpės neturinčios Ura, His buvo mėlynos (šiose mielėse sintetinas hibridinis transkripcijos veiksnys, sudarytas iš LexA ir GAL4 AD, aktyvina *lacZ* promotorių prisijungiant prie jame esančių LexA surišimo sekų), o mielės, turinčios atitinkamą chimerinį tiriamą baltymą koduojančią plazmidą ar pRHF1 – buvo baltos. Pastarieji rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad mielėse sintetinami su LexA sulieti darbe tiriami baltymai *lacZ* neaktyvuoja.

Norint nustatyti ar su LexA baltymu sulieti darbe tiriami HEN1, HYL1-R², SE-core ar HYL1 baltymai neaktyvina *LEU2* geno transkripciją, EGY48 mielės transformuotos atitinkamomis plazmidėmis: pEG202-NLS-HEN1, pEG202-NLS-HYL1-R², pEG202-NLS-SE-core ar pEG202-NLS-HYL1. Atitinkamą plazmidę turinti ląstelių kolonija užsėta į 3 ml gliukozinės terpės neturinčios His ar. ir maždaug 21-22 val. auginta 220 rpm greičiu

besisukančioje purtyklėje. Po 100 μ l 1000x praskiestos ląstelių suspensijos užsėta ant dviejų tipų agarizuotos galaktozinės terpės: be His, Leu ar. ir be histidino. Procentiškai įvertinta, kokią dalį nuo ant pastarosios terpės užaugusių klonų sudaro ant Leu neturinčios terpės matomi klonai. Visais tirtais atvejais nustatytas ne didesnis nei 0,2 % *LEU2* autoaktyvinimas.

Norint įsitikinti, kad sistemos mielės sintetina su LexA sulietus tiriamus baltymus bei kad jie patenka į branduolį ir prisijungia prie LexA operatorių, EGY48 mielės turinčios pJK101 plazmidę (EGY48[pJK101]) transformuotos plazmidėmis: pEG202-NLS-HEN1, pEG202-NLS-HYL1-R², pEG202-NLS-SE-core ar pEG202-NLS-HYL1. Taip pat į šias mieles įvesta ir teigiamos kontrolės pRHF1 plazmidė. Kiekvieno atvejo, kaip ir EGY48 mielių turinčių tik pJK101 plazmidę, analizuotos 5 atsitiktinai pasirinktos ląstelių kolonijos. pJK101 plazmidė turi *GALI* priešrovinę aktyvinamąją seką (*GALI*_{UAS}; angl. *upstream activating sequence*), už kurios išsidėsčiusios dvi LexA atpažįstamos sekos, o už jų *lacZ*. Vadinasi, EGY48[pJK101] augant ant galaktozinės terpės mielių endogeniniai GAL4 baltymai prisijungs prie *GALI*_{UAS} ir aktyvins *lacZ* transkripciją, dėl kurios augs mėlynos ląstelės. Tuo tarpu jei EGY48[pJK101] mielėse, turinčiose vieną iš tiriamų ar kontrolinę plazmidę, su LexA sulieti baltymai sintetunami ir jie pakliūna į branduolį bei jungiasi prie pJK101 plazmidės LexA operatorių, tai bus detektuojamas β -galaktozidazės aktyvumo slopinimas matant šviesesnės mėlynos spalvos ląstelių augimą. Visų tirtų kolonijų ląstelės, turinčių pRHF1 ar tiriamą plazmidę, po 24-36 val. auginimo ant agarizuotos galaktozinės terpės neturinčios Ura, His buvo šviesesnės mėlynos spalvos nei EGY48[pJK101] kolonijų, augintų ant agarizuotos galaktozinės terpės neturinčios uracilo. Gauti rezultatai rodo, kad sistemos EGY48 mielės sintetina su LexA sulietus HEN1, HYL1-R², SE-core ar HYL1 baltymus bei jie patenka į branduolį ir jungiasi prie LexA operatorių.

Dviejų baltymų sąveikos tyrimai

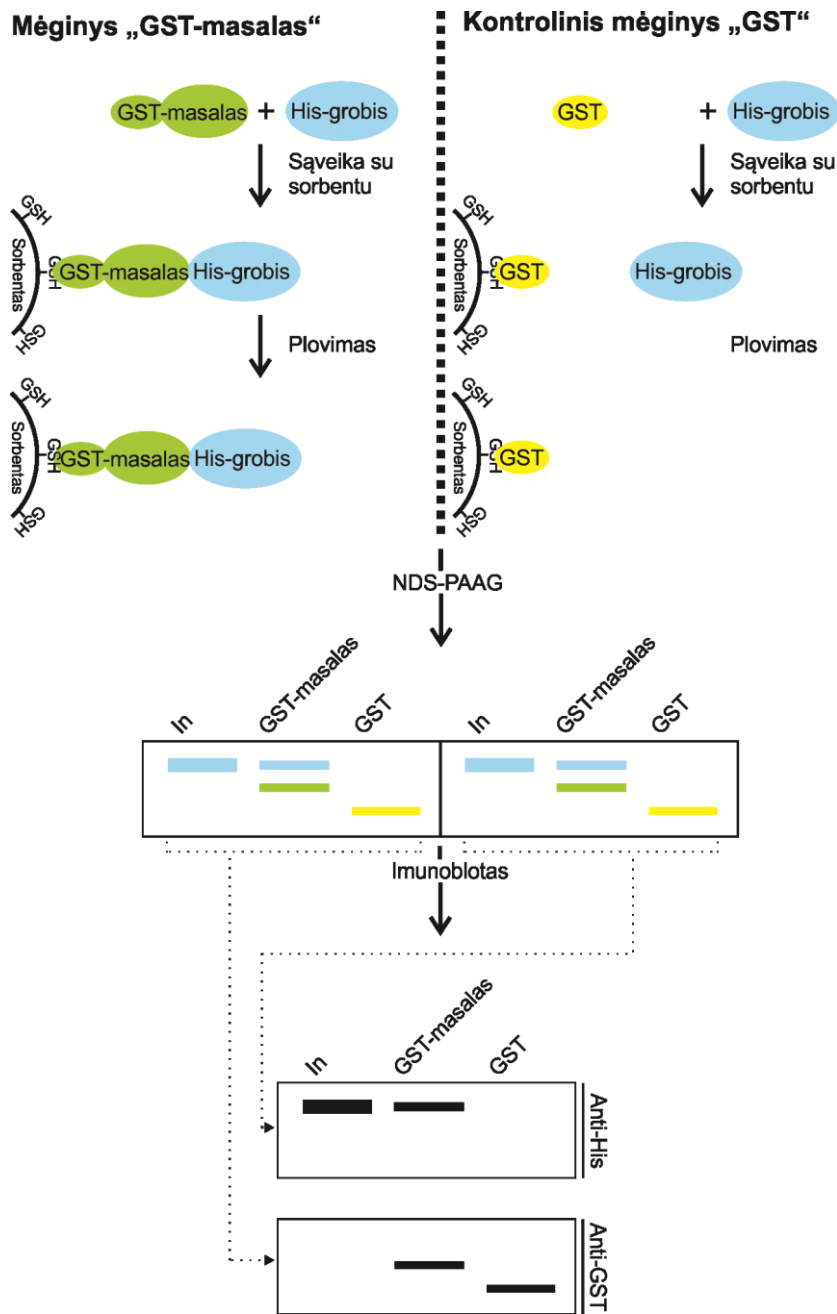
„DupLex-A“ sistema tiriant HEN1 sąveiką su HYL1, SE, SE-core, DCL1 domenais ir šių domenų sąveikas su SE-core, HYL1 bei HEN1-P ir HYL1-R² ar SE-core ir HYL1 baltymų sąveikas, EGY48[pSH18-34] mielės transformuotos šiomis plazmidžių poromis: pEG202-NLS-HEN1 ir pJG4-5-HYL1, pEG202-NLS-HEN1 ir pJG4-5-SE, pEG202-NLS-SE-core ir pJG4-5-HEN1, pEG202-NLS-HEN1 ir pJG4-5-DCL1-Helikazinis, pEG202-NLS-HEN1 ir pJG4-5-DCL1-DUF283, pEG202-NLS-HEN1 ir pJG4-5-DCL1-R¹R², pEG202-NLS-HEN1 ir pJG4-5-DCL1-PAZ, pEG202-NLS-HYL1-R² ir pJG4-5-HEN1-P, pEG202-NLS-SE-core ir pJG4-5-HYL1, pEG202-NLS-SE-core ir pJG4-5-DCL1-Helikazinis, pEG202-NLS-SE-core ir pJG4-5-DCL1-PAZ, pEG202-NLS-HYL1 ir pJG4-5-DCL1-R¹R², pEG202-NLS-HYL1 ir pJG4-5-DCL1-DUF283. Norint įsitikinti, kad EGY48[pSH18-34] mielėse, turinčių atitinkamą pEG202-NLS-grobis ir pJG4-5-masalas plazmidžių porą, „grobio“ ir „masalo“ baltymų sąveika yra specifinė, paraleliai šios mielės transformuotos aukščiau išvardintomis plazmidžių poromis tik vietoj pEG202-NLS-grobis įvedant DSD vektorių pEG202-NLS ar vietoj pJG4-5-masalas – AD vektorių pJG4-5. Keturių atsitiktinai pasirinktų transformantų kolonijų ląstelės iki 4 parų augintos ant Gal/+Leu, Gal/-Leu ir Glu/-Leu terpių. Ant Gal/-Leu augančios mėlynos spalvos mielės rodo, kad EGY48[pSH18-34] ląstelių, turinčių atitinkamą pEG202-NLS-grobis ir pJG4-5-masalas plazmidžių porą, sintetinami su DSD ir AD sulieti baltymai sąveikauja tarpusavyje. Jei neauga ant Gal/-Leu terpės, o ant Gal/+Leu auge baltos spalvos mielės, vadinasi, chimeriniai baltymai nesąveikauja. Su AD sulieti baltymai yra sintetinami sistemos mielėse tik tuomet, kai jų auginimui kaip anglies šaltinis yra naudojama galaktozė. Todėl pasirinktų transformantų kolonijų ląstelių neaugimu ant Glu/-Leu terpės įsitikinta, kad gauti dviejų baltymų sąveikos rezultatai yra teisingai teigiami.

2.2.20. Mielių ląstelių lizatų paruošimas

Į 3 ml galaktozinės terpės be uracilo ir His, Trp ar. užsėta po vieną EGY48[pSH18-34] ląstelių, turinčių pEG202-NLS-SE-core ir pJG4-5-DCL1-PAZ bei pEG202-NLS-SE-core ir pJG4-5-DCL1-Helikazinis plazmides, koloniją, kuri 30 °C temperatūroje auginta per naktį 220 rpm greičiu besisukančioje purtyklėje. Dalis naktinės kultūros užsėta į tokią pačią terpę ir auginta 30 °C temperatūroje 220 rpm greičiu besisukančioje purtyklėje kol pasiekė 0,6 optinį tankį ($\lambda = 600$ nm). Tuomet, remiantis Kushnirov mielių ląstelių lizavimo metodika (Kushnirov, 2000), 4,2 ml tokios ląstelių suspensijos 14 sek. centrifuguotos 14000 rpm greičiu kambario temperatūroje. Į 100 μ l vandens suspenduotas ląsteles pridėta 100 μ l 0,2 M NaOH tirpalo, sumaišyta ir 5 min. inkubuota kambario temperatūroje. Pašalinus supernatantą 30 sek. centrifuguojant 14000 rpm greičiu, įpilta 50 μ l 2,5x baltymų dažo tirpalo, sumaišyta ir 5 min. kaitinta 99 °C temperatūros blokiniam termostate-purtyklėje. Po 1 min. centrifugavimo 14000 rpm greičiu, supernatantas (ląstelių lizatas) surinktas.

2.2.21. Glutathiono S-transferazės (GST) ištraukimo metodas

In vitro dviejų baltymų tarpusavio sąveikos tyrimui GST ištraukimo metodu, būtinas su glutathiono S-transferaze sulietas baltymas „masalas“. Šis baltymas inkubuojamas su kitu tiriamu baltymu „grobium“ (mėginys „GST-masalas“), N gale turinčiu šešių His ar. inkarų (suliejimas su His inkaru, kaip ir su GST, leidžia identifikuoti baltymus atlikus imunoblota) (2.4 pav.). Be šio sąveikos mėginio, paruošiamas ir kontrolės mėginys, kuriame tik iš GST sudarytas baltymas inkubuojamas su baltymu „grobium“ turinčiu šešias histidino liekanas (mėginys „GST“). Tuomet kiekvieno mėginio mišinys sumaišomas su GST substratu, redukuotu glutathionu (GSH) padengtu Glutathione Sepharose 4B sorbentu. GST sąveikaujant su GSH, „masalo•grobio“ kompleksas prijungiamas prie sorbento, o visa, kas nesąveikauja su sorbentu, pašalinama jį kelis kartus plaunant buferiu. Su sorbentu sąveikavę baltymai nuo jo atskiriami



2.4 pav. GST ištraukimo eksperimento schema. Pažymėjimai: In (angl. *input*) – 1/5 baltymo “grobio”, N gale sulieto su papildomais šešiais His, kiekio, naudoto ruošiant GST ištraukimo eksperimento mėginius “GST-masalas” ir “GST”; GST-masalas – sąveikos mėginys, skirtas galimos “grobio”, turinčio papildomas His ar., sąveikos su “masalu”, sulieto su GST, nustatymui; GST – kontrolės mėginys, parodantis ar “grobis” nesąveikauja su GST ar eksperimente naudojamu sorbentu; NDS-PAAG – baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis su natrio dodecilsulfatu. Imunoblotai su anti-His antikūnais parodo šešis papildomus histidinus turinčio baltymo “grobio”, o su anti-GST antikūnais – su GST sulieto baltymo “masalo” bei GST kiekį atitinkamuose mėginiuose.

naudojant aukštą temperatūrą. Mėginiai ta pačia tvarka du kartus užnešami į PAAG takelius. Taip pat į „In“ takelius užnešama ir 1/5 į abiejų mėginių mišinius pridėto „grobio“ (2.4 pav.). Baltymai frakcionuojami poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (NDS-PAAG) su natrio dodecilsulfatu. Norint įsitikinti, jog gelyje baltymų juostelės atitinka tiriamus baltymus, atliekamas imunoblotas. PAAG išfrakcionuoti mėginių baltymai perkeliama ant membranos, kuri perkerpama į dvi dalis. Vieną jos dalį veikiant anti-His antikūnais (Ak), identifikuojamas šešias papildomas His ar. turintis baltymas „grobis“ „In“ ir „GST-masalas“ (jei tiriami „masalas“ sąveikauja su „grobium“) mėginių takeliuose, o kitą membranos dalį – anti-GST Ak, GST ir su GST sulietas „masalo“ baltymas atitinkamai „GST“ ir „GST-masalas“ mėginių takeliuose. Antigeno•antikūno kompleksai vizualizuojami antrinais antikūnais, konjuguotais su krienų peroksidaze spalvinės, detektuojant GST ir su GST sulietus baltymus, bei chemiliuminescencinės, identifikuojant šešis papildomas histidinus turinčius baltymus, reakcijų metu. Pasitelkiant anti-His antikūnus membranos „GST“ takelyje išryškinama juostelė rodo, jog „grobis“ sąveikauja su GST ir/arba naudojamu sorbentu, vadinasi „masalo“ ir „grobio“ sąveika yra nespecifinė. Jei pastarajame takelyje juostelė nematoma, tačiau ji išryškėja „GST-masalas“ takelyje, vadinasi „grobis“ sudaro kompleksą su „masalu“.

Darbe GST ištraukimo eksperimentai atlikti, kai baltymas „grobis“ (2.4 pav.) yra pilno ilgio metiltransferazė ar jos mutantinis baltymas. GST ištraukimo eksperimento mėginiai, sudaryti iš 1x DMTL-G buferio, 9,1 % glicerolio, 2 μM „grobio“ ir 1 μM „masalo“ ar 1 μM GST (kontrolinis mėginys), 20 min. inkubuojami kambario temperatūroje (tiriamų baltymų sąveikos atveju, susidaro „masalo•grobio“ kompleksas). Tuomet, po sumaišymo su 15 μl 50 % pagal gamintojo rekomendacijas paruoštu Glutathione Sepharose 4B sorbentu, mėginiai 2 val. inkubuojami kambario temperatūroje maišyklėje-vartyklėje (baltymų sąveikos atveju „masalo•grobio“ kompleksas, su „masalu“ sulietam GST sąveikaujant su sorbento GSH, prijungiamas prie sorbento). Visa, kas nesusąveikavo su sorbentu, pašalinama

sorbentą tris kartus plaunant 75 µl 1x DMTL-G buferiu. Su sorbentu sąveikavę baltymai nuo jo atskiriami 5 min. kaitinant 95 °C temperatūroje kartu su 1x baltymų dažo tirpalu. Mėginiai ta pačia tvarka du kartus užnešami į PAAG takelius. Taip pat į takelius užnešama ir 1/5 į abiejų mėginių mišinius pridėto „grobio“. Baltymai frakcionuojami poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (NDS-PAAG) su natrio dodecilsulfatu. Norint įsitikinti, jog geliuose baltymų juostelės atitinka tiriamus baltymus, atliekamas imunoblotas.

2.2.22. Imunoblotas

PAAG (2.2.5. skyrius), su jame išfrakcionuotais GST ištraukimo eksperimento mėginių baltymais ir nudažytų baltymų molekulinės masės žymenimis (leidžiančiais nustatyti tiriamų baltymų dydžius), tris kartus praplaunamas su pernešimo buferiu. Tuomet 30 min. inkubuojamas šiame buferyje kartu su nitroceliuliozine membrane. Panaudojant baltymų šlapio pernešimo aparatą, esant 100 V įtampai per 2 val. baltymai iš PAAG pernešami ant membranos. Nespecifiškai su antikūnais sąveikauti galinčios, perneštais baltymais „neužimtos“ membranos sritys blokuojamos jas padengiant jaučio serumo albuminu (JSA). Tam atkirptos membranos dalys (ar membrana) 1 val. inkubuojamos kambario temperatūroje su blokavimo buferiu ant vartyklės. Po dviejų praplovimų su PBS-T buferiu, per naktį inkubuojama 4 °C temperatūroje ant vartyklės su PBS-T buferyje keturis tūkstančius kartų skiestais pirminiais antikūnais: viena membranos dalis anti-His, kita – anti-GST antikūnais. Po trijų praplovimų su PBS-T, pirminiai anti-His ir anti-GST antikūnai detektuoti antriniais atitinkamai anti-mouse ir anti-goat antikūnais konjuguotais su krienų peroksidaze. Membrana su tris tūkstančius kartų PBS-T buferyje skiestais anti-mouse antriniais antikūnais inkubuojama kambario temperatūroje ant vartyklės 2 val., o membrana su 20000 kartų PBS-T skiestais anti-goat antriniais antikūnais – 30 min. Tuomet membranos tris kartus praplaunamos su PBS-T buferiu ir dar du kartus su PBS, norint pašalinti į PBS-T buferio sudėtį įeinantį Tween-20. Su antikūnais kompleksus sudariusių baltymų juostelės ant membranų išryškinaimos vykstant krienų peroksidazės

fermentinėms reakcijoms. Papildomus šešis histidinus turintys ir su anti-His Ak sąveikavę baltymai detektuoti naudojant komercinius ECL (sustiprinta chemiliuminescencija; angl. *enhanced chemiluminescence*) reagentus, susidarant chemiliuminescensiniam krienų peroksidazės vykdytos reakcijos produktui, kuris detektuotas membraną eksponuojant ant rentgeno juostos, ją ryškinant ryškinimo tirpale ir fiksuojant fiksavimo tirpale. GST turintys ir su anti-GST antikūnais sąveikavę baltymai identifikuoti pasitelkus komercinį tirpalą turintį 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB), kurį krienų peroksidazė verčia netirpiu tamsiai mėlynu reakcijos produktu.

10 % PAAG (2.2.5. skyrius), su jame išfrakcionuotais 6 μ l mielių lizato baltymais ir nudažytų baltymų molekulinės masės žymenimis, tris kartus praplaunamas su pernešimo buferiu. Tuomet atliekama tokia pati, aukščiau aprašyta procedūra. Hemaglutinino (HA) epitopą turinčių baltymų detekcijai naudoti PBS-T buferyje 1:500 santykiu praskiesti pirminiai anti-HA antikūnai, ir 1:1000 santykiu praskiesti antriniai anti-rabbit antikūnai, konjuguoti su krienų peroksidaze. Su anti-HA antikūnais kompleksus sudariusių baltymų juostelės išryškinimui naudoti ECL reagentai.

REZULTATAI

HEN1 šeimos RNR 2'-O-metiltransferazės, turinčios konservatyvų metiltransferazinį domeną, yra aptinkamos daugelyje organizmų, nuo bakterijų iki žinduolių. Atsižvelgiant į domenų pobūdį ir išsidėstymą, šie fermentai yra skirstomi į keturis pošeimius (1.26 pav.; detaliau žr. 1.2.4.3. skyrių). Mažosios nekoduojančios RNR (mnkRNR), dalyvaujančios posttranskripcinėje genų raiškos reguliacijoje eukariotuose, yra modifikuojamos pirmo (metilina miRNR/miRNR*, siRNR/siRNR*) ir antro (piRNR, siRNR) pošeimių metiltransferazių. Parodyta, kad metilinimas apsaugo mnkRNR nuo papildomo 3' galo uridilinio ir/ar 3'-5' degradacijos (Ameres et al., 2010; Kamminga et al., 2010; Kurth et Mochizuki, 2009; Zhao et al., 2012a). Pažymėtina, kad antro pošeimio gyvūnų metiltransferazės modifikuoja viengrandines RNR (vgRNR), o pirmo pošeimio, kuriam priklauso tiriamą *A. thaliana* HEN1, žaliadumblių bei augalų metiltransferazės - tik dvigrandines RNR (dgRNR). Išskirtinė pastarojo pošeimio fermentų savybė – daugiadomeninė struktūra. Huang ir bendraautorių rentgeno spektroskopine analize nustatytoje vairo HEN1 komplekso su dvigrandine mnkRNR ir kofaktoriaus produktu AdoHcy struktūroje (1.22 pav. B) nustatyti, be konservatyvaus metiltransferazinio, keturi N gale išsidėstę domenai (1.22 pav. A), kurie nebūdingi nė vienam HEN1 homologui gyvūnuose ar bakterijose (1.26 pav.). Tai nežinomos funkcijos, į peptidil-prolino *cis-trans* izomerazę panašus P domenas, du R¹ ir R² domenai, kuriuose randamos dgRNR surišančios sritys, bei tarp pastarųjų išsidėstęs La motyvą turintis L domenas, kuris sąveikauja su mnkRNR duplekso metilinos grandinės 5' galu. Tačiau detalus HEN1 ar tam pačiam pošeimiui priklausančių baltymų veikimo mechanizmas nebuvo žinomas. Todėl norint detaliau suprasti, kaip vyksta dvigrandinio substrato atpažinimas ir metilinimas, atlikti pilno ilgio HEN1 (toliau HEN1-wt) (3.1 pav. A) fermentiniai tyrimai, panaudojant pirminį (nemetilintą) ir tarpinius (hemimetilintus) bei galutinį (pilnai metilintą dgRNR) reakcijos produktus.

Gauti rezultatai pateikti 3.1. skyriuje. Norint suprasti R¹ ir R² domenų funkcijas, tirtas jų indėlis HEN1 susirišimui su dgRNR, panaudojant sutrumpintus HEN1, neturinčio R¹ ar kelių domenų (3.1 pav. B) bei baltymus turinčius šių domenų tam tikrų aminorūgščių mutacijas ar delecijas (3.1 pav. C). Šių tyrimų rezultatai ir jų palyginimas su gautaisiais panaudojant HEN1-wt – pateikti 3.2. skyriuje, o 3.3. skyriuje – eksperimentinių tyrimų duomenys, gauti norint nustatyti nežinomą, vienintelio su dgRNR sąveikų nesudarančio, HEN1 P domeno vaidmenį. Gauti rezultatai suteikė naujų žinių apie augalų miRNR brendimo kelio molekulinės stadijas, kuriose dalyvauja HEN1, HYL1, DCL1 ir SERRATE baltymai. Dalis pastarajame skyriuje pateiktų rezultatų gauti padedant studentei Mildai Mickutei, kurios magistro darbui vadovavau.

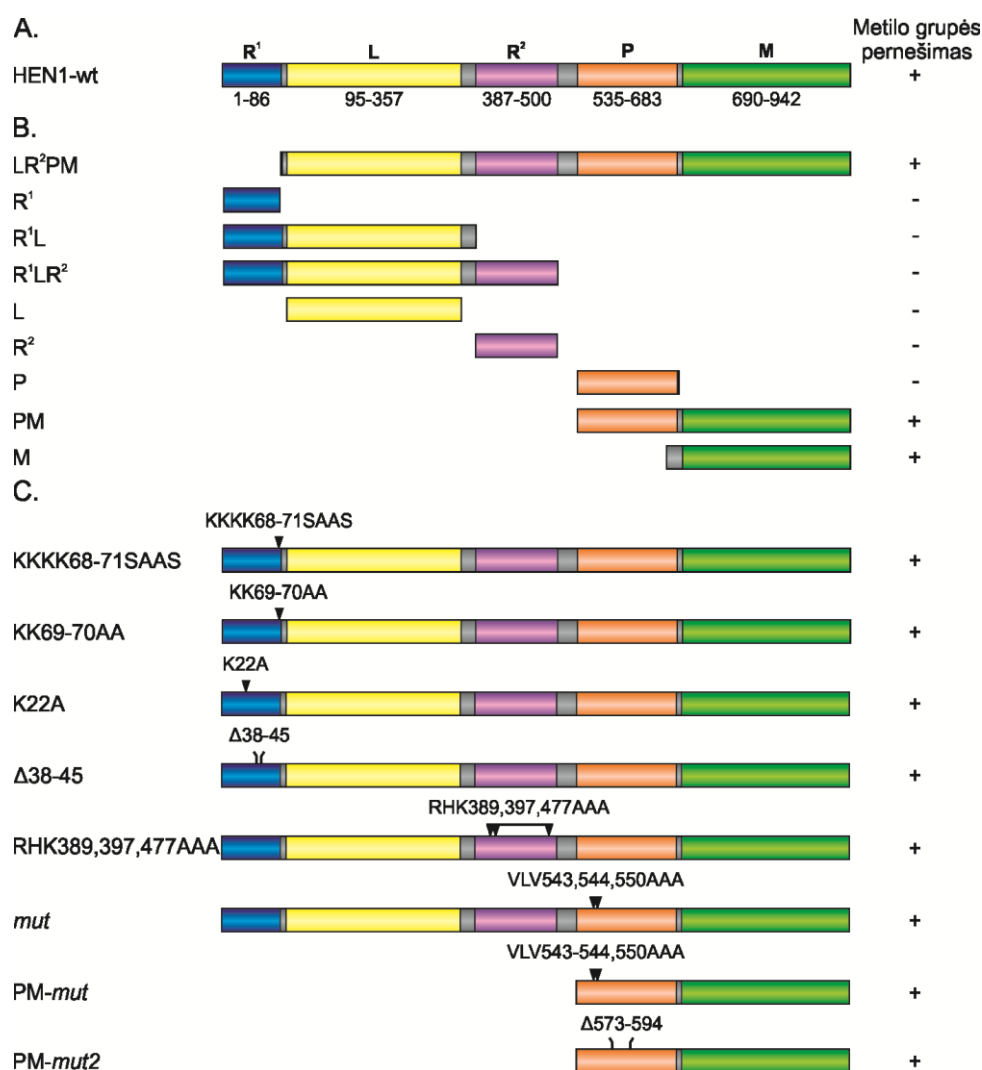
3.1. HEN1 fermentinių savybių tyrimas

3.1.1. Mutantinių HEN1 baltymų aktyvumas modifikuojant nemetilintą substratą

Darbo uždavinių įgyvendinimui sukonstruota eilė plazmidžių, koduojančių įvairius mutantinius HEN1 baltymus (2.2.1. skyrius; HEN1-LR²PM, HEN1-PM ir HEN1-M buvo gauti ankščiau). Visi baltymai N gale turėjo papildomą dvidešimties ar. seką su šešiomis His liekanomis, leidusią juos išgryninti afininės chromatografijos metodu pasitelkiant Ni²⁺ jonais pakrautą HiTrap IMAC HP kolonėlę (2.2.4. skyrius). Tiriamojo objekto *A. thaliana* metiltransferazės HEN1 ir mutantinių baltymų domeninė organizacija pateikta 3.1 pav.

Norėdami nustatyti, ar kiti HEN1 domenai prisideda prie metiltransferazinio domeno vykdomo substratų metilinimo (Huang et al., 2009; Vilkaitis et al., 2010), įvertinome mutantinių HEN1 baltymų ir pilno ilgio metiltransferazės aktyvumus, atlikus metilgrupės pernešimo ant miR173/miR173* (2.2.10. skyrius) eksperimentus. Pastaroji dgRNR – *A. thaliana* HEN1 modifikuojamas substratas. Baltymai neturintys M domeno

(3.1 pav. pažymėti minuso ženklu) substrato nemodifikuoja, o metiltransferazinį domeną turintys mutantiniai baltymai (3.1 pav. pažymėti pliusu), kaip ir pilno ilgio metiltransferazė per 30 min. modifikuoja visas į reakcijos mišinį įdėtas miR173/miR173* (perneštų metilgrupių kiekis atitinka substrato kiekį reakcijos mišinyje). Gauti duomenys patvirtina teiginį, kad už substrato metilinimą yra atsakingas tik metiltransferazinis domenas (Huang et al., 2009; Vilkaitis et al., 2010).



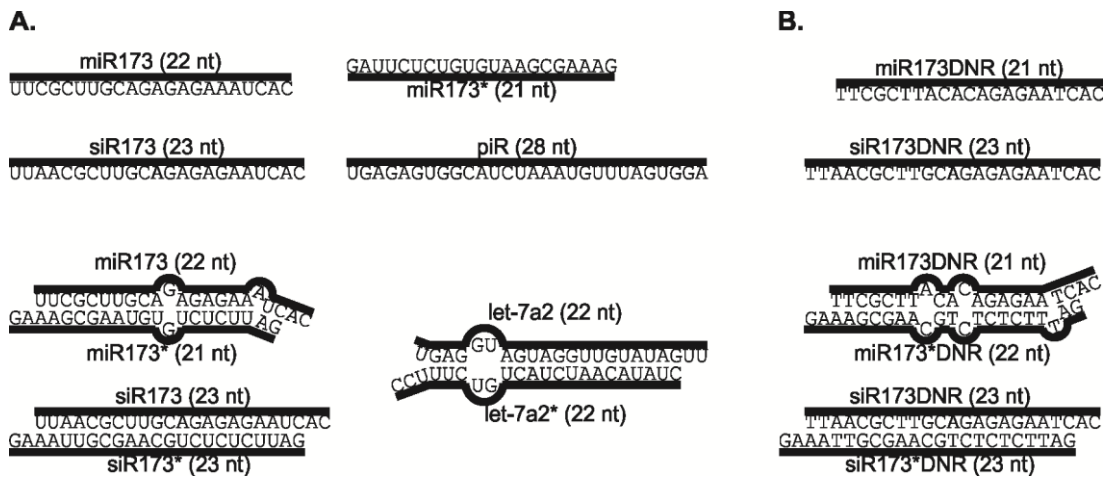
3.1 pav. Tyrimuose naudotų pilno ilgio HEN1 (A), sutrumpintų HEN1 (B) ir baltymų (C) su nurodytomis aminorūgščių mutacijomis ar delecijomis, domeninė organizacija. Domenų santrumpos: R¹ ir R² – pirmasis ir antrasis dgRNR

surišantys; L – La motyvą turintis; P – į peptidil-prolino *cis-trans* izomerazes panašus ir M – metiltransferazinis. Tričiu žymėtos metilgrupės pernešimo nuo radioaktyvaus kofaktoriaus ant dvigrandinio substrato eksperimentais (2.2.10. skyrius) įvertinta, ar HEN1 mutantai katalizuoja tipinio dvigrandinio substrato miR173/miR173* metilinimo reakciją. + pažymėti baltymai, pernešantys metilgrupę ant dgRNR, o minuso ženklu – nepernešantys.

3.1.2. HEN1 surišami substratai

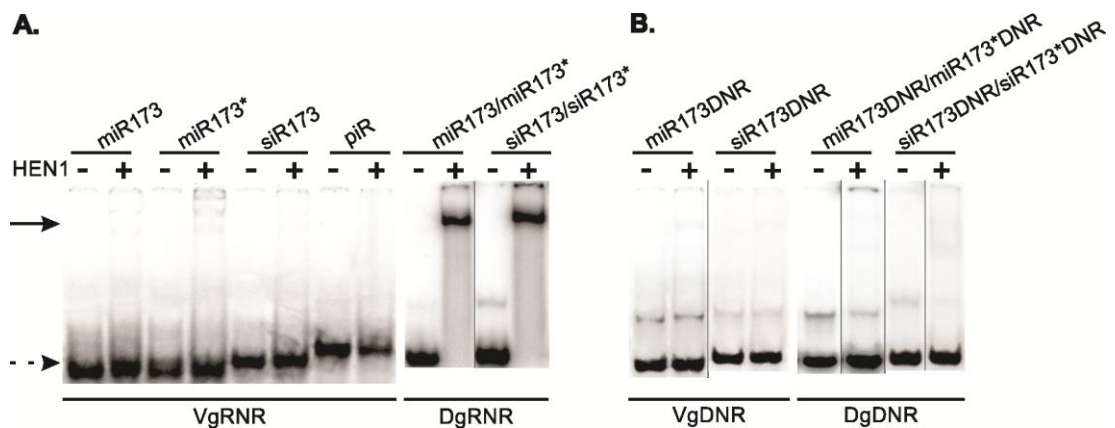
Nors yra parodyta, kad pilno ilgio metiltransferazė HEN1 efektyviai metilina dvigrandinės mnkRNR, bet ne dgDNR ar vgRNR (Vilkaitis et al., 2010; Yang et al., 2006a; Yu et al., 2005), tačiau nebuvo žinoma, ar specifiškumas substrato tipui yra apsprendžiamas surišimo stadijoje ar metilgrupės pernešimo nuo kofaktoriaus AdoMet ant dgRNR 3' galinio nukleotido metu. Norint tai nustatyti, EMSA-PAAG metodu (2.2.14. skyrius) tirta HEN1-wt sąveika su ³²P pažymėtais įvairiais viengrandiniais ir dvigrandiniais substratais (3.2 pav.):

- dvigrandiniais RNR substratais pasirinkti *in vivo* HEN1 metilinamas miR173/miR173* dupleksas ir iš pilnai komplementarių grandinių sudarytas siR173/siR173* dupleksas;
- dvigrandinėmis DNR - siR173DNR/siR173*DNR, kurio abiejų grandinių nukleotidų sekos identišką pasirinktai dvigrandinei siRNR molekulei, ir miR173DNR/miR173*DNR, kuris, kaip ir miR173/miR173* dupleksas, turi nesuporuoto nukleotido iškyšą bei nekomplementarius nukleotidus;
- HEN1-wt sąveikos su viengrandiniais substratais tyrimui panaudotos 21 nt ir 23 nt ilgio vgDNR bei 21–23 nt ilgio vgRNR ir 28 nt RNR oligonukleotidas identišką pelėse aptinkamai ir HEN1 homologo metilinamai piRNR, piR-mmu-49805052 (piRBase, <http://www.regulatoryrna.org/database/piRNA/>).



3.2 pav. Įvairūs viengrandiniai ir dvigrandiniai RNR (A) bei DNR (B) substratai, naudoti sąveikos su metiltransferaze HEN1 tyrimams.

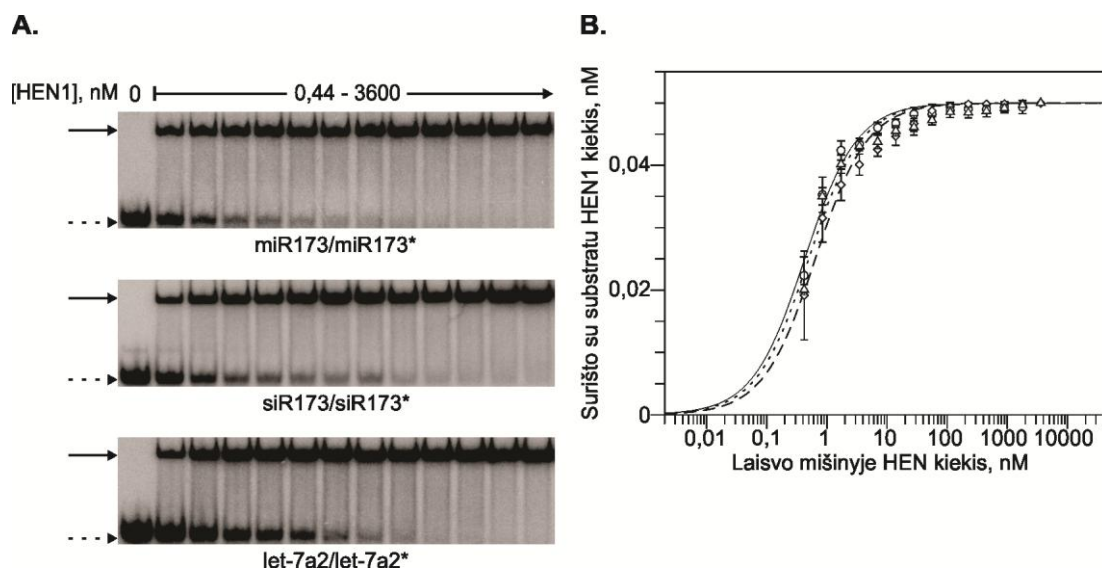
3.3 pav. matomas sumažėjęs dvigrandinių RNR molekulių judrumas poliakrilamido gelyje pridėjus HEN1-wt rodo, kad šis baltymas sudaro kompleksus su dgRNR. Tuo tarpu metiltransferazė su vgRNR, vgDNR ar dgDNR molekulėmis nesąveikauja *in vitro*. Gauti rezultatai rodo, kad HEN1 specifiškumas modifikuojamiems mnkRNR/mnkRNR* dupleksams yra apsprendžiamas substrato surišimo stadijoje.



3.3 pav. HEN1 sąveika su įvairiais RNR ir DNR substratais. Su 0,5 μM HEN1 (+) ar be baltymo (-) inkubuotų ³²P žymėtų viengrandinių ir dvigrandinių RNR (A) ir DNR (B) substratų (0,05 μM) judrumas tirtas natyviame PAAG. Vientisa rodyklė nurodo HEN1 ir nukleorūgšties kompleksą, punktyrinė rodyklė – laisvą nukleorūgštį.

3.1.3. Metiltransferazės HEN1 sąveikos su nemetilintais miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleksais tyrimas

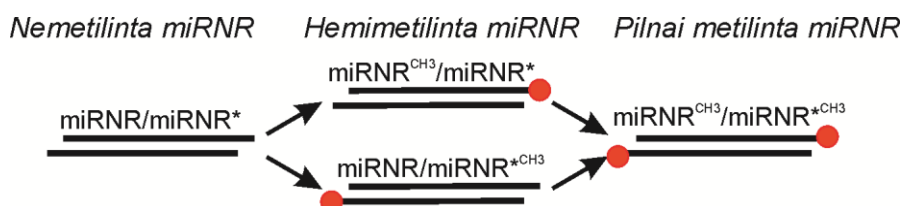
Didžioji dalis vairo vairo mažųjų nekoduojančių RNR yra metilintos (Yu et al., 2010). *A. thaliana* HEN1 dalyvavimas ne tik miRNR, bet ir visų rūšių siRNR susidarymo keliuose (1.1.2. ir 1.1.3. skyriai) (Bologna et Voinnet, 2014; Pumplun et Voinnet, 2013) leidžia spėti, kad miRNR/miRNR* konkuruoja su įvairių rūšių siRNR/siRNR* dupleksais dėl HEN1 katalizuojamos modifikacijos (Yu et al., 2010). Norint nustatyti, ar mnkRNR/mnkRNR* nukleotidų seka ir/ar antrinė struktūra veikia HEN1 afiniškumą substratams, EMSA-PAAG metodu (2.2.15. skyrius) tirta HEN1-wt sąveika su ³²P pažymėtais dviem miRNR/miRNR* dupleksais, miR173/miR173* ir let-7a2/let-7a2*, ir dvigrandine siRNR tipo molekule, siR173/siR173* (3.4 pav.). Pastarasis substratas yra sudarytas iš visiškai komplementarių grandinių, o į jį nukleotidų seka panašus miR173/miR173* dupleksas turi nekomplementarią bazių porą bei nesuporuoto nukleotido iškyšą kreipiančiosios miR173 grandinės 3' gale (3.2 pav. A apačioje). Žmogaus organizme aptinkamas miRNR/miRNR* dupleksas let-7a2/let-7a2* nuo augalų miR173/miR173* skiriasi ne tik nukleotidų seka, bet ir antrine struktūra: turi tris nekomplementarias bazių poras bei, dėl nesuporuoto kreipiančiosios let-7a2 grandinės 5' galinio nukleotido, nekomplementarų duplekso galą. Titruojant substratus didėjančia HEN1-wt koncentracija, natyviuose geliuose stebimas susirišusio su dgRNR baltymo dalies didėjimas (3.4 pav. A). Nubrėžus surišto su substratu baltymo kiekio priklausomybes nuo likusio nesurišto kiekviename mėginyje ir aprašius jas vieno taikinio surišimo lygtimi (3.4 pav. B), apskaičiuotos disociacijos konstantos ir jų standartiniai nuokrypiai kiekvieno substrato atveju: $K_D^{\text{miR173/miR173}^*} = 0,43 \pm 0,05 \text{ nM}$, $K_D^{\text{siR173/siR173}^*} = 0,50 \pm 0,5 \text{ nM}$, $K_D^{\text{let-7a2/let-7a2}^*} = 0,64 \pm 0,5 \text{ nM}$. Gautos artimos disociacijos konstantų reikšmės rodo, kad *in vitro* pilno ilgio metiltransferazė HEN1 suriša siRNR/siRNR* ir miRNR/miRNR* dupleksus panašiu stiprumu, nepaisant jų skirtingų struktūrinių determinančių.



3.4 pav. Pilno ilgio HEN1 sąveika su miR173/miR173*, siR173/siR173* ir let-7a2/let-7a2*. (A) 50 pM ³²P 5' gale pažymėtų mnkRNR/mnkRNR* titravimas didėjančia HEN1-wt koncentracija (nuo 0,44 nM iki 3600 nM) natyviame EMSA-PAAG. 0 pažymėtas kontrolinio, baltymo neturinčio mėginio takelis. Vientisa rodyklė nurodo HEN1 ir dgRNR kompleksą, punktyrinė rodyklė – laisvą nukleorūgštį. (B) EMSA-PAAG gautų surišto su substratu HEN1-wt kiekio priklausomybės nuo laisvo baltymo kiekio ir jų aprašymas vieno taikinio surišimo lygtimi. ○ ir vientisa kreive pažymėta gautos priklausomybės ir jų susiejimas su pastarąja lygtimi naudojant miR173/miR173*, Δ ir trumpų punktyrų kreive - siR173/siR173* bei ◇ ir ilgų punktyrų kreive - let-7a2/let-7a2*. Apskaičiuotos dvinarių kompleksų su HEN1 disociacijos konstantos yra: $K_d^{\text{miR173/miR173}^*} = 0,43 \pm 0,05$ nM, $K_d^{\text{siR173/siR173}^*} = 0,50 \pm 0,05$ nM, $K_d^{\text{let-7a2/let-7a2}^*} = 0,64 \pm 0,05$ nM (pateiktos vidurkinės K_d reikšmės ± standartinis nuokrypis, gautos iš 4-6 identiška atliktų eksperimentų).

3.1.4. HEN1 sąveikos su modifikuotais miRNR/miRNR* substratais tyrimas

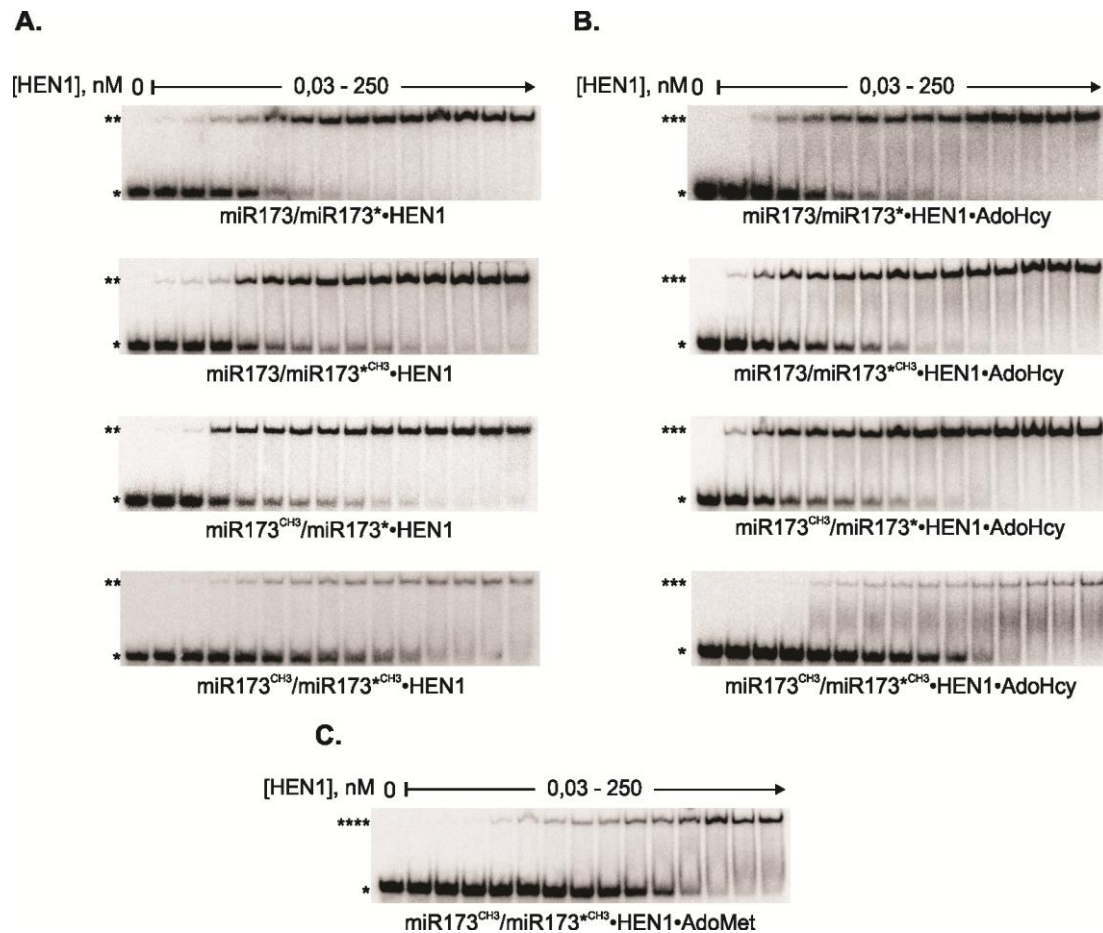
In vitro metiltransferazė HEN1 modifikuoja abi mnkRNR/mnkRNR* duplekso grandines (Vilkaitis et al., 2010; Yang et al., 2006a; Yu et al., 2005), todėl monomerinio HEN1, turinčio vieną metiltransferazinį domeną, katalizuojama substratų modifikacija vyksta per tarpinę hemimetilintą būseną – kai tik viena iš duplekso grandinių turi metilgrupę ir tik po to metilinama antroji grandinė (3.5 pav.). Vadinasi, augalų ląstelėse turėtų egzistuoti nemetilintos, pilnai metilintos ir hemimetilintos dgRNR. Pastarosios gali būti dviejų tipų: turinčios metilintą kreipiančiąją (miRNR^{CH3}/miRNR*) grandinę arba metilintą lydinčiąją (miRNR/miRNR*^{CH3}) grandinę. Norint įvertinti metiltransferazės sąveikos su



3.5 pav. HEN1 katalizuojamo dviejų kelių ir dviejų žingsnių dvigrandinės mnkRNR metilinimo schema. HEN1 katalizuojama substratų modifikacija vyksta per tarpinę hemimetilintą būseną – kai tik viena iš duplekso grandinių turi metilgrupę ir tik po to metilinama antroji grandinė. Nemetilintas miRNR/miRNR* dupleksas gali būti modifikuojamas pirmiau metilinant lydinčiąją grandinę, susidarant miRNR/miRNR*^{CH3} hemimetilintam substratui, arba pirmiau gali būti modifikuojama kreipiančioji grandinė, susiformuojant miRNR^{CH3}/miRNR* hemimetilintam substratui. Raudonu skrituliuku pažymėta metilgrupė.

vieną ar dvi metilgrupes turinčiais substratais stiprumą, EMSA-PAAG metodu (2.2.15. skyrius) tirta HEN1-wt sąveika su *in vivo* metilinamo miR173/miR173* duplekso metu susidarančiais tarpiniais produktais miR173^{CH3}/miR173*, miR173/miR173*^{CH3} ir galutiniu katalizuojamos reakcijos produktu miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} (3.6 pav. A).

Pilno ilgio metiltransferazė sudaro stabilius kompleksus su nemetilintu, hemimetilintais bei pilnai metilintu miR173 dupleksais (3.6 pav. A). Apskaičiuota dvinario HEN1•miR173/miR173* komplekso disociacijos konstanta yra tos pačios nanomoliarinės reikšmės kaip ir HEN1 su hemimetilintais substratais (3.1 lentelė). Tuo tarpu pilnai metilintas substratas yra surišamas HEN1 maždaug 20 kartų silpniau (3.7 pav. A, C; 3.1 lentelė) nei nemetilinta ar hemimetilintos dgRNR, t.y. afiniškumas mnkRNR/mnkRNR* dupleksui sumažėja tik esant dviem metilgrupėms 3' galuose. Nustatytoje HEN1•mnkRNR/mnkRNR*•AdoHcy struktūroje mnkRNR/mnkRNR* duplekso metilinamos grandinės 3' galinio nukleotido ribozės 2'-OH ir 3'-OH koordinaciniais ryšiais įtvirtinamos M domene, o nemetilinamos grandinės 3' galinio nukleotido 2'-OH grupė nesudaro kontaktų su fermento L domenu (1.22 pav. B) (Huang et al., 2009). Todėl gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad afiniškumas substratui sumažėja metilgrupei patekus į M domeną. Spėjame, kad ši grupė fermento aktyviajame centre sukelia sterinius trukdžius, dėl kurių dgRNR 3' galas surišamas silpniau (detaliau 4.1. skyriuje). Šie duomenys rodo, kad M domenas kartu su kitais metiltransferazės domenais



3.6 pav. HEN1 sąveikos su nemetilintu, hemimetilintais ir pilnai metilintu miR173/miR173* dupleksais, nesant kofaktoriaus analogo (A) ir esant 100 μ M AdoHcy (B) ar 100 μ M AdoMet (C) reakcijos mišinyje, tyrimas natyviame PAAG (2.2.15. skyrius). 50 pM 32 P 5' gale pažymėtas RNR dupleksas titruotas HEN1 (0,03 nM mažiausia baltymo koncentracija didinta iki 250 nM). Dvinaris dgRNR•HEN1 kompleksas pažymėtas **, trinaris dgRNR•HEN1•AdoHcy - ***, trinaris dgRNR•HEN1•AdoMet - **** ir laisva dgRNR - *. 0 pažymėtas kontrolinio, baltymo neturinčio mėginio takelis.

(3.2. skyrius) dalyvauja surišant substratą. Artimas HEN1 afiniškumas nemetilintam ir vieną metilgrupę turintiems substratams, leidžia spėti, kad hemimetilintos dgRNR yra orientuojamos fermento taip, kad nemodifikuotos grandinės 3' galinis nukleotidas yra nukreipiamas į M domene esantį katalizinį centrą.

AdoHcy yra HEN1 katalizuojamos reakcijos produktas, susidarantis pernešus metilgrupę nuo kofaktoriaus AdoMet ant 3' galinio nukleotido, kuris kartu su metiltransferaze sudaro trinarį reakcijos kompleksą, turintį hemimetilintą ar pilnai metilintą substratą. Kofaktoriaus analogo daroma įtaka

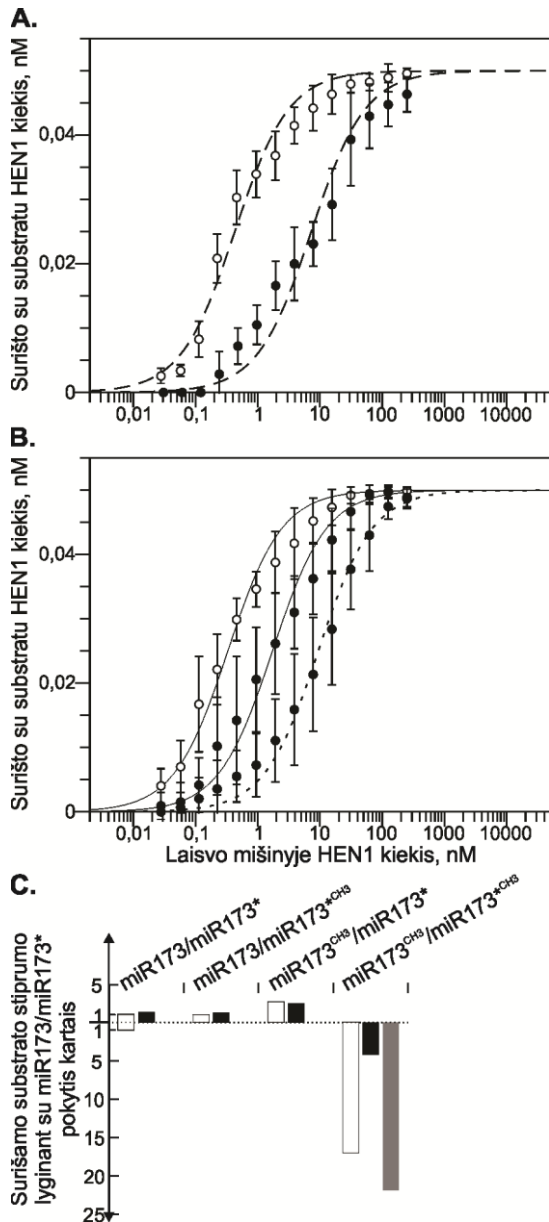
3.1 lentelė. HEN1-wt sąveika su miR173/miR173* dupleksais.

RNR dupleksas	Dvinaris HEN1•RNR, K_d , ($M \times 10^{-10}$)	Trinaris HEN1•RNR•AdoHcy, K_d , ($M \times 10^{-10}$)	Dvinaris HEN1•RNR, k_{off} , ($\text{min}^{-1} \times 10^{-3}$ amplitudė)	Trinaris HEN1•RNR•AdoHcy, k_{off} , $\text{min}^{-1} \times 10^{-3}$
Nemetilinta miR173/miR173*	4,3 ± 0,5	3,2 ± 0,3	4,8 ± 0,2 (67 %) 87 ± 14 (33 %)	2,0 ± 0,1
Hemimetilinta miR173/miR173 ^{CH3}	4,2 ± 0,6	3,3 ± 0,3	3,0 ± 0,1 (44 %) 91 ± 7 (56 %)	2,8 ± 0,1
Hemimetilinta miR173 ^{CH3} /miR173*	1,6 ± 0,3	1,7 ± 0,2	3,8 ± 0,2 (67 %) 52 ± 10 (33 %)	1,3 ± 0,1
Pilnai metilinta miR173 ^{CH3} /miR173 ^{CH3}	72 ± 1	18 ± 2 (AdoHcy) 94 ± 1 (AdoMet)	11,6 ± 0,4 (26 %) >> 70 (74 %) ^{a)}	4,3 ± 0,2

^{a)} Didžioji komplekso dalis išyra iki 10 min.

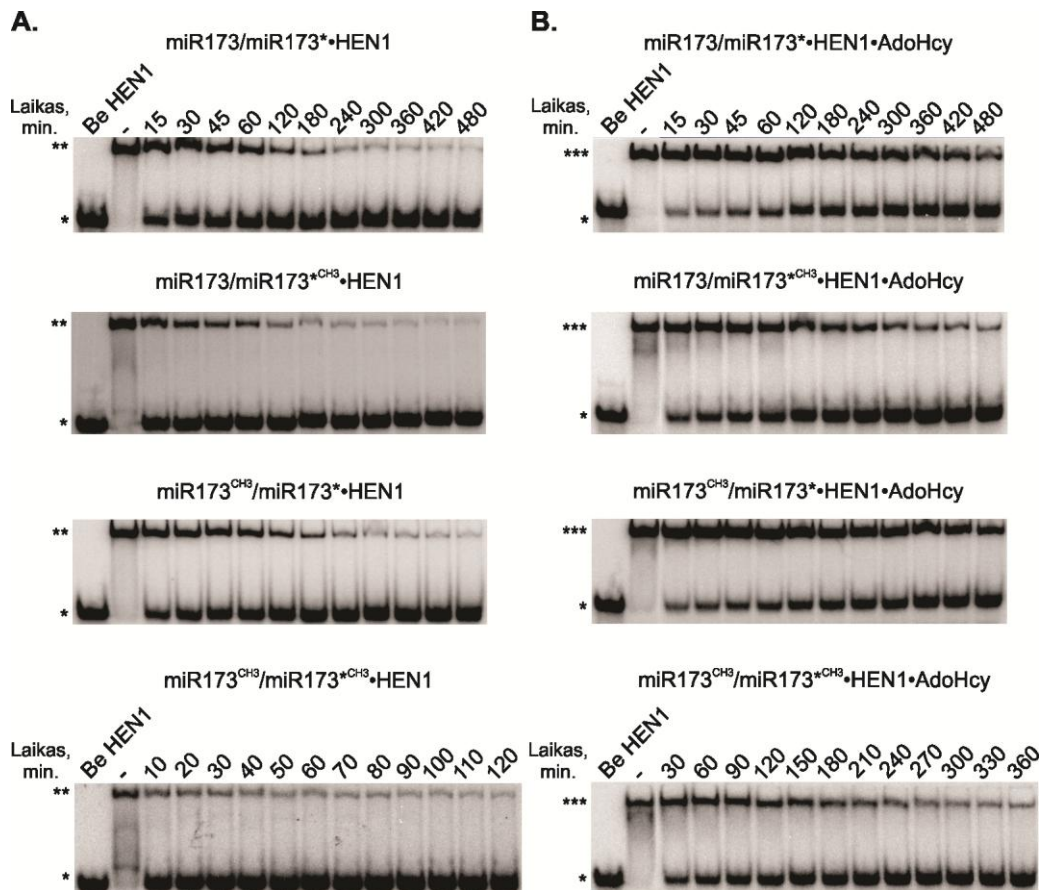
Trinario komplekso reakcijos mišiniai turėjo 100 μM AdoHcy arba 100 μM AdoMet. Dvinarių kompleksų iširimo dinamikos aprašytos dviejų eksponenčių iširimo lygtimi, o trinarių kompleksų - vienos eksponentės iširimo lygtimi. Lentelėje pateiktos vidurkinės K_d ir k_{off} reikšmės ± standartinis nuokrypis, gautos iš 4-7 identiška atliktų eksperimentų. Amplitudės rodo kokios kreivės dalis procentais aprašoma pagal vieną ar kitą kompleksų iširimo greičio konstantą.

substratų surišimui tirta EMSA-PAAG metodu (2.2.15. skyrius) į HEN1-wt reakcijos mišinius su nemetilinta, hemimetilintomis ir pilnai metilinta dgRNR pridėjus 100 μM AdoHcy (3.6 pav. B). Nustatytos dvinarių HEN1•RNR ir trinarių HEN1•RNR•AdoHcy kompleksų su nemetilintu ir hemimetilintais substratais disociacijos konstantų reikšmės yra panašios (3.1 lentelė; 3.7 pav. C), kas rodo, jog kofaktoriaus analogo buvimas reakcijos mišinyje mažai veikia metiltransferazės afiniškumą šiems substratams. Tuo tarpu pilnai metilinto substrato miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} surišimas, pridėjus į reakcijos mišinį AdoHcy, sustiprėja keturis kartus (3.7 pav. C; 3.1 lentelė). Kadangi nustatyta kofaktoriaus jungimosi vieta yra aktyvusis centras M domene, gautas rezultatas dar kartą įrodo metiltransferazinio domeno svarbą substrato prijungimui. Vietoj kofaktoriaus analogo AdoHcy į reakcijos mišinius įdėjus 100 μM AdoMet (3.6 pav. C), susidarancio trinario HEN1•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3}•AdoMet komplekso K_d reikšmė yra didesnė nei pilnai metilintą substratą turinčio trinario komplekso su AdoHcy (3.1 lentelė; 3.7 pav. B, C). Manome, HEN1 aktyviajame centre dviejų, AdoMet ir 3' galinio nukleotido, metilgrupių buvimo sukeliama steriniai trukdžiai iššaukia šį centrą sudarančių ir šalia jų išsidėsčiusių M domeno aminorūgščių šoninių grupių persitvarkymus erdvėje, dėl ko susilpnėja substrato surišimas.



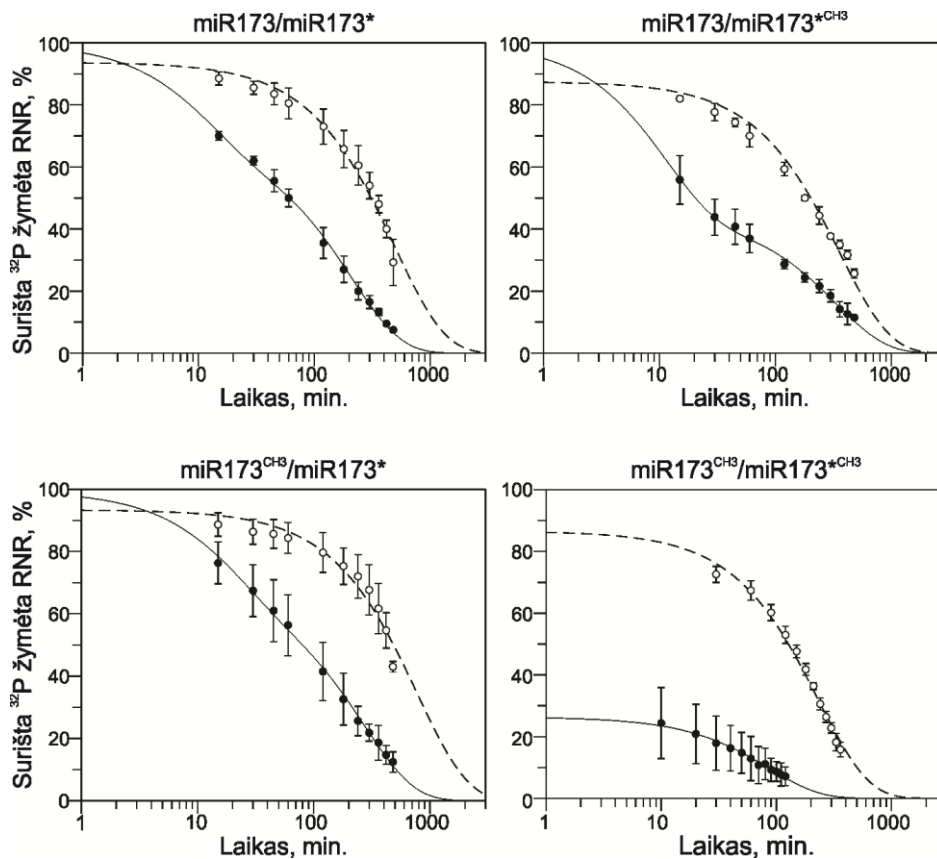
3.7 pav. HEN1 sąveika su nemetilintu, hemimetilintais ir pilnai metilintu miR173 dupleksais. (A) Vieno taikinio surišimo lygtimi (ilgų punktyrų kreivės) susietos EMSA-PAAG gautos surišto su miR173/miR173* (○) ir miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} (●) HEN1-wt kiekio priklausomybės nuo laisvo baltymo kiekio. (B) EMSA-PAAG gautų surišto su miR173/miR173* (○) ir miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} (●) HEN1-wt kiekio priklausomybės nuo laisvo baltymo kiekio esant 100 μM AdoHcy ir jų aprašymas vieno taikinio surišimo lygtimi (vientisos kreivės). Trumpų punktyrų kreivė – tuo pačiu metodu ir būdu gautos surišto su miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} (●) HEN1-wt kiekio priklausomybė nuo laisvo baltymo kiekio esant 100 μM AdoMet. (C) Įvairių substratų surišimo stiprumo, lyginant su miR173/miR173* nesant kofaktoriaus reakcijos mišinyje, pokytis kartais. Stulpelinėje diagramoje pažymėta: balta spalva – dvinariai HEN1 kompleksai; juoda – trinariai HEN1 kompleksai su AdoHcy, pilka – trinaris HEN1 kompleksas su AdoMet

Dvinarių HEN1 kompleksų su pirminiu (miR173/miR173*) ir tarpiniais (miR173/miR173*^{CH3} ir miR173^{CH3}/miR173*) katalizuojamos reakcijos substratais stabilumo įvertinimui, EMSA-PAAG metodu (3.8 pav.; 2.2.16. skyrius) tirta, koku greičiu išyra suformuoti HEN1•RNR kompleksai pridėjus konkurentinės RNR perteklių. Norint įsitikinti, kad HEN1 baltymas eksperimento sąlygomis nėra inaktyvuojamas, analizuoti teigiamos kontrolės mėginiai. Jų takeliuose (3.8 pav. pažymėti brūkšneliais) matomos dvinarių HEN1•mnkRNR/mnkRNR* kompleksų juostelės rodo, kad fermentas išlieka



3.8 pav. Dvinarių, HEN1 su nemetilintu, hemimetilintais ir pilnai metilintu miR173/miR173* kompleksais, kompleksų (A) bei jų trinarių kompleksų su AdoHcy (B) iširimo tyrimas natyviame EMSA-PAAG. Dvinariai RNR•HEN1 (***) ir trinariai RNR•HEN1•AdoHcy (***) kompleksai gauti inkubuojant 150 pM ³²P 5' gale pažymėtą RNR dupleksą ir 0,25 μM HEN1 30 min. 25 °C temperatūroje nesant ar esant 100 μM AdoHcy. Į juos pridėjus didesnę nei 10⁴-kartinį perteklių tokios pačios tik nežymėtos 2 μM dgRNR, kiekvienas mėginys inkubuotas 25 °C temperatūroje atitinkama, virš gelio paveikslu nurodytą laiką ir užneštas į PAAG. Visų gelių pirmame iš kairės į dešinę takelyje stebimas laisvos, HEN1 nesurištos dgRNR migravimas (neigiamos kontrolės mėginys). – pažymėti teigiamos kontrolės mėginių takeliai: dvinarių ir trinarių kompleksų mėginiai inkubuoti 480 min., 360 min. ar 120 min. 25 °C temperatūroje nepridėjus į juos šaltos, nežymėtos RNR pertekliaus. * žymi laisvą, HEN1 nesurištą dgRNR.

aktyvus ir išlaiko surištą substratą praėjus ilgiausiam eksperimente naudojamam inkubacijos su RNR pertekliumi laikui, 8 valandoms. Dvinarių kompleksų iširimo dinamiką (3.9 pav.) pavyko aprašyti tik pritaikius dviejų eksponenčių iširimo lygtį. Tai leidžia spėti, kad mišinyje egzistuoja dviejų skirtingų konformacinių būsenų dvinariai HEN1•miR173/miR173*, HEN1•miR173/miR173*^{CH3}, HEN1•miR173^{CH3}/miR173* kompleksai, kurių iširimo greičio konstantos pateiktos 3.1 lentelėje. Vienos konformacinės



3.9 pav. Dvinarių HEN1 su nemetilinta, hemimetilintomis, pilnai metilinta miR173/miR173* kompleksų ir jų trinarių kompleksų su AdoHcy iširimo kinetika. Dvinarių miRNR/miRNR*•HEN1 (●) ir trinarių miRNR/miRNR*•HEN1•AdoHcy (○) kompleksų iširimo kreivės gautos panaudojant dviejų eksponenčių (vientisa kreivė) ir vienos eksponentės (ilgų punktyrų kreivė) iširimo lygtis. Eksperimentinių sąlygų aprašymas pateiktas 3.8 pav.

būsenos kompleksų iširimo pusperiodis yra ne mažesnis nei 144 min., o kitos konformacinės būsenos kompleksų - ne didesnis nei 14 min. Vadinasi, pastarieji kompleksai disocijuoja maždaug dešimčia kartų greičiau nei didesniu stabilumu pasižymintys. Į reakcijos mišinį pridėjus 100 μ M AdoHcy, gauti duomenys aprašomi vienos eksponentės iširimo lygtimi, apskaičiuojant vieną trinarių kompleksų iširimo greičio konstantą, kuri artima didesniu stabilumu pasižyminčio dvinario komplekso k_{off} . (3.1 lentelė). Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad AdoHcy buvimas metiltransferazės aktyviajame centre sąlygoja visų HEN1•RNR kompleksų perėjimą į didesniu stabilumu pasižyminčią būseną. Artimos dvinarių HEN1•miR173/miR173* ir HEN1•miR173/miR173*^{CH3}, HEN1•miR173^{CH3}/miR173* bei jų trinarių kompleksų su AdoHcy k_{off} reikšmės (3.1 lentelė) patvirtina, kad metilgrupės

buvimas vienos substrato grandinės 3' gale nepaveikia kompleksų stabilumo.

Norint nustatyti, ar mnkRNR/mnkRNR* duplekso metilinamos grandinės 3' galinio nukleotido metilgrupės atsiradimas M domene veikia dvinarių HEN1•RNR kompleksų stabilumą, EMSA-PAAG metodu (2.2.16. skyrius) tirtas suformuoto HEN1•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} komplekso iširimas laike (3.8 ir 3.9 pav.). Metiltransferazei sąveikaujant su galutiniu reakcijos produktu taip pat susidaro skirtingo stabilumo dvinariai kompleksai (3.1 lentelė). Tačiau priešingai nei HEN1•miR173/miR173* ar HEN1•miR173/miR173*^{CH3}, HEN1•miR173^{CH3}/miR173* kompleksų atveju, didžiąją dalį dvinarių HEN1 kompleksų su pilnai metilintu substratu sudaro mažesniu stabilumu pasižymintys kompleksai. Gauti rezultatai rodo, kad metilo grupės atsiradimas aktyviajame centre paveikia dvinarių kompleksų stabilumą. Tačiau, kaip ir pradinio nemetilinto ar tarpinių hemimetilintų RNR substratų atveju, pastarieji HEN1•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} kompleksai pereina į stabilesnę būseną AdoHcy esant M domene. Tai parodo svarų reakcijos produkto AdoHcy indėlį stabilių HEN1 kompleksų su pirminiu, tarpiniais ir galutiniu reakcijos substratais susidarymui. Spėjame, kad AdoHcy prisijungus mažesniu stabilumu pasižyminčio HEN1•RNR komplekso M domene, vyksta persitvarkymai, dėl kurių padaugėja sąveikų tarp šio ir kito HEN1 domeno, kas sąlygoja substrato „užrakinimą“ fermente (detaliau 4.1. skyriuje).

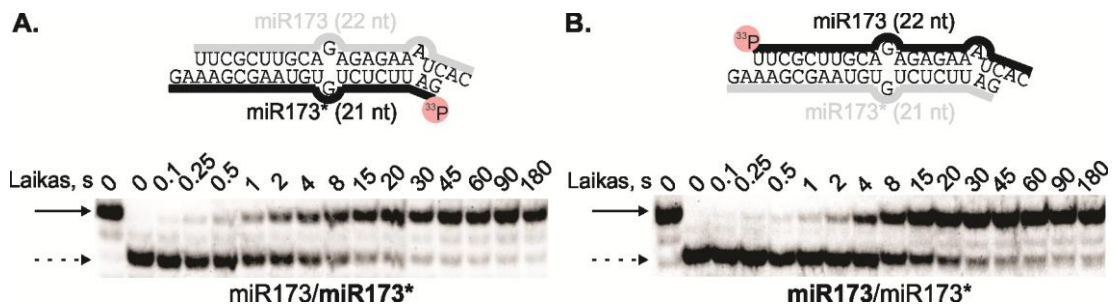
3.1.5. Nemetilinto ir hemimetilinto miRNR/miRNR* duplekso individualių grandinių metilinimas

HEN1 veikia išskirtinai ant dvigrandinių RNR molekulių ir, bent jau *in vitro*, modifikuoja abi duplekso grandines (Vilkaitis et al., 2010; Yu et al., 2005). Vadinasi, metiltransferazės substratas turi du fermento taikinius – mnkRNR/mnkRNR* duplekso abiejų grandinių 3' galinius nukleotidus. HEN1 turėdamas tik vieną metiltransferazinį domeną miRNR/miRNR* gali modifikuoti tik per tarpinę hemimetilintą būseną: kai viena iš duplekso grandinių turi metilgrupę, ir tik po to įvyksta antros grandinės modifikavimas

(3.5 pav.). Pilna substrato modifikacija gali vykti dviem keliais: iš pradžių metilinant kreipiančiosios miR173 ar lydinčiosios miR173* grandinės 3' galinį nukleotidą. Vienas iš šių kelių gali būti pasirenkamas dažniau nei kitas. Taip pat taikinių modifikacijos greitis gali skirtis.

Norint detaliau suprasti, kaip vyksta *in vivo* modifikuojamo miR173/miR173* duplekso metilinimas, sukūrėme metodiką (2.2.13. skyrius), leidžiančią tirti tik vienos duplekso grandinės, būtent tos, kuri yra žymėta radioaktyviu izotopu, metilinimą esant fermento pertekliui. Norėdami nustatyti lydinčiosios grandinės modifikavimo greitį, greitų cheminių reakcijų stabdymo prietaisu metiltransferazė ir miR173/**miR173*** (toliau pajuodintu šriftu žymima radioaktyviu izotopu žymėta dgRNR grandinė) sumaišoma su 100 μM AdoMet metilinimo reakcijos iniciavimui. Fermentinę reakciją stabdant skirtingu laiku, gauta eilė mėginių, kurie po IO₄⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakcijos frakcionuoti denatūruojančiame PAAG (3.10 pav. A; 2.2.12. skyrius). Iš autoradiogramos įvertinus, kokia radioaktyviu izotopu pažymėtos lydinčiosios grandinės dalis yra užmetilinta kiekviename mėginyje, nubrėžta modifikuotos grandinės dalies priklausomybė nuo metilinimo reakcijos trukmės (3.11 pav. B). Gautus duomenis aprašius dviejų eksponenčių lygtimi nustatytos dvi lydinčiosios grandinės **miR173*** metilinimo greičio konstantos (3.2 lentelė).

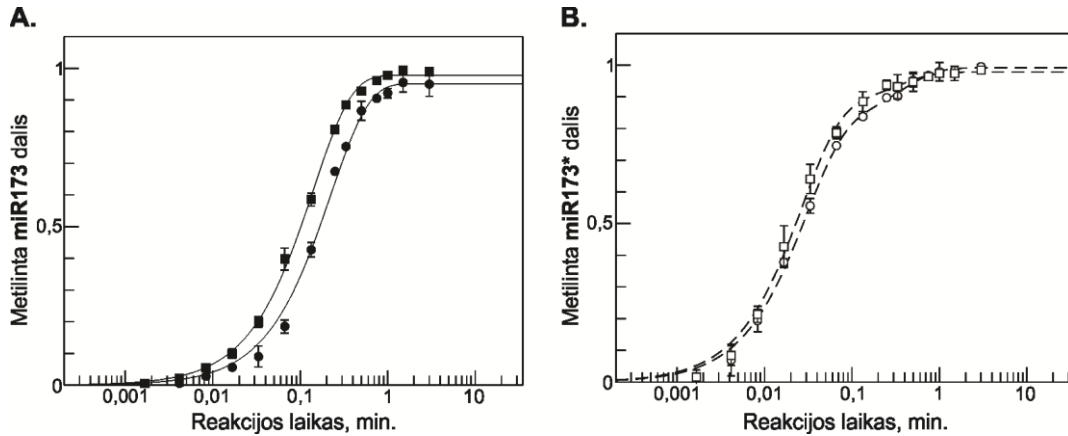
Remiantis 3.5 pav. pateiktu HEN1 katalizuojamos reakcijos modeliu, gelyje stebimos, radioaktyviu izotopu žymėtos lydinčiosios grandinės **miR173*** metilinimas gali vykti dviem keliais. Pirmuoju atveju stebime greitą grandinės modifikaciją, kai HEN1 suriša miR173/**miR173*** dupleksą tokia orientacija, kad fermento metiltransferaziniame domene atsiduria **miR173*** 3' galas ir iškart vyksta šios stebimos grandinės metilinimas (3.12 pav. kairėje). Antruoju, stebime lėtą lydinčiosios grandinės **miR173*** modifikaciją, kai HEN1 sudarant kompleksą su miR173/**miR173*** jo aktyviajame centre atsiduria kreipiančiosios, nežymėtos grandinės miR173 3' galas, po kurio metilinimo, trinario komplekso, sudaryto iš reakcijos produkto AdoHcy, fermento bei



3.10 pav. Nemetilinto miR173/miR173* duplekso lydinčiosios miR173* (A) ir kreipiančiosios miR173 (B) grandinių modifikacijos HEN1 dinamika. 0,25 μ M HEN1 su 100 μ M AdoMet sumaišyti su 0,1 μ M dgRNR ir inkubuoti atitinkamą, virš gelio paveikslo nurodytą laiką 37 °C temperatūroje. Tuomet mėginiai po IO₄⁻ oksidacijos/ β -eliminacijos reakcijos užnešti į denatūruojantį PAAG. Į pirmą ir antrą takelius iš kairės į dešinę užnešti kontroliniai mėginiai: reakcijos mėginiai, į kuriuos kofaktoriaus pridėta po HEN1 degradacijos proteinaze K ir kuriuose atitinkamai nevykdyta ir vykdyta IO₄⁻ oksidacijos/ β -eliminacijos reakcija. Po gelio paveikslo pajuodintu šriftu žymima radioaktyviu ³³P izotopu žymėta dgRNR grandinė. Vientisa rodyklė nurodo modifikuotą, žymėtą RNR duplekso grandinę, punktyrinė rodyklė – nemodifikuotą, žymėtą RNR duplekso grandinę. Pastaba: šių autoradiogramų nuotraukos pateiktos kaip pavyzdinės, kurios gaunamos tiriant individualių miRNR/miRNR* duplekso grandinių metilinimą esant baltymo pertekliui, kitų eksperimentų autoradiogramos darbe nepateikiamos.

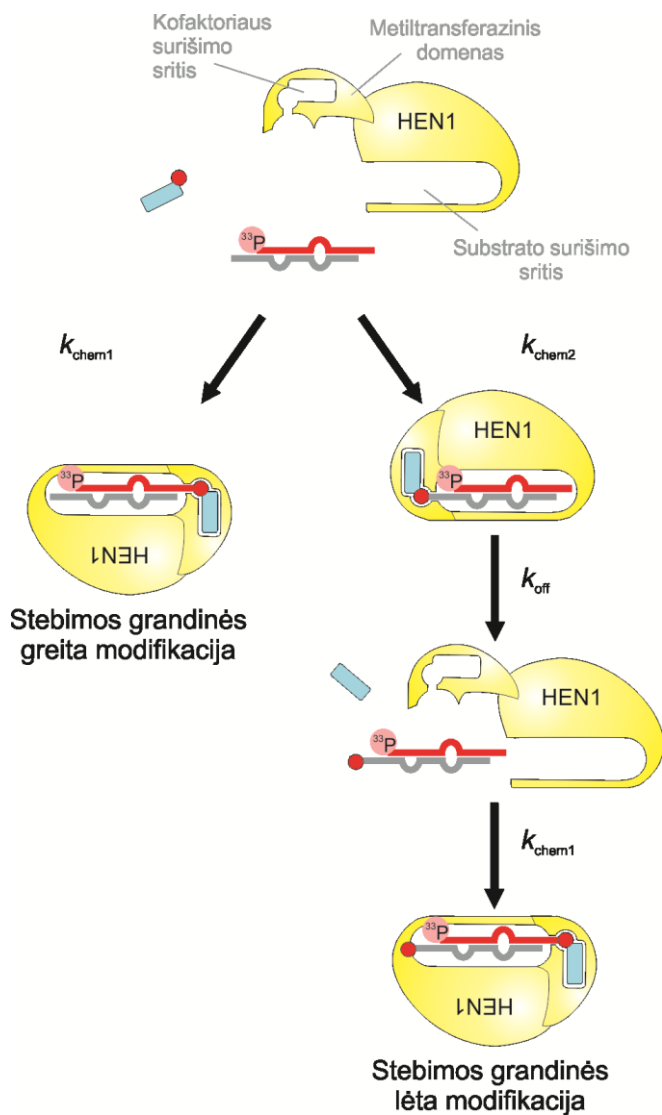
hemimetilintos dvigrandinės miR173 iširimo, vyksta antrinio HEN1 ir miR173^{CH₃}/miR173* komplekso susidarymas lydinčiosios grandinės modifikacijai palankia orientacija (3.12 pav. dešinėje). Remiantis šiuo, miRNR/miRNR* duplekso individualių grandinių metilinimo modeliu, lydinčiosios grandinės miR173* modifikacijos pirmoji greičio konstanta (3.2 lentelė) turėtų atitikti greitos fazės metu stebimą tiesioginį metilgrupės pernešimo greitį ($k_{\text{cheml}}^{\text{miR173*}}$) esant 100 μ M AdoMet koncentracijai. Tuo tarpu lydinčiosios grandinės miR173* modifikacijos antroji greičio konstanta atspindi lėtą fazę, kai stebimos grandinės metilinimas įvyksta po nežymėtos grandinės metilinimo ir trinario komplekso iširimo. Ši konstanta yra lygi miR173/miR173* duplekso abiejų grandinių metilinimo ir trinario miR173^{CH₃}/miR173*•HEN1•AdoHcy komplekso iširimo greičių sumai. 3.2 lentelėje šalia abiejų lydinčiosios grandinės miR173* modifikacijos greičių konstantų nurodytos amplitudės rodo, kiek procentais atvejų stebimos grandinės metilinimas vyksta pirmu ir antru keliu. Gautų amplitudžių reikšmės leidžia teigti, kad maždaug 4/5 visų atvejų pirmiausiai modifikuojama stebima,

radioaktyviu izotopu pažymėta lydinčioji grandinė. Vadinasi, dažniau HEN1 su miR173/miR173* dupleksu rišasi orientacija, kuri palanki miR173* grandinės metilinimui, ir tik po to modifikuojama kreipiančioji miR173 grandinė.



3.11 pav. Nemetilinto, hemimetilintų miR173/miR173* dupleksų individualių grandinių modifikacija HEN1 esant fermento pertekliui. (A) Nemetilinto **miR173/miR173*** (●) ir hemimetilinto **miR173/miR173*^{CH3}** (■) dupleksų kreipiančiosios grandinės modifikuotos dalies priklausomybė nuo vykdytos metilinimo reakcijos laiko aprašytos vienos eksponentės lygtimi (vientisos kreivės). (B) Nemetilinto miR173/**miR173*** (○) ir hemimetilinto miR173/**miR173*^{CH3}** (□) dupleksų kreipiančiosios grandinės modifikuotos dalies priklausomybė nuo vykdytos metilinimo reakcijos laiko aprašytos dviejų eksponencijų lygtimi (ilgų punktyrų kreivės).

Atlikus eksperimentus su **miR173/miR173*** dupleksu, nustatėme, kad kreipiančiosios **miR173/miR173*** duplekso grandinės **miR173** metilinimo dinamika (3.10 pav. B) aprašoma vienos eksponentės lygtimi (3.11 pav. A). Spėjame, kad šiuo atveju yra gaunama viena fermentinės reakcijos greičio konstanta (3.2 lentelė), nes stebimos grandinės greitos fazės greitis, atspindintis tiesioginį kreipiančiosios grandinės metilinimo greitį ($k_{\text{chem1}}^{\text{miR173}}$), žymiai nesiskiria nuo lėtos fazės ($k_{\text{chem2}}^{\text{miR173}} + k_{\text{off}} + k_{\text{chem1}}^{\text{miR173}}$) suminio greičio, kur $k_{\text{chem2}}^{\text{miR173}}$ - **miR173/miR173*** duplekso lydinčiosios grandinės modifikacijos greičio konstanta, o k_{off} - trinario **miR173/miR173*^{CH3}•HEN1•AdoHcy** komplekso iširimo greičio konstanta. Vadinasi, $k_{\text{chem1}}^{\text{miR173}}$ reikšmė yra keletą kartų mažesnė už $k_{\text{chem1}}^{\text{miR173*}}$, kas leidžia daryti prielaidą, kad ant miR173/miR173* duplekso lydinčiosios grandinės metilgrupės yra pernešamos greičiau nei ant kreipiančiosios grandinės.



3.12 pav. miRNR/miRNR* duplekso individualių grandinių metilinimo modelis. dgRNR individualių grandinių metilinimo tyrimuose PAAG yra stebima ^{33}P žymėtos miRNR grandinės (parodyta raudonai) modifikacijos dinamika, o nežymėta miRNR grandinė (parodyta pilkai) gelyje nestebima. Priklausomai nuo dgRNR surišimo orientacijos, HEN1 pirmiau gali modifikuoti žymėtą arba nežymėtą grandinę. Jei pirmiau metilinama žymėta grandinė, gaunama greitos modifikacijos konstanta (k_{chem1}). Lėta žymėtos grandinės modifikacija ($k_{\text{chem2}} + k_{\text{off}} + k_{\text{chem1}}$) stebima, kai HEN1 pirmiau metilina nežymėtą grandinę (k_{chem2}) ir tik po trinario HEN1 komplekso su hemimetilinta dgRNR ir AdoHcy iširimo (k_{off}) suriša ir modifikuoja (k_{chem1}) žymėtą grandinę. Mėlynu stačiakampiu pažymėtas AdoHcy; raudonu skrituliuku – metilgrupė; mėlynu stačiakampiu sujungtu su raudonu skrituliuku – AdoMet.

Žinant, kad pilnas miRNR/miRNR* dupleksų metilinimas vyksta per tarpinę hemimetilintą būseną, kuomet tik viena duplekso grandinė yra modifikuota (3.5 pav.), buvo įdomu nustatyti, ar vienos metilgrupės buvimas duplekse turi įtakos antros grandinės modifikacijos greičiui. Tam gautos kreipiančiosios ir lydinčiosios grandinės modifikacijos greičio konstantų reikšmės palygintos su gautosiomis A. Osipenko, panaudojant hemimetilintus miR173^{CH3}/miR173* ir miR173/miR173*^{CH3} substratus. Iš 3.2 lentelėje pateiktų duomenų matyti, kad nemetilinto ir hemimetilintų miR173/miR173*

dupleksų individualių grandinių metilinimo HEN1 parametrų reikšmės yra artimos (3.11 pav.). Gauti rezultatai leidžia teigti, kad pastarosios dgRNR nemodifikuotos grandinės metilinimo greitis nekinta atsiradus vienai metilgrupei substrate.

3.2 lentelė. Nemetilinto miR173/miR173* ir hemimetilintų miR173/miR173*^{CH3}, miR173^{CH3}/miR173* dupleksų individualių grandinių metilinimo HEN1 parametrai.

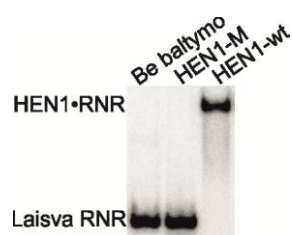
	miR173/miR173*		miR173/miR173* ^{CH3}		miR173 ^{CH3} /miR173*	
	$k_{obs.}(\text{min}^{-1})$	Amplitudė (%)	$k_{obs.}(\text{min}^{-1})$	Amplitudė (%)	$k_{obs.}(\text{min}^{-1})$	Amplitudė (%)
Kreipiančioji gr. (miR173)	4,5 ± 0,2	100	7,0 ± 0,2	100		
Lydinčioji gr. (miR173*)	35 ± 3	79 ± 3			38 ± 3	87 ± 5
	2,9 ± 1	21 ± 3			3,3 ± 2	13 ± 5

Visos metilinimo reakcijos vykdytos esant 100 μM AdoMet. Gauti duomenys su dgRNR kreipiančiosiomis ir lydinčiosiomis grandinėmis aprašyti atitinkamai vienos ir dviejų eksponenčių lygtimis. Greičio konstantų amplitudės, parodančios kokia krieivės dalis aprašoma pagal vieną ar kitą greičio konstantą, išreikštos procentais. Išsamesnis eksperimentinių sąlygų aprašymas pateikiamas tekste.

3.2. HEN1 R¹ ir R² domenų vaidmuo mnkRNR/mnkRNR* duplekso surišime ir metilinime

Remiantis aminorūgščių sekos analize ir tretine struktūra *A. thaliana* HEN1 baltyme be konservatyvaus metiltransferazinio domeno nustatyti keturi papildomi, gyvūnų ir bakterijų HEN1 metiltransferazėms nebūdingi, domenai, išsidėstę fermento N gale: P, L ir du R domenai (3.1 pav.) (Huang et al., 2009; Tkaczuk et al., 2006). Biotechnologijos institute atlikus HEN1 mutantinio baltymo, sudaryto tik iš M domeno (HEN1-M), kinetinius tyrimus stacionariomis sąlygomis nustatyta, kad, nors vien tik metiltransferazinio domeno pakanka substrato abiejų 3' galinių nukleotidų ribozijų 2'-OH atpažinimui ir metilinimui, augalų HEN1 metiltransferazės N galo domenai yra svarbūs efektyvaus katalizinio komplekso su mnkRNR/mnkRNR* susidarymui (Vilkaitis et al., 2010). Tęsiant eksperimentus ištirta pastarojo sutrumpinto baltymo ir pilno ilgio HEN1 (3.1 pav. A, B) sąveika su miR173/miR173* dupleksu EMSA-PAAG metodu (2.2.14. skyrius). 3.13 pav. matyti, kad substrato judrumas, dėl susidariusio baltymo ir dgRNR komplekso,

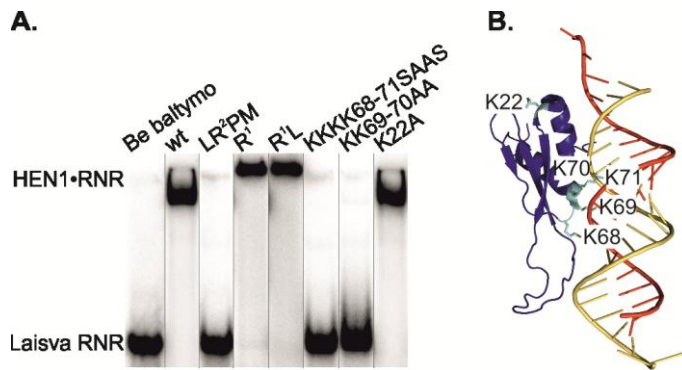
gelyje kinta tik į reakcijos mišinį pridėjus HEN1-wt. Nors ankstesniame skyriuje parodyta, jog HEN1 metiltransferazinis domenas dalyvauja surišant dgRNR, gauti rezultatai patvirtina, kad natyviame gelyje detektuojamo HEN1•miR173/miR173* kompleksų susidarymui vieno M domeno nepakanka, t.y. pastarojo kompleksų susiformavimui yra būtini N galo domenai. 1.22 pav. B dalyje pateiktoje spiralinėje-klostinėje HEN1 kompleksų su mnkRNR/mnkRNR* dupleksu ir kofaktoriaus produktu AdoHcy struktūroje matyti, kad nežinomos funkcijos P domenas nesudaro tiesioginių sąveikų su dgRNR, o L domenas yra atsakingas už RNR duplekso modifikuojamos grandinės 5' galo surišimą ir kartu su metiltransferaziniu domenu veikia kaip „molekulinė liniuotė“ nustatant metilinamo substrato ilgį (Huang et al., 2009). Iš R¹ ir R² domenų ar. sekos ir spiralinės-klostinės struktūros palyginimo su kitų mnkRNR biogenezėje dalyvaujančių baltymų dgRNR surišančiais domenais, spėjamas šių domenų dalyvavimas substrato surišime, tačiau išsamesnis HEN1 abiejų R domenų funkcinis charakterizavimas nebuvo atliktas. Todėl panaudojant HEN1 mutantinius baltymus, tirtas R¹ ir R² domenų vaidmuo substrato surišimui, susidarančių kompleksų stabilumui ir nemonifikuotos dgRNR metilinimui.



3.13 pav. Pilno ilgio metiltransferazės HEN1-wt ir mutantinio baltymo HEN1-M, sudaryto tik iš metiltransferazinio domeno, sąveika su miR173/miR173* dupleksu. Su 0,25 μM baltymo ar be jo (pirmas takelis iš kairės į dešinę) inkubuotos ³²P 5' gale žymėtos dgRNR (0,05 μM) judrumas tirtas natyviame PAAG.

3.2.1. HEN1 R¹ domeno funkcinis tyrimas

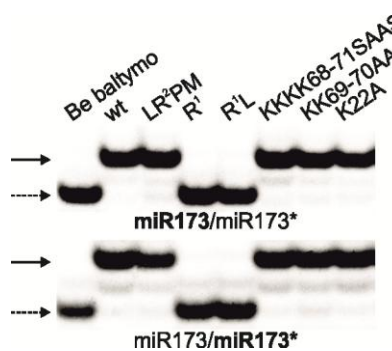
Norint eksperimentiškai nustatyti, ar metiltransferazės R¹ domenas dalyvauja prisijungiant dgRNR, tirta baltymo neturinčio šio domeno HEN1-LR²PM bei tik iš R¹ domeno sudaryto baltymo HEN1-R¹ sąveika su miR173/miR173* (3.14 pav. A; 2.2.14. skyrius). Nors HEN1-LR²PM baltymas be R¹ domeno,



3.14 pav. Pilno ilgio HEN1 ir jo R¹ domeno mutantinių baltymų sąveika su miR173/miR173* dupleksu. (A) Su 0,25 μM baltymo ar be jo (pirmas takelis iš kairės į dešinę) inkubuotos ³²P 5' gale žymėtos dgRNR (0,05 μM) judrumas tirtas natyviame PAAG. wt – pilno ilgio HEN1; LR²PM, R¹, R¹L, KKKK68-71SAAS, KK69-70AA, K22A – mutantiniai metiltransferazės baltymai, kurių domeninė organizacija pateikta 3.1 pav. B, C. (B) R¹ domeno lizinai pasirinkti pakeitimui į trumpesnę šoninę grandinę turinčias aminorūgštis HEN1-KKKK68-71SAAS, HEN1-KK69-70AA ir HEN1-K22A baltymuose. Mėlyna spalva pavaizduotas HEN1 R¹ domenas; mnkRNR/mnkRNR* duplekso grandinė, kurios 3' galas nukreiptas link metiltransferazinio domeno (nepavaizduotas), pažymėta geltonai, o kita grandinė – raudonai.

šulinėlyje. Norėdami išvengti agregacijos, sukonstravome plazmidę koduojančią baltymą HEN1-R¹L, sudarytą iš R¹ domeno ir šalia jo HEN1 domeninėje struktūroje (1.22 pav. A) išsidėstančio L domeno. Įvertinus išgryninto HEN1-R¹L baltymo gebėjimą prisijungti dgRNR (3.14 pav.), matome, kad ir šis, ilgesnis nei HEN1-R¹, baltymas yra linkęs agreguoti.

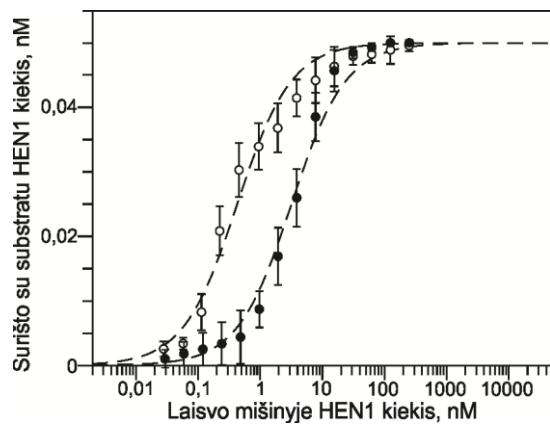
kaip ir pilno ilgio metiltransferazė modifikuoja abi substrato grandines *in vitro* (3.15 pav.), priešingai nei HEN1-wt, jis nesudaro natyviame gelyje stebimo komplekso su miR173/miR173*. Tomis pačiomis sąlygomis atlikus eksperimentą su HEN1-R¹ baltymu, laisvą dgRNR atitinkanti juostelė PAAG nestebima. Panašu, kad šis sutrumpintas HEN1 baltymas komplekse su substratu agreguoja ir užstringa natyvaus gelio



3.15 pav. miR173/miR173* duplekso kreipiančiosios miR173 (paveiklo viršuje) ir lydinčiosios miR173* (paveiklo apačioje) grandinių modifikacija pilno ilgio metiltransferaze ir jos R¹ domeno mutantiniais baltymais. 0,1 μM dgRNR su ³³P 5' gale pažymėta grandine (pažymėta pajuodintu šriftu) inkubuota su 100 μM AdoMet ir be (pirmas takelis iš kairės į dešinę) arba su 0,25 μM atitinkamu baltymu 37 °C temperatūroje 60 min. Tuomet mėginiai po IO₄⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakcijos, analizuoti denatūruojančiame PAAG. Vientisa rodyklė nurodo modifikuotą RNR duplekso grandinę, punktyrinė rodyklė – nemonifikuotą RNR duplekso grandinę. Baltymų sutrumpinimai paaiškinti 3.14 pav.

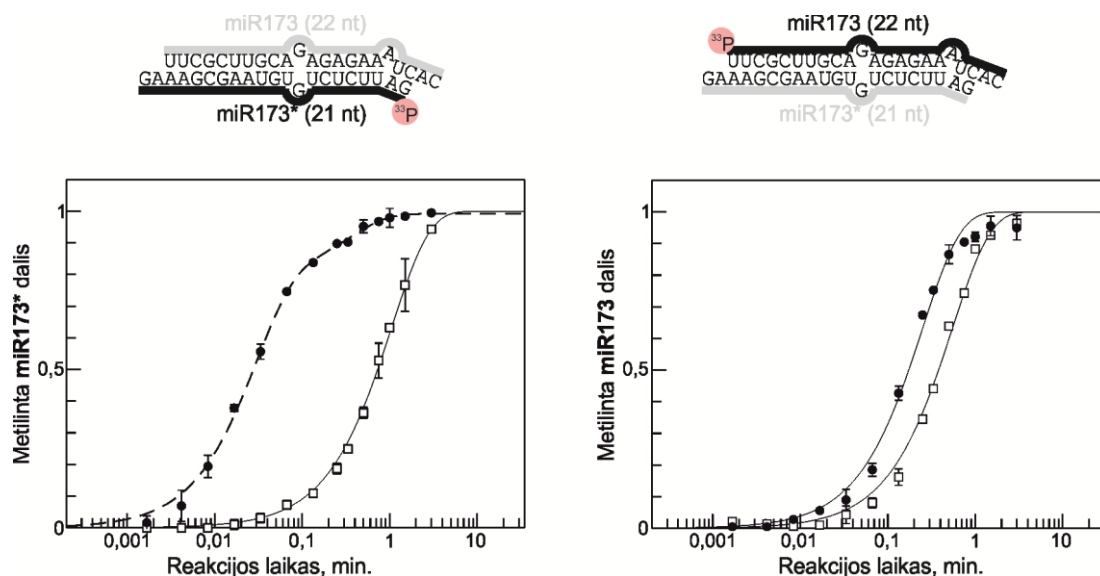
Norint patvirtinti pirmojo dgRNR surišančio domeno svarbą dgRNR prijungimui, nuspręsta ištirti miR173/miR173* surišimą pilno ilgio HEN1 baltymais, turinčiais pakeistas konkrečias R¹ domeno aminorūgštis, kurios gali būti svarbios sąveikai su substratu. Remiantis paskelbta HEN1 tretine struktūra (Huang et al., 2009), augalų HEN1 homologo konservatyvūs R¹ domeno keturi lizainai Lys68, Lys69, Lys70 ir Lys71 (3.14 pav. B) pasirinkti kaip potencialios, sąveikoje su dgRNR dalyvaujančios aminorūgštys (Č. Venclovas et G. Vilkaitis, neskelbta). Sukonstravus plazmides, koduojančias HEN1-KK69-70AA ir HEN1-KKKK68-71SAAS, kuriuose lizino aminorūgštys pakeistos į alaniną ar seriną, pastarieji baltymai buvo išgryninti. Abu mutantiniai baltymai, nors yra funkciškai aktyvūs (3.15 pav.) – modifikuoja abi miR173/miR173* duplekso grandines, nesudaro kompleksų su dgRNR (3.14 pav. A). Tokiomis pačiomis sąlygomis pakartojus eksperimentą su kontroliniu HEN1-K22A baltymu (3.14 pav. A), matyti, kad R¹ domeno Lys22 aminorūgštis, nesudarančios kontaktų su dgRNR (3.14 pav. B), pakeitimas hidrofobine aminorūgštimi, neturi žymios įtakos baltymo susirišimui su substratu. Taigi, R¹ domeno tik dviejų ar. (Lys69 ir Lys70) pakeitimas dramatiškai keičia metiltransferazės sąveikos su miR173/miR173* stiprumą, kas rodo, kad pirmas dgRNR surišantis domenas yra esminis HEN1 ir substrato komplekso, stebimo EMSA-PAAG, susidarymui. Gauti rezultatai pakankamai netikėti žinant, kad mažiausiai dar du fermento domenai prisideda prijungiant substratą: M domeno dalyvavimas įrodytas 3.1.4. skyriuje, o L domeno sąveiką su dgRNR modifikuojamos grandinės 5' galu nustatyta Huang ir kolegų (Huang et al., 2009). Norėdami įvertinti R¹ domeno indėlį substrato surišime, atlikus EMSA-PAAG (2.2.15. skyrius) eksperimentus apskaičiavome HEN1-R¹ baltymo komplekso su miR173/miR173* disociacijos konstantą, kuri yra $3,2 \pm 0,3$ nM. Šios konstantos reikšmė yra maždaug septyniais kartais mažesnė nei HEN1-wt (3.16 pav.; 3.1 lentelė). Sąlyginai nedidelis skirtumas tarp disociacijos konstantų reikšmių, ypač žinant, kad M domenai nesudaro gelyje matomų kompleksų su substratu, leidžia daryti prielaidą, kad pirmas

dgRNR surišantis domenas yra esminis stipriame substrato surišime, o kiti HEN1 domenai atlieka pagalbinę funkciją.



3.16 pav. Pilno ilgio HEN1 ir jo mutantinio baltymo HEN1-R¹, sudaryto tik iš R¹ domeno, sąveika su miR173/miR173* dupleksu. 50 pM ³²P 5' gale pažymėtas RNR dupleksas titruotas HEN1 (○) ar HEN1-R¹ (●) (baltymo koncentracija didinta kas du kartus nuo 0,03 nM iki 250 nM). Po mėginių analizės EMSA-PAAG, gautos surišto su substratu baltymo kiekio priklausomybės nuo laisvo baltymo kiekio aprašytos vieno taikinio surišimo lygtimi (ilgų punktyrų kreivės). Apskaičiuota dvinario HEN1-R¹•miR173/miR173* komplekso disociacijos konstanta yra $3,2 \pm 0,3$ nM (rezultatai pateikti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis, gauti iš keturių identiška atliktų eksperimentų).

R¹ domeno įtaka individualių substrato grandinių modifikacijai įvertinta ištyrus HEN1-LR²PM katalizuojamos metilgrupės pernešimo reakcijos greitį naudojant baltymo perteklių ($[E] > [S]$) (2.2.13. skyrius), esant 100 μ M kofaktoriaus AdoMet. Su **miR173**/miR173* dupleksu (toliau pajuodintu šriftu žymima radioaktyviu izotopu žymėta, stebima dgRNR grandinė) gauta kreipiančiosios grandinės metilinimo pastaruoju, R¹ domeno neturinčiu, baltymu dinamika aprašoma vienos eksponentės lygtimi (3.17 pav. dešinėje). Apskaičiuota metilgrupės pernešimo nuo kofaktoriaus ant **miR173** grandinės greičio konstanta yra panaši gautajai su pilno ilgio metiltransferaze (3.3 lentelė). Šie rezultatai rodo, kad pirmas dgRNR surišantis domenas neturi žymios įtakos metilgrupės pernešimo ant kreipiančiosios grandinės greičiui. Tuo tarpu, priešingai nei HEN1-wt atveju, miR173/**miR173*** duplekso metilinimas HEN1-LR²PM baltymu aprašomas vienos eksponentės lygtimi (3.17 pav. kairėje), apskaičiuojant vieną reakcijos greičio konstantą (3.3 lentelė). Remiantis 3.12 pav. pateiktu modeliu, manome, kad viena greičio



3.17 pav. Nemetilinto miR173/miR173* duplekso individualių grandinių modifikacija pilno ilgio HEN1 (●) ir jo R¹ domeno mutantiniu baltymu HEN1-LR²PM (□) esant baltymo pertekliui. 0,25 μM baltymo su 100 μM AdoMet sumaišyti su 0,1 μM dgRNR ir inkubuoti atitinkamą (nuo 0,01 s iki 180 s) laiką 37 °C temperatūroje. Tuomet po IO₄⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakcijos ir mėginių analizės denatūruojančiame PAAG, gautos substrato lydinčiosios grandinės miR173* (grafikas paveikslo kairėje) ir kreipiančiosios grandinės miR173 (grafikas paveikslo dešinėje) modifikuotos dalies priklausomybės nuo vykdyto metilinimo reakcijos laiko aprašytos vienos (vientisos kreivės) ar dviejų (ilgų punktyrų kreivė) eksponenčių lygtimis. Pilno ilgio metiltransferazės HEN1-wt ir jos sutrumpinto baltymo HEN1-LR²PM domeninės struktūros pateiktos 3.1 pav A, B.

3.3 lentelė. Nemetilinto miR173/miR173* duplekso individualių grandinių metilinimo pilno ilgio HEN1 ir jo mutantiniais baltymais parametrai.

	wt		LR ² PM		Δ38-45		RHK389,397,477AAA	
	<i>k</i> _{obs.} (min ⁻¹)	Amp (%)	<i>k</i> _{obs.} (min ⁻¹)	Amp (%)	<i>k</i> _{obs.} (min ⁻¹)	Amp (%)	<i>k</i> _{obs.} (min ⁻¹)	Amp (%)
miR173	4,5 ± 0,2	100	1,8 ± 0,1	100	5,4 ± 0,3	100	2,0 ± 0,1	100
miR173*	35 ± 3	79 ± 3	1,0 ± 0,1	100	26 ± 4	52 ± 5	34 ± 8	26 ± 3
	2,9 ± 1	21 ± 3			3,0 ± 1	48 ± 5		2,2 ± 0,2

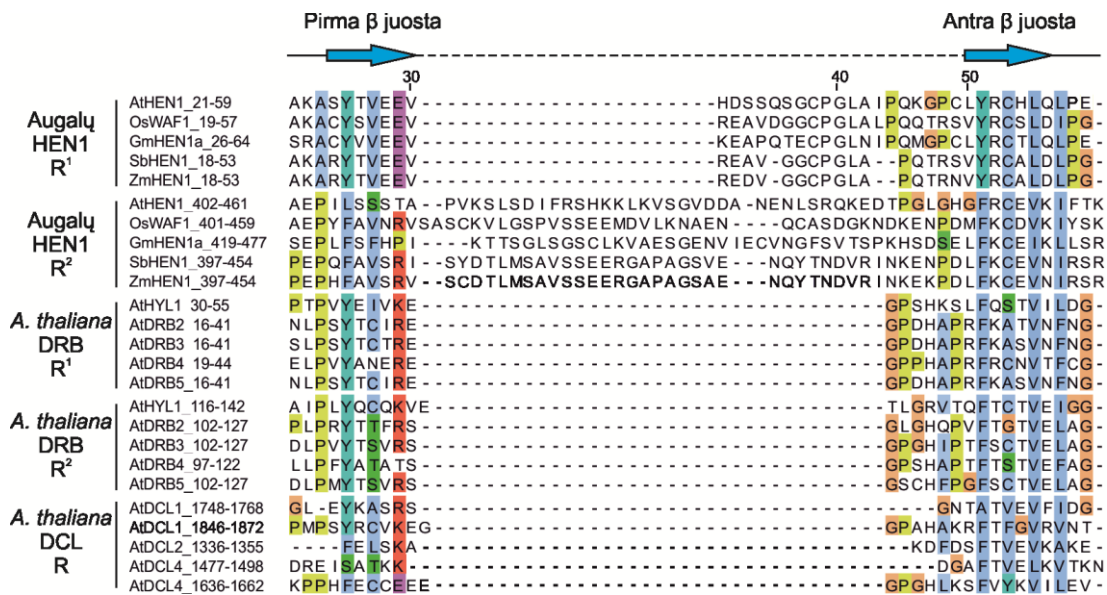
wt – pilno ilgio HEN1; LR²PM, Δ38-45, RHK389,397,477AAA - mutantiniai metiltransferazės baltymai HEN1-LR²PM, HEN1-Δ38-45, HEN1- RHK389,397,477AAA, kurių domeninė organizacija pateikta 3.1 pav. Visos metilinimo reakcijos vykdytos esant 100 μM AdoMet. Gauti duomenys su miR173/miR173* duplekso kreipiančiosiomis ir lydinčiosiomis grandinėmis aprašyti atitinkamai vienos ir dviejų eksponenčių lygtimis. Amp - greičio konstantų amplitudės, parodančios kokia kreivės dalis aprašoma pagal vieną ar kitą greičio konstantą, išreikštos procentais. Išsamesnis eksperimentinių sąlygų aprašymas pateikiamas 2.2.13. skyriuje.

konstanta gaunama dėl lydinčiosios grandinės greitos ir lėtos modifikacijos greičių supanašėjimo. Stebimos grandinės greitos modifikacijos greitis atspindi tiesioginį lydinčiosios grandinės metilinimo greitį. Vadinasi, su HEN1-LR²PM baltymu gauta **miR173*** grandinės metilinimo greičio konstanta yra maždaug

35 kartais mažesnė už apskaičiuotą pilno ilgio HEN1 atveju. Apibendrinant, gauti rezultatai rodo, kad pirmasis dgRNR surišantis domenas veikia HEN1 vykdomą reakciją, tačiau katalizei nėra kritinis.

3.2.2. R¹ domeno antros dgRNR surišančios srities vaidmuo HEN1 katalizėje

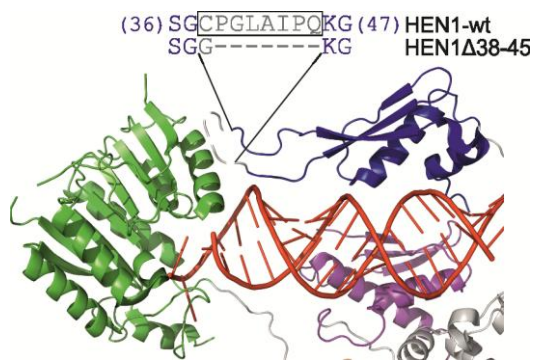
Dvigrandinę RNR surišantys baltymai turi R domenus, kurių antrinės struktūros elementai išsidėsto α - β - β - β - α tvarka. Paprastai šiuose domenuose yra aptinkamos trys dgRNR surišančios sritys, sudarytos iš konservatyvių aminorūgščių: pirmoji yra identifikuojama pirmoje α spiralėje, antroji – kilpa tarp pirmos ir antros β juostų, o trečioji – ilgesnės, antros α spiralės N gale (Masliah et al., 2013). Palyginus augalų mažųjų RNR biogenezeje dalyvaujančių baltymų ir augalų mnkRNR metiltransferazių R domenu aminorūgščių sekas, nustatyta, kad pastarieji baltymai išsiskiria kur kas ilgesne antra dgRNR surišančia sritimi R domenuose (3.18 pav.). Tipinių R domenu ši sritis apima šešių aminorūgščių liekanų kilpą (Masliah et al., 2013), o tiriamojo objekto *A. thaliana* HEN1 R domenu ji turi papildomas 15 ir daugiau ar. Iš vairenio metiltransferazės tretinės struktūros matyti (3.19 pav.), kad R¹ domeno kilpa išsidėsto šalia M domeno, todėl spėjama, kad jos Gly40 – Ile43 ar., konservatyvios HEN1 augalų homologuese, sudaro hidrofobines sąveikas su M domenu (Huang et al., 2009). Norėdami nustatyti *A. thaliana* HEN1 R¹ domeno pastarosios kilpos vaidmenį fermento katalizuojamoje reakcijoje, sukonstruota plazmidė, koduojanti mutantinį HEN1 baltymą HEN1- Δ 38-45 (3.1 pav. C), turintį 38-45 ar., apimančių šios kilpos „viršūnę“, pakaitą glicinu (3.19 pav.). Išgryninus baltymą patikrinome jo gebėjimą modifikuoti miR173/miR173* duplekso grandines (2.2.11. skyrius). 3.20 pav. matome, kad HEN1- Δ 38-45 pilnai modifikuoja duplekso kreipiančiąją ir lydinčiąją grandines, kas rodo, kad delecija nesutrikdo metilgrupių pernašos ant abiejų dgRNR 3' galinių nukleotidų. Norint tiksliau įvertinti tiriamos kilpos poveikį HEN1 metilinimo aktyvumui, tirta miR173/miR173* duplekso individualių grandinių modifikacijos HEN1- Δ 38-45 dinamika esant baltymo pertekliui



3.18 pav. Augalų metiltransferazių HEN1 ir kitų *A. thaliana* mnrRNR biogenezeje dalyvaujančių baltymų R domenų antrų dgRNR surišančių sričių, tarp pirmos ir antros β juostų, aminorūgščių sekų palyginimas (parengta M. Mickutės). Palyginys gautas naudojant PROMALS3D serverį, vizualizuotas Jalview programa ir paryškintas spalvomis priklausomai nuo konservatyvumo remiantis ClustalX spalvų schema. Sutrumpinimai: R¹ ir R² – pirmas ir antras dgRNR surišantis domenai; At – *Arabidopsis thaliana* (baltažiedis vairėnis); Os – *Oryza sativa* (sėjamasis ryžis); Gm – *Glycine max* (gauruotoji soja); Sb – *Sorghum bicolor* (dvispalvis sorgas); Zm – *Zea mays* (paprastasis kukurūzas); DRB – augalų dgRNR surišančių DRB baltymų šeimos atstovas (DRB1 dar vadinamas HYL1); DCL – III tipo ribonukleazės Dicer homologas augaluose (į Dicer panašus baltymas, angl. *Dicer-like protein*).

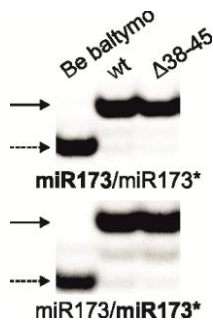
(2.1.13. skyrius). Apskaičiuoti kinetiniai parametrai pateikti 3.3 lentelėje. Remiantis 3.12 pav. pateiktu modeliu, manome, kad $k_{\text{cheml}}^{\text{miR173}^*}$ atitinka tiesioginį metilgrupės pernešimo ant miR173* grandinės greitį (detaliau 3.1.5. skyriuje). Naudojant baltymą, neturintį kilpos, nustatyta $k_{\text{cheml}}^{\text{miR173}^*}$ 52 procentų amplitudė, kas rodo, kad daugiau nei 1/2 visų atvejų HEN1- Δ 38-45, kaip ir pilno ilgio metiltransferazė, su miR173/miR173* dupleksu rišasi orientacija, kuri palanki lydinčiosios miR173* grandinės metilinimui. HEN1-wt ir HEN1- Δ 38-45 k_{obs} reikšmės yra panašios (3.3 lentelė), kas rodo, kad tiriamą kilpą neturi žymios įtakos metilgrupei pernešimo nuo kofaktoriaus ant abiejų substrato 3' galinių nukleotidų greičiams.

Įvertinus HEN1- Δ 38-45 afiniškumą nemetilintam ir pilnai metilintam miR173/miR173* dupleksui EMSA-PAAG eksperimentais (2.2.15. skyrius), nustatėme, kad pastarasis baltymas sąveikauja su substratais taip pat gerai kaip



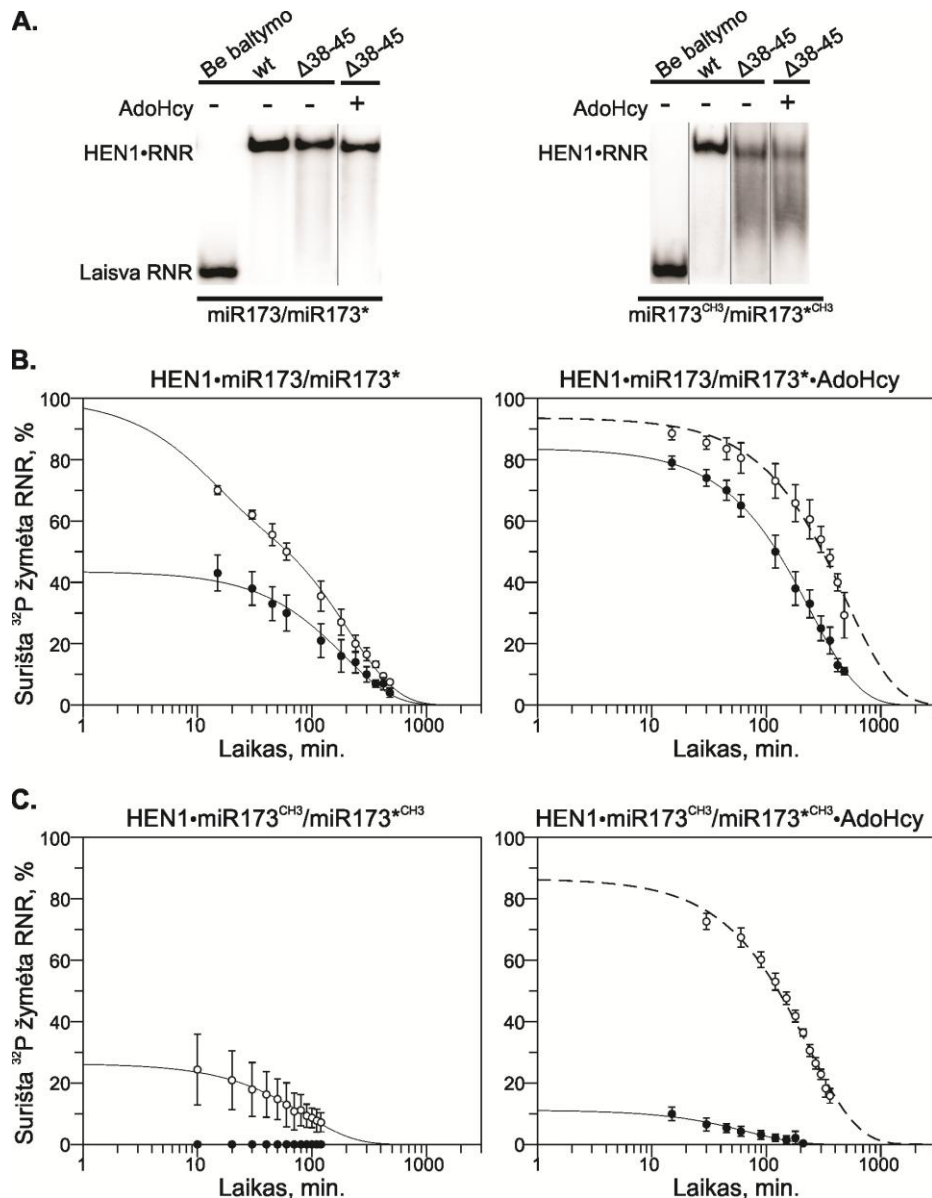
3.19 pav. HEN1•RNR tretinė struktūra su pažymėtomis punktyrais R¹ domeno septyniomis aminorūgštimis pakeistomis glicinu HEN1-Δ38-45 baltyme. Parengta pagal Huang et al., 2009 remiantis PDB ID 3HTX struktūra.

ir pilno ilgio metiltransferazė – disociacijos konstantos yra tos pačios eilės (3.4 lentelė). Vis dėlto, priešingai nei HEN1-wt atveju, HEN1-Δ38-45 kompleksų su dgRNR atitinkančios, EMSA-PAAG stebimos juostelės nėra diskretiškos, ypač su pilnai metilintu miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} duplesu (3.21 pav. A). Natyviame gelyje stebimos šliužės leidžia daryti prielaidą, kad, baltymui neturint tiriamos kilpos, dalis surištos dgRNR yra paleidžiama elektroforezės metu. Iškelus prielaidą, kad delecija sąlygoja kompleksų stabilumo sumažėjimą, nuspręsta atlikti detalesnius kompleksų disociacijos kinetikos tyrimus.



3.20 pav. miR173/miR173* dupleso kreipiančiosios miR173 (paveiklo viršuje) ir lydinčiosios miR173* (paveiklo apačioje) grandinių modifikacija pilno ilgio metiltransferaze HEN1-wt ir jos mutantiniu baltymu HEN1-Δ38-45. Eksperimentinės sąlygos identiškos pateiktoms 3.15 pav. Vientisa rodyklė nurodo modifikuotą, žymėtą RNR dupleso grandinę, punktyrinė rodyklė – nemodifikuotą, žymėtą RNR dupleso grandinę. wt – pilno ilgio metiltransferazė; Δ38-45 – mutantinis HEN1 baltymas HEN1-Δ38-45. Analizuotų baltymų domeninė organizacija pateikta 3.1 pav. A, C.

EMSA-PAAG metodu (2.2.16. skyrius) tirta dvinario HEN1-Δ38-45 komplekso su radioaktyviu izotopu žymėtu miR173/miR173* iširimo dinamika, kuri matuota skirtingą laiką inkubuojant suformuotus HEN1-Δ38-45•RNR kompleksus su pridėto nežymėto substrato pertekliumi. Kaip ir su pilno ilgio metiltransferaze, taip ir su pastaruoju baltymu gautus duomenis pavyko aprašyti tik dviejų eksponenčių iširimo lygtimi (3.21 pav. B kairėje)



3.21 pav. Pilno ilgio HEN1 ir jo mutantinio baltymo HEN1- $\Delta 38-45$ sąveika su nemetilinta ir pilnai metilinta dgRNR. (A) Nesant (-) ar esant (+) 100 μM AdoHcy su 0,25 μM baltymo ar be jo (pirmas takelis iš kairės į dešinę) inkubuoto ^{32}P žymėto nemetilinto $miR173/miR173^*$ ar pilnai metilinto $miR173^{CH3}/miR173^{*CH3}$ dupleksų (0,05 μM) judrumas tirtas natyviame PAAG. wt – pilno ilgio HEN1, $\Delta 38-45$ – mutantinis metiltransferazės baltymas HEN1- $\Delta 38-45$. Analizuotų baltymų domeninė organizacija pateikta 3.1 pav. A, C. (B), (C) Dvinarių HEN1 (○) ar HEN1- $\Delta 38-45$ (●) su nemetilintu (B) ir pilnai metilintu (C) $miR173/miR173^*$ kompleksų ir jų trinarių kompleksų su AdoHcy iširimo kinetika. Dvinariai RNR•HEN1 ir trinariai RNR•HEN1•AdoHcy kompleksai gauti inkubuojant 150 pM ^{32}P 5' gale pažymėtą RNR dupleksą ir 0,25 μM baltymo 30 min. 25 °C temperatūroje nesant ar esant 100 μM AdoHcy. Į juos pridėjus didesnę nei 10^4 -kartinį perteklių tokios pačios tik nežymėtos 2 μM dgRNR, kiekvienas mėginys inkubuotas 25 °C temperatūroje atitinkamą laiką ir užneštas į natyvų PAAG. Grafikuose pateiktos dvinarių ir trinarių kompleksų iširimo kreivės nubrėžtos aprašant PAAG gautas šių kompleksų surištos dgRNR priklausomybes nuo komplekso inkubavimo su nežymėtos dgRNR pertekliumi laiko atitinkamai dviejų (vientisos kreivės) ir vienos (ilgų punktūrų kreivės) eksponentės iširimo lygtimis.

apskaičiuojant dvi dvinarių kompleksų iširimo greičio konstantas (3.5 lentelė), leidžiančias spėti apie dviejų skirtingų konformacinių būsenų ir skirtingu stabilumu pasižyminčių HEN1-Δ38-45•miR173/miR173* kompleksų egzistavimą reakcijos mišinyje. Iš 3.5 lentelėje pateiktų duomenų, matyti, kad metiltransferazė, neturinti tiriamos kilpos, sudaro daugiau mažesniu stabilumu pasižyminčių kompleksų, kurie, priešingai nei HEN1-wt atveju, išyra momentaliai. Tikslios pastarųjų kompleksų iširimo greičio konstantos apskaičiuoti negalėjome, nes jie nėra stebimi pirmajame eksperimentiniame mėginyje, gautame po 10 min. HEN1-Δ38-45•miR173/miR173* kompleksų inkubavimo su konkurentinės dgRNR pertekliumi. Gauti rezultatai rodo, kad tiriamą kilpą yra HEN1•RNR kompleksų stabilumą lemiantis veiksnys.

3.4 lentelė. Pilno ilgio HEN1 ir jo mutantinių baltymų sąveika su RNR dupleksais.

RNR dupleksas	Dvinario HEN1•RNR K_d ($M \times 10^{-10}$)			Trinario HEN1•RNR•AdoHcy K_d ($M \times 10^{-10}$)		
	wt	Δ38-45	RHK	wt	Δ38-45	RHK
miR173/ miR173*	4,3 ± 0,5	7,9 ± 0,5	3020 ± 290	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,4	650 ± 120
miR173 ^{CH3} / miR173* ^{CH3}	72 ± 1	21 ± 1	Kompleksas neidentifikuotas	18 ± 2	10 ± 1	Kompleksas neidentifikuotas
siR173/ siR173*	5,0 ± 0,5		2930 ± 270	2,1 ± 0,4		680 ± 170

Trinario komplekso reakcijos mišiniai turėjo 100 μM AdoHcy. wt – pilno ilgio HEN1, Δ38-45, RHK – mutantiniai metiltransferazės baltymai HEN1-Δ38-45, HEN1-RHK389,397,477AAA. Lentelėje pateiktos vidurkinės K_d reikšmės ± standartinis nuokrypis, apskaičiuotos aprašant 3-9 identiška atliktais EMSA-PAAG eksperimentais gautas surišo su substratu baltymo kiekio priklausomybes nuo laisvo baltymo kiekio vieno taikinio surišimo lygtimi.

Tikslios HEN1-Δ38-45 dvinario komplekso su pilnai metilintu substratu iširimo greičio konstantos apskaičiuoti EMSA-PAAG metodu negalėjome, nes jau po eksperimentiškai trumpiausio laiko 10 min. HEN1-Δ38-45•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} komplekso inkubavimo su konkurentinės dgRNR pertekliumi, jis išyra (HEN1-Δ38-45•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} atitinkanti juostelė gelyje nematoma, žr. 3.21 pav. C kairėje). Gauti rezultatai rodo, kad pastarojo komplekso iširimo pusperiodis yra trumpesnis nei 10 min., todėl HEN1-Δ38-45•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} komplekso k_{off} reikšmė 3.5 lentelėje pateikta kaip didesnė nei 0,07 min⁻¹. Priešingai nei su nemetilintu substratu, su

pilnai metilintu substratu HEN1-Δ38-45 formuoja tik mažo stabilumo kompleksus. Manome, tai vyksta dėl dviejų stabilumą mažinančių veiksnių pasireiškimo: kontaktų tarp kilpos ir M domeno nesusidarymo ir metilgrupės atsiradimo aktyviajame centre sąlygojamo silpnesnio substrato 3' galo surišimo (3.1.4. skyrius).

3.1.4. skyriuje iškėlėme prielaidą, kad AdoHcy buvimas metiltransferazės aktyviajame centre sąlygoja visų HEN1•RNR kompleksų perėjimą į didesniu stabilumu pasižyminčią būseną. Todėl nusprendėme ištirti, ar kofaktoriaus analogas pasižymės tokiu pačiu stabilumą didinančiu efektu baltymui neturint kilpos. Apskaičiavus trinarių HEN1-Δ38-45•miR173/miR173*•AdoHcy ir HEN1-Δ38-45•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3}•AdoHcy kompleksų iširimo (3.21 pav. B, C dešinėje) kinetikos parametrus ir palyginus juos su dvinarių kompleksų (3.5 lentelė), matyti, kad į reakcijos mišinius įdėjus kofaktoriaus analogo didesniu stabilumu pasižyminčių kompleksų susidaro daugiau, tačiau, priešingai nei pilno ilgio metiltransferazės atveju, mažesnio stabilumo kompleksai taip pat egzistuoja. Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad AdoHcy buvimas M domene bei sąveikos, susidaranti tarp kilpos ir M domeno ar šoninių grupių, sinergistiškai didina HEN1 kompleksų su substratu stabilumą.

3.5 lentelė. HEN1 baltymų ir dgRNR kompleksų iširimo kinetikos parametrai.

RNR dupleksas	Dvinario HEN1•RNR k_{off} ($\text{min}^{-1} \times 10^{-3}$ amplitudė)			Trinario HEN1•RNR•AdoHcy k_{off} ($\text{min}^{-1} \times 10^{-3}$ amplitudė)		
	wt	Δ38-45	RHK	wt	Δ38-45	RHK
miR173/ miR173*	4,8 ± 0,2(67%) 87 ± 14(33%)	5,2 ± 0,4(44%) >> 70(56%) ^a	1,8 ± 0,2(44%) >> 70(56%) ^a	2,0 ± 0,1	4,1 ± 0,1(84%) >> 70(16%) ^a	2,1 ± 0,2(76%) >> 70(24%) ^a
miR173 ^{CH3} / miR173* ^{CH3}	11,6 ± 0,4(26%) >>70(74%) ^a	>> 70 ^a	Kompleksas neidentifikuotas	4,3 ± 0,2	14 ± 2(11%) >> 70(89%) ^a	Kompleksas neidentifikuotas
siR173/ siR173*	3,1 ± 0,2(75%) 45 ± 15(25%)		7,1 ± 0,3(53%) >> 70(47%) ^a	1,3 ± 0,1		2,1 ± 0,1(83%) >> 70(17%) ^a

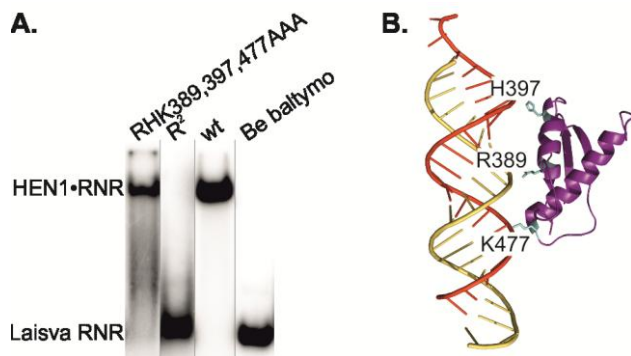
^a Didžioji komplekso dalis išyra iki 10 min.

Trinario komplekso reakcijos mišiniai turėjo 100 μM AdoHcy. Baltymų sutrumpinimai paaiškinti prie 3.4 lentelės. Dvinarių kompleksų iširimo dinamikos aprašytos dviejų eksponentių iširimo lygtimi, o trinarių kompleksų - vienos eksponentės iširimo lygtimi. Lentelėje pateiktos vidurkinės k_{off} reikšmės ± standartinis nuokrypis, gautos iš 3-10 identiška atliktų eksperimentų. Amplitudės rodo kokia kreivės dalis procentais aprašoma pagal vieną ar kitą kompleksų iširimo greičio konstantą.

3.2.3. HEN1 antro dgRNR surišančio domeno funkcinis tyrimas

Yra žinoma daug dvigrandinę mnkRNR surišančių baltymų, turinčių daugiau nei vieną dgRNR surišantį domeną. Šie R domenai gali būti atsakingi už įvairias funkcijas (detaliau 1.2.2. skyriuje) (Doyle et Jantsch, 2002). Pavyzdžiui, augalų miRNR susidarymo kelyje dalyvaujančio HYL1 baltymo R¹ domenas sąveikauja su dgRNR substratu, o R² – su mnkRNR biogenezėje dalyvaujančiais baltymais (Machida et al., 2011; Qin et al., 2010) bei, manoma, prisideda prie HYL1•RNR komplekso susidarymo (Hiraguri et al., 2005; Rasia et al., 2010; Yang et al., 2010). Ištirus sutrumpintus HEN1 baltymus bei pilno ilgio metiltransferazę su pakeistomis R¹ domeno HEN1•RNR sąveikoje dalyvaujančiomis ar. ir parodžius, kad metiltransferazės R¹ domenas yra svarbus stipriam dgRNR surišimui (3.2.1. skyrius), nusprendėme išsiaiškinti, ar antrasis dgRNR surišantis domenas dalyvauja prisijungiant substratą. Pažymėtina, kad tretinėje HEN1 struktūroje R² nuo substrato yra nutolęs 3 Å (Huang et al., 2009), todėl šio domeno sąveikos su mnkRNR/mnkRNR* dupleksu, sudarytu iš pilnai komplementarių grandinių, yra mažai tikėtinos. Remdamiesi šiais kristalografiniais duomenimis, Huang su kolegomis iškėlė hipotezę, kad R² domenas gali būti svarbus specifinius antrinės struktūros elementus (nekomplementarius nukleotidus; nesuporuotų nt iškyšas) turinčių dvigrandinių miRNR surišimui.

Ištirus sutrumpinto baltymo HEN1-R² (3.1 pav. B), sudaryto iš metiltransferazės antro dgRNR surišančio domeno, sąveiką su miR173/miR173*, nustatyta, kad, priešingai nei R¹ atveju, vienas R² domenas nesudaro EMSA-PAAG identifikuojamo komplekso su substratu (3.22 pav. A; 2.2.14. skyrius). Lyginant su laisvą dgRNR atitinkančia juoste, gelyje yra matomas užtempimas (dalis HEN1-R² baltymą turinčio mėginio dgRNR juda gelyje lėčiau nei laisvas miR173/miR173* dupleksas), kuris leidžia įtarti, kad iš R² domeno sudarytas baltymas gali silpnai sąveikauti su substratu, bet HEN1-R²•miR173/miR173* kompleksas yra nestabilus ir išyra elektroforezės metu. Norint tiksliau apibrėžti pastarojo domeno vaidmenį substrato surišime,



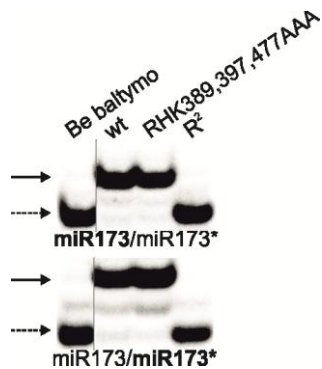
3.22 pav. Pilno ilgio HEN1 ir jo R² domeno mutantinių baltymų sąveika su miR173/miR173* dupleksu. (A) Su 0,25 μM baltymo ar be jo (pirmas takelis iš dešinės į kairę) inkubuotos ³²P 5' gale žymėtos dgRNR (0,05 μM) judrumas tirtas natyviame PAAG. wt – pilno ilgio HEN1; R², RHK389,397,477AAA – mutantiniai metiltransferazės baltymai HEN1-R², HEN1-RHK389,397,477AAA, kurių domeninė organizacija pateikta 3.1 pav. B, C. (B) R² domeno aminorūgštys pakeistos į trumpesnę šoninę grandinę turinčius alaninus HEN1-RHK389,397,477AAA baltyme. Violetine spalva pavaizduotas HEN1 R² domenas; mnkRNR/mnkRNR duplekso grandinė, kurios 2 nt iškyšą turintis 3' galas nukreiptas link metiltransferazinio domeno (nepavaizduotas), pažymėta geltonai, o kita grandinė – raudonai.

tęsti eksperimentai su pilno ilgio HEN1 baltymu HEN1-RHK389,397,477AAA (3.1 pav. C), kurio Arg389, His397 ir Lys477 pakeisti alanino aminorūgštimis. Tretinės HEN1 struktūros su substratu analizė parodė, kad pastarosios ar. yra išsidėsčiusios arčiausiai substrato ir jų teigiamą krūvį turinčios šoninės grupės yra nukreiptos į dgRNR (3.22 pav. B), todėl gali sudaryti nekovalentinius ryšius su mnkRNR/mnkRNR* dupleksu.

Išgrynintas HEN1-RHK389,397,477AAA baltymas buvo funkciškai aktyvus ir pilnai modifikavo abi

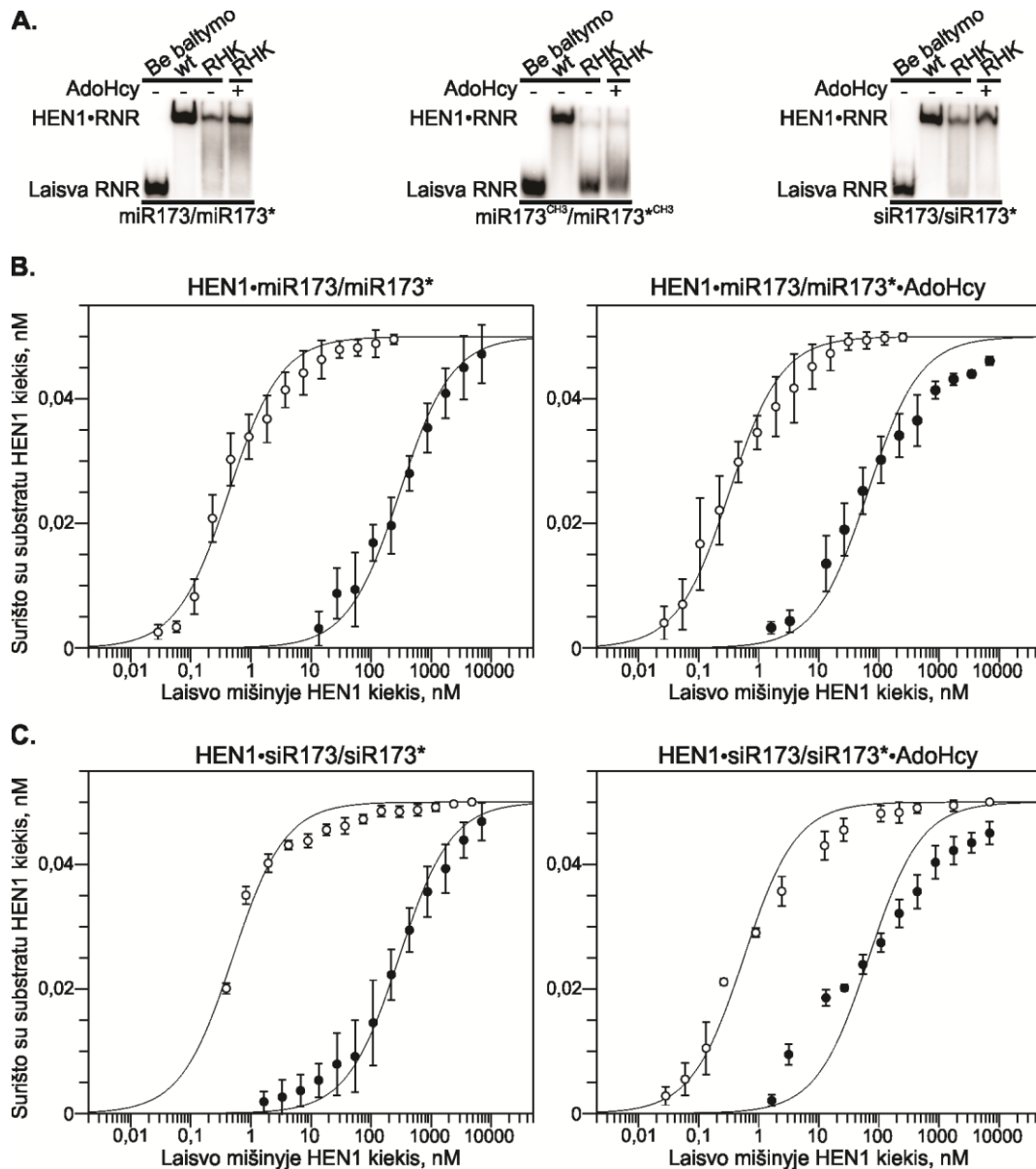
mnkRNR/mnkRNR* duplekso grandines (3.23 pav.; 2.2.11. skyrius). Norint detaliau ištirti trijų ar. pakeitimo įtaką metilinimui, įvertinti metilgrupių pernešimo ant miR173/miR173* duplekso kreipiančiosios ir lydinčiosios grandinių greičiai esant pastarojo baltymo pertekliui (2.2.13. skyrius). Iš 3.3 lentelėje pateiktų apskaičiuotų kinetinių parametrų matyti, kad individualių dgRNR grandinių modifikacijos HEN1-wt ir HEN1-RHK389,397,477AAA greičiai yra panašūs, tačiau remiantis prielaida, kad $k_{\text{chemI}}^{\text{miR173*}}$ atitinka tiesioginį metilgrupės pernešimo ant miR173* greitį (detaliau 3.1.5. skyriuje), mažesnė nei 50 % šios konstantos amplitudė rodo, kad tiriamas mutantinis baltymas, priešingai nei pilno ilgio metiltransferazė, dažniau miR173/miR173* dupleksą suriša kreipiančiosios miR173 grandinės metilinimui palankia

orientacija. Gauti rezultatai leidžia manyti, kad R² domeno Arg389, His397 ir Lys477 ar. sąveika su substratu gali turėti įtakos jo surišimo orientacijai.



3.23 pav. miR173/miR173* duplekso kreipiančiosios miR173 (paveiklo viršuje) ir lydinčiosios miR173* (paveiklo apačioje) grandinių modifikacija pilno ilgio metiltransferaze ir jos R² domeno mutantiniais baltymais. 0,1 μM dgRNR su ³³P 5' gale pažymėta grandine (pažymėta pajuodintu šriftu) inkubuota su 100 μM AdoMet ir be (pirmas takelis iš kairės į dešinę) arba su 0,25 μM atitinkamu baltymu 37 °C temperatūroje 60 min. Tuomet mėginiai po IO₄⁻ oksidacijos/β-eliminacijos reakcijos analizuoti denatūruojančiame PAAG. Vientisa rodyklė nurodo modifikuotą, žymėtą RNR duplekso grandinę, punktyrinė rodyklė – nmodifikuotą, žymėtą RNR duplekso grandinę. Baltymų sutrumpinimai paaiškinti 3.22 pav.

Norint įvertinti HEN1-RHK389,397,477AAA afiniškumą miR173/miR173* dupleksui, apskaičiuota šio baltymo komplekso su substratu disociacijos konstanta (2.2.15. skyrius). Iš 3.4 lentelėje pateiktų duomenų matome didelį skirtumą tarp HEN1-RHK389,397,477AAA ir HEN1-wt K_d reikšmių. Septyniais šimtais kartų besiskiriantis baltymų afiniškumas (3.24 pav. A kairėje, B kairėje; 3.4 lentelė) rodo, kad R² domeno Arg389, His397 ir Lys477 dalyvauja prijungiant dgRNR. Nors AdoHcy pridėjimas į reakcijos mišinį, padidina tiriamojo mutantinio baltymo afiniškumą dvigrandinei miR173 (3.24 pav. B dešinėje; 3.4 lentelė), tačiau jis vis tiek stipriai mažesnis už pilno ilgio metiltransferazės. Dar didesni skirtumai tarp pilno ilgio metiltransferazės ir HEN1-RHK389,397,477AAA afiniškumo substratui matomi sąveikaujant su miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} dupleksu. Priešingai nei HEN1-wt, pastarojo mutantinio baltymo kompleksų su pilnai metilintu substratu diskrečios juostelės EMSA-PAAG nestebimos (3.24 pav. A viduryje) net ir į reakcijos mišinį įdėjus AdoHcy.

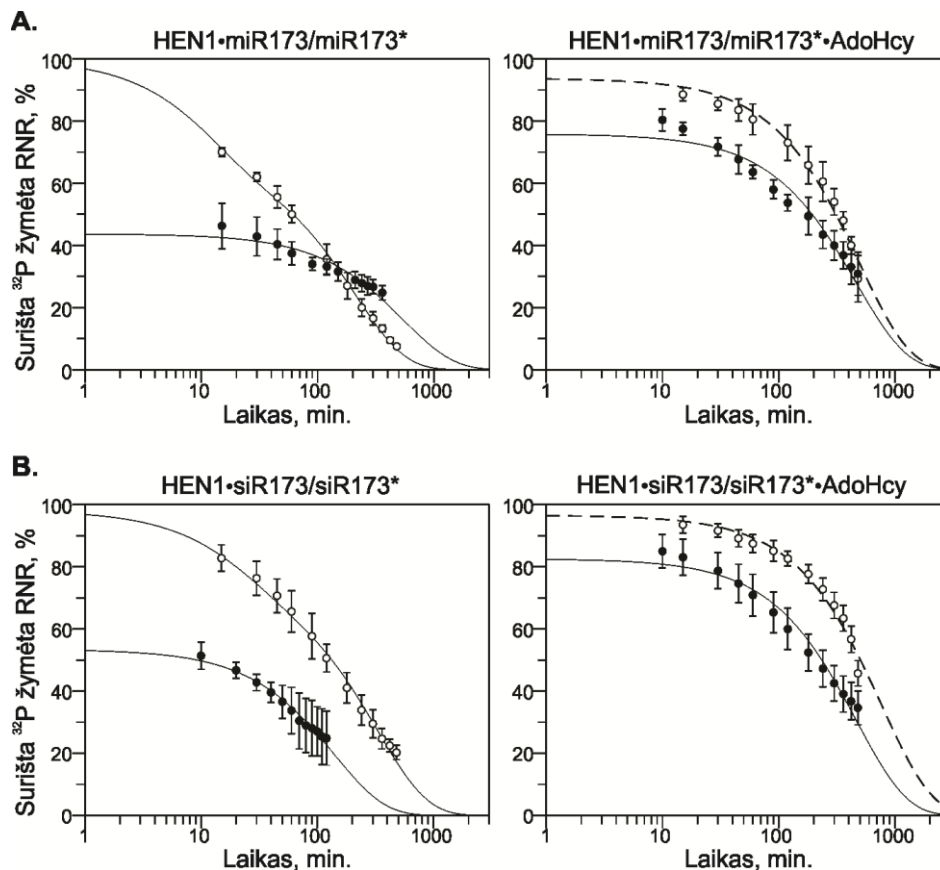


3.24 pav. Pilno ilgio HEN1 ir jo mutantinio baltymo HEN1-RHK389,397,477AAA sąveika su mnkRNR/mnkRNR* dupleksais. (A) Nesant (-) ar esant (+) 100 μ M AdoHcy su 0,25 μ M HEN1 ar 7 μ M HEN1-RHK389,397,477AAA arba be baltymo (pirmas takelis iš kairės į dešinę) inkubuoto 32 P 5' gale žymėto nemetilinto miR173/miR173*, pilnai metilinto miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} ir siR173/siR173* dupleksų (0,05 μ M) judrumas tirtas natyviame PAAG. wt – pilno ilgio HEN1, RHK – mutantinis metiltransferazės baltymas HEN1-RHK389,397,477AAA. (B), (C) Baltymų afiniškumo skirtingiems substratams palyginimas. Nesant (grafikas kairėje) ar esant (grafikas dešinėje) 100 μ M AdoHcy, 50 pM 32 P 5' gale pažymėtas miR173/miR173* (B) ar siR173/siR173* (C) dupleksas titruotas HEN1 (○) (0,03 nM, mažiausia baltymo koncentracija didinta kas du kartus iki 250 nM) ar HEN1-RHK389,397,477AAA (●) (1,7 nM ar 13,7 nM mažiausia baltymo koncentracija didinta kas du kartus iki 7000 nM). Po mėginių analizės EMSA-PAAG, gautos surišto su substratu baltymo kiekio priklausomybės nuo laisvo baltymo kiekio aprašytos vieno taikinio surišimo lygtimi (ilgų punktyrų kreivės).

Norint įvertinti metiltransferazės R² domeno Arg389, His397 ir Lys477 indėlių HEN1•RNR kompleksų stabilumui, tirta HEN1-RHK389,397,477AAA•miR173/miR173* kompleksų iširimo dinamika EMSA-PAAG metodu (3.25 pav. A kairėje; 2.2.16. skyrius). Apskaičiuotos dvi dvinarių kompleksų iširimo greičio konstantos (3.5 lentelė), leidžia daryti prielaidą, kad mutantinis baltymas, kaip ir pilno ilgio metiltransferazė, su miR173/miR173* dupleksu reakcijos mišinyje formuoja du skirtingo stabilumo kompleksus. Didesnę jų dalį sudaro mažiau stabilūs dvinariai kompleksai, kurių kiekis sumažėja į reakcijos mišinį pridėjus AdoHcy (3.5 lentelė), tačiau, priešingai nei HEN1-wt atveju, pilnas jų perėjimas į didesniu stabilumu pasižyminčius kompleksus nevyksta (3.25 pav. A dešinėje). Gauti rezultatai rodo, kad R² domeno Arg389, His397 ir Lys477 ar. sąveikos su substratu yra svarbios HEN1 kompleksų su dvigrandine miRNR stabilizavimui (detaliau 4.1. skyriuje).

Tokiomis pačiomis eksperimentinėmis sąlygomis kaip su miR173/miR173*, kuri turi nekomplementarią bazių porą bei nesuporuoto nt iškyšą (3.2 pav. A), atlikus HEN1-RHK389,397,477AAA sąveikos su siR173/siR173*, sudarytu iš pilnai komplementarių grandinių (3.2 pav. A), (3.24 pav. A dešinėje, C) ir susidariusių kompleksų iširimo dinamikos (3.25 pav. B) tyrimus, nustatyta, kad pastarųjų substratų surišimo stiprumas (3.4 lentelė) ir dvinarių, trinarių kompleksų stabilumas (3.5 lentelė) yra panašus. Gauti duomenys prieštarauja Huang ir kolegų iškeltai hipotezei, kad R² domenas yra svarbus miRNR/miRNR* dupleksų, bet ne dvigrandinių siRNR, surišimui.

Gauti rezultatai rodo, kad antras dgRNR surišantis domenas kartu su M domenu padeda R¹ stipriai surišant dviejų klasių miR173/miR173* ir siR173/siR173* dupleksus bei prisideda prie HEN1•RNR kompleksų, ypač trinario HEN1 komplekso su pilnai metilintu substratu ir AdoHcy, stabilizavimo.



3.25 pav. Dvinarių, HEN1 ar HEN1-RHK389,397,477AAA su miR173/miR173* (A) ir siR173/siR173* (B) dupleksais, kompleksų ir jų trinarių kompleksų su AdoHcy iširimo kinetika. Dvinariai RNR•HEN1 (grafikas kairėje) ir trinariai RNR•HEN1•AdoHcy (grafikas dešinėje) kompleksai gauti inkubuojant 150 pM ³²P 5' gale pažymėtą RNR dupleksą ir 0,25 μM HEN1 (○) ar 7 μM HEN1-RHK389,397,477AAA (●) 30 min. 25 °C temperatūroje nesant ar esant 100 μM AdoHcy. Į juos pridėjus didesnę nei 10⁴-kartinį perteklių tokios pačios tik nežymėtos 2 μM dgRNR, kiekvienas mėginys inkubuotas 25 °C temperatūroje atitinkamą laiką ir užneštas į natyvų PAAG. Grafikuose pateiktos dvinarių ir trinarių kompleksų iširimo kreivės nubrėžtos aprašant PAAG gautas šių kompleksų surištos dgRNR priklausomybes nuo komplekso inkubavimo su nežymėtos dgRNR pertekliumi laiko atitinkamai dviejų (vientisos kreivės) ir vienos (ilgų punktyrų kreivės) eksponentės iširimo lygtimis.

3.3. HEN1 sąveikos su augalų miRNR biogenezėje dalyvaujančiais HYL1, SERRATE ir DCL1 baltymais tyrimas

Ištyrus L, M (Huang et al., 2009; Vilkaitis et al., 2010 et šis darbas) bei R¹ ir R² domenų (šis darbas) vaidmenį HEN1 dgRNR surišime ir metiliniame, nežinoma liko vienintelio su substratu sąveikų nesudarančio (1.22 pav. B),

centrinėje metiltransferazės dalyje esančio (3.1 pav.) į peptidil-prolino *cis-trans* izomerazę (PPIazę) panašaus HEN1 P domeno funkcija. Kadangi jame PPIazėms būdingas aktyvusis centras nesusidaro (Tkaczuk et al., 2006), pastarasis domenas atlieka ne prolino *cis-trans* izomerizacijos, bet kitą funkciją. Žinant, kad augalų su imunosupresoriniu vaistu sąveikaujančių baltymų (FKBP; angl. *FK506-binding proteins*) į P domeną panašus PPIazinis domenas dalyvauja tarpbaltyminėje sąveikoje (Gollan et al., 2012; Huang et al., 2009; Kang et al., 2008; Vasudevan et al., 2015), iškėlėme hipotezę, jog P domenas yra svarbus HEN1 sąveikaujant su mnkRNR biogenezėje dalyvaujančiu baltymu. Nors HEN1 dalyvauja visų augaluose aptinkamų mnkRNR klasių biogenezės keliuose, tačiau norėdami nustatyti galimą metiltransferazės vykdomos reakcijos baltyminį partnerį analizavome geriausiai augaluose ištirtą miRNR susidarymo kelią.

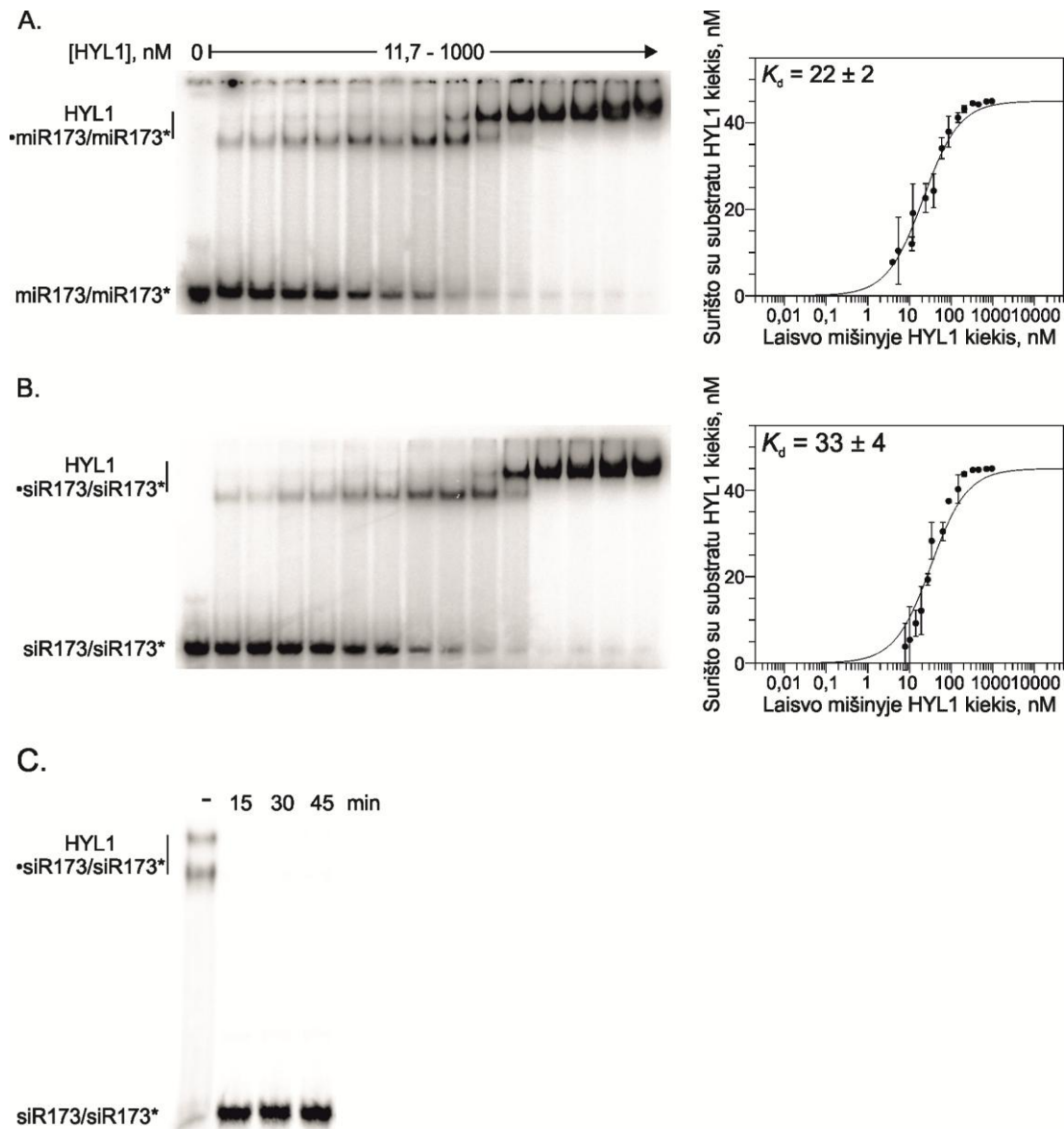
Arabidopsis thaliana miRNR biogenezę (1.1.3. skyrius) yra keliakopis procesas, kuriame svarbų vaidmenį atlieka trys mikroprocesoriaus komplekso komponentai: III tipo ribonukleazė DCL1, dgRNR surišantis baltymas HYL1 ir cinko pirštų motyvą turintis SERRATE (SE). Branduolyje šiam kompleksui iš pirminio miRNR transkripto pašalinus ilgus, viengrandinius ir nesuporuotus galus, susidaro plaukų segtuko tipo struktūros pre-miRNR. Tam pačiam kompleksui skeliant pastarojo miRNR pirmtako segtuko galvutės struktūrą, gaunami 20-22 nt ilgio miRNR/miRNR* dupleksai, kurių 3' galus modifikuoja mnkRNR metiltransferazė HEN1. Patekęs į citoplazmą miRNR/miRNR* dupleksas su Ago šeimos baltymu (dažniausiai su AGO1) sudaro miRNR indukuotą genų raiškos slopinimo kompleksą miRISC. Šiame efektoriniame komplekse viena iš grandinių, lydinčioji miRNR*, pašalinama ir degraduojama, o kita, kreipiančioji miRNR, lieka ir sąveikauja su iRNR taikiniai (Bologna et Voinnet, 2014).

Nustatyta, kad HYL1 kartu su SE užtikrina efektyvų ir teisingą, DCL1 vykdomą miRNR/miRNR* dupleksų iš jo pirmtakų iškirpimą (Dong et al., 2008; Kurihara et al., 2006; Wu et al., 2007). Nesant HYL1, pri-miRNR hidrolizuojama atsitiktinėse, neteisingose vietose (Kurihara et al., 2006). Taip

pat parodyta, kad HYL1 lemia, kuri iš dviejų miRNR/miRNR* dupleksą sudarančių grandinių liks AGO1 turinčiame komplekse miRISC (Eamens et al., 2009). Šie duomenys rodo, kad HYL1 dalyvauja miRNR biogenezės stadijose prieš miRNR/miRNR* duplekso metilinimą ir po jo, leido iškelti hipotezę, kad HEN1 per P ar/ir kitus domenus gali sąveikauti su šiuo dgRNR surišančiu baltymu.

3.3.1. HEN1 sąveikos su HYL1 tyrimas

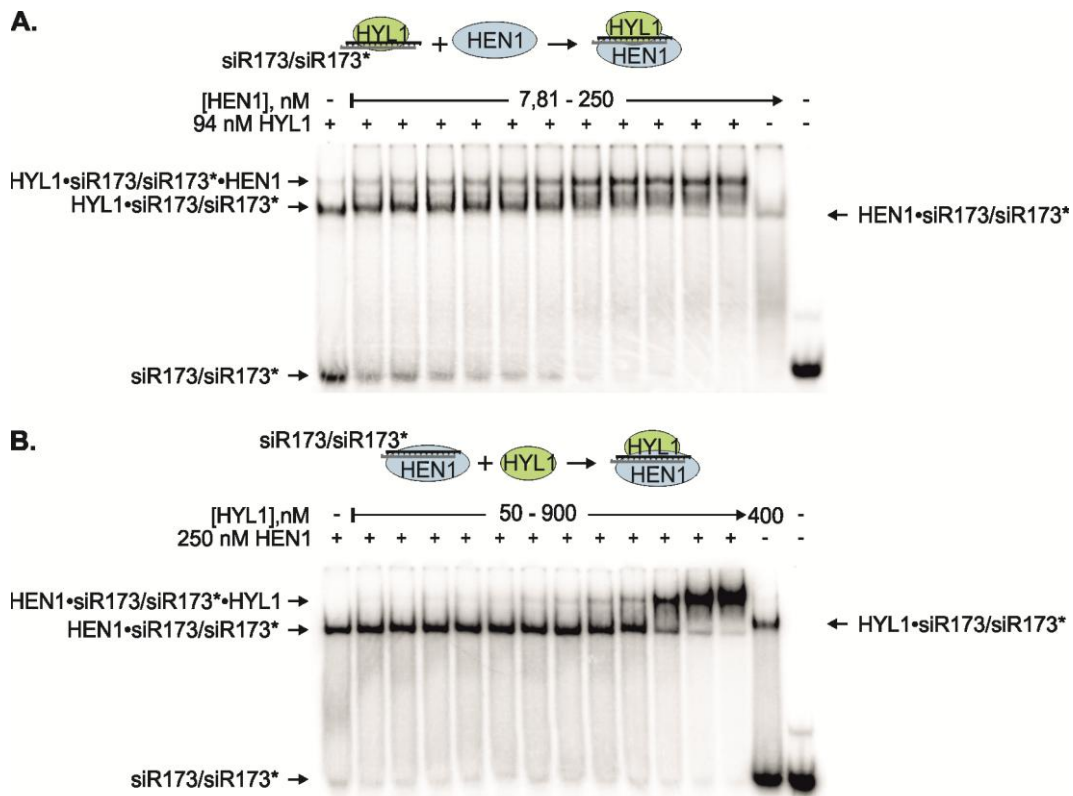
HEN1•HYL1 sąveikos nustatymas. HYL1 baltymas su šešių His ar. inkaru N gale buvo išgrynintas afininės chromatografijos metodu (2.2.4. skyrius). Yra žinoma, kad pastarasis baltymas sudaro kompleksus su miRNR/miRNR* dupleksais bei jų pirmtakais (Yang et al., 2010). Todėl norint įsitikinti, kad išgrynintas HYL1 yra funkcionalus EMSA-PAAG metodu (2.2.15. skyrius) tirta jo sąveika su augaluose aptinkamu miR173/miR173* (miRNR klasės substratas) bei nukleotidų seka panašiu, tačiau iš pilnai komplementarių grandinių sudarytu siR173/siR173* (siRNR klasės substratas) dupleksu (3.2 pav. A). Pastaruosius substratus tirtruojant HYL1, geliuose atsiranda lėčiau už laisvas dgRNR migruojančių kompleksų juostelės (3.26 pav. A, B kairėje). Didinant baltymo koncentraciją šias juosteles keičia lėčiau migruojančių dar didesnio molekulinio svorio kompleksų juostelės. Literatūroje skelbiami prieštaringi *in vitro* HYL1 sąveikos su substratu duomenys: Rasia su bendraautoriais nustatė monomerinio HYL1 sąveiką su dgRNR (Rasia et al., 2010), o Yang ir kolegų parodyta, kad dvi HYL1 molekulės suriša vieną dgRNR (Yang et al., 2010). Mūsų eksperimentiniai duomenys leidžia manyti, kad HYL1 sąveika su substratu priklauso nuo baltymo koncentracijos: jai didėjant baltymas dimerizuoja. Taigi, manome, kad 3.26 pav. A, B geliuose matomos monomerinio ir dimerinio HYL1 kompleksų su dgRNR atitinkančios dvi juostelės. Iš EMSA-PAAG gautų duomenų apskaičiavome dvinarių HYL1•miR173/miR173* ir HYL1•siR173/siR173* kompleksų disociacijos konstantas, kurios atitinkamai yra 22 ± 2 nM ir 33 ± 4 nM (rezultatai pateikti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis) (3.26 pav. A, B dešinėje). Panašus



3.26 pav. HYL1 sąveika su dviejų klasių (miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR*) mnkRNR/mnkRNR* dupleksais. (A), (B) 45 nM ^{32}P 5' gale pažymėto miR173/miR173* (A) ir siR173/siR173* (B) dupleksų titravimas didėjančia HYL1 koncentracija (nuo 11,7 nM iki 1000 nM) natyviame EMSA-PAAG. Nuliu (0) pažymėtas kontrolinio, baltymo neturinčio mėginio takelis. Po mėginių leidimo natyviame PAAG gautos surišto su substratu kiekio priklausomybės nuo laisvo baltymo kiekio aprašytos (vientisos kreivės) vieno taikinio surišimo lygtimi (grafikai dešinėje). Pateiktos vidurkinės K_D reikšmės \pm standartinis nuokrypis, apskaičiuotos iš kelių identiška atliktų EMSA-PAAG eksperimentų. (C) siR173/siR173*•HYL1 komplekso iširimo dinamikos tyrimas EMSA-PAAG. Dvinariai kompleksai gauti inkubuojant 45 nM ^{32}P 5' gale pažymėtą siR173/siR173* dupleksą ir 0,25 μM HYL1 20 min. 25 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Į juos pridėjus didesnę nei 50-kartinį perteklių tokios pačios tik nežymėtos siR173/siR173*, kiekvienas mėginys inkubuotas 25 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje atitinkamą, virš gelio paveikslu nurodytą laiką ir užneštas į natyvų PAAG. Pirmame iš kairės į dešinę takelyje stebimas dvinarių kompleksų, inkubuotų 45 min. 25 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, nepridėjus į juos nežymėtos dgRNR pertekliaus, migravimas.

HYL1 afiniškumas antrine struktūra besiskiriančioms RNR molekulėms leidžia daryti prielaidą, kad šis dgRNR surišantis baltymas neturi vidinių veiksnių, atsakingų už skirtingo stiprumo konkrečios klasės (miRNR ar siRNR) mnkRNR surišimą. Šie eksperimentai patvirtino, kad išgrynintas HYL1 yra funkciškai aktyvus. Norint nustatyti, ar monomerinio HYL1 kompleksai su dgRNR yra stabilūs, tirta HYL1 ir dgRNR kompleksų iširimo dinamika pridėjus konkurentinės RNR perteklių (2.2.16. skyrius). Iš 3.26 pav. C dalyje pateiktos natyvaus gelio nuotraukos matyti, kad HYL1•siR173/siR173* kompleksai išyra greičiau nei per 15 min. Gauti rezultatai rodo, kad bent jau *in vitro* HYL1 nesudaro stabilių kompleksų ne tik su pre-miRNR (Hiraguri et al., 2005), bet ir su subrendusiais mnkRNR/mnkRNR* dupleksais. Tačiau neatmetama prielaida, kad *in vivo* dvigrandinė mnkRNR molekulė išlieka HYL1 surišta kur kas ilgiau šiam baltymui esant komplekse su DCL1, AGO1 ar kitais augalų miRNR biogenezės baltymais.

HEN1 sąveika su dgRNR surišančiu baltymu tirta stebint mnkRNR/mnkRNR* duplekso elektroforetinio judrumo pokyčius PAAG (2.2.17. skyrius). HYL1•siR173/siR173* kompleksai suformuoti esant 94 nM HYL1 ir 45 nM dgRNR. Šios sąlygos pasirinktos remiantis 3.26 pav. B rezultatais norint gauti monomerinio HYL1 dvinarius kompleksus su substratu. Paveiksle 3.27 A matyti, kad pastaruosius kompleksus titruojant didėjančia HEN1 koncentracija, atsiranda mažesnio judrumo kompleksai, pasižymintys didesne nei HYL1•siR173/siR173* ar HEN1•siR173/siR173* kompleksų molekuline mase. Papildomos, mažo elektroforetinio judrumo juostelės, atitinkančios molekulinę masę didesnę nei HEN1•siR173/siR173* ar HYL1•siR173/siR173* kompleksų, atsiradimas gelyje matomas ir atlikus atvirkščią eksperimentą (3.27 pav. B), kai suformuotas HEN1•siR173/siR173* kompleksas titruojamas HYL1. Manome, kad ši juostelė atitinka trinarį kompleksą, susidariusį HEN1•siR173/siR173* sąveikaujant su HYL1. Vis dėlto šie rezultatai neleidžia atsakyti į klausimą, ar numanoma tarpbaltyminė sąveika tarp HEN1 ir HYL1 yra tiesioginė, nes du baltymai, nekontaktuodami






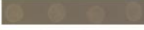


3.27 pav. HEN1 ir HYL1 sąveikos nustatymas EMSA-PAAG metodu. (A) Titruojant RNR•HYL1 kompleksą HEN1, natyviame gelyje stebimas didesnės molekulinės masės komplekso susidarymas. Įvairus HEN1 kiekis (nuo 7,81 nM iki 250 nM) sumaišytas su RNR•HYL1, susidariusiu 94 nM HYL1 sąveikaujant su 45 nM siR173/siR173* 10 min. 25 °C temperatūroje, ir po 20 min. inkubacijos 25 °C temperatūroje užnešti į PAAG. (B) Titruojant RNR•HEN1 kompleksą HYL1, natyviame gelyje taip pat stebimas didesnės molekulinės masės komplekso susidarymas. Įvairus HYL1 kiekis (nuo 50 nM iki 900 nM) sumaišytas su RNR•HEN1, susidariusiu 250 nM HEN1 sąveikaujant su 45 nM siR173/siR173* 10 min. 25 °C temperatūroje, ir po 20 min. inkubacijos 25 °C temperatūroje užnešti į PAAG. + ir – ženklais pažymėti mėginių, į kuriuos pridėta ar neprisidėta HEN1 ar HYL1 baltymų, takeliai.

tarpusavyje, gali tiesiog jungtis prie molekulinę platforma tarnaujančios dgRNR. Norint identifikuoti tarpbaltyminės sąveikos pobūdį bei patvirtinti, kad HEN1 sąveikauja su HYL1, nuspręsta atlikti papildomus *in vitro* ir *in vivo* eksperimentus.

Tyrimai mielių dviejų hibridų sistema „DupLex-A“ (2.2.19. skyrius) atlikti naudojant EGY48[pSH18-34] kamieną (Leu⁻ auksotrofinės EGY48 mielės, turinčios reporterinę pSH18-34 plazmidę su β-galaktozidazę koduojančia seka (2.3 pav. C)), kuris neauga ant leucino neturinčios terpės bei formuoja baltos spalvos kolonijas ant X-gal turinčios terpės. Norint iširti

dviejų, „grobis“ ir „masalas“, baltymų galimą tarpusavio sąveiką, pEG202-NLS ir pJG4-5 vektorių pagrindu sukonstruojamos pEG202-NLS-grobis ir pJG4-5-masalas plazmidės (2.3 pav. A, B), atitinkamai koduojančios „grobį“, sulietą su DNR surišančiu domenu (DSD), ir „masalą“, sulietą su transkripciją aktyvinančiu domenu (AD). Į EGY48[pSH18-34] mieles įvedus pastarąsias plazmides, jei jose sintetinami „masalas“ ir „grobis“ sąveikauja (2.2 pav. B), su jais sulieti DSD ir AD suartėja erdvėje ir sudaro kompleksą, kuris aktyvina *LEU2* ir *LacZ* genų transkripciją. Vykstant šių reporterinių genų raiškai mielės gali augti ant agarizuotos galaktozinės ir leucino neturinčios (Gal/-Leu) terpės bei, hidrolizuodamos terpėje esantį X-gal, nusidažo mėlynai.

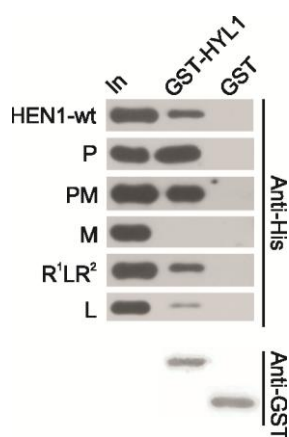
EGY48[pSH18-34] mielės formuoja mėlynas kolonijas ant Gal/-Leu terpės (3.28 pav.) įvedus pEG202-NLS-HEN1 ir pJG4-5-HYL1 plazmides, koduojančias atitinkamai chimerinius DSD-HEN1 (sudarytą iš DSD sulieto su HEN1 baltymu) ir AD-HYL1 (sudarytą iš AD sulieto su HYL1 baltymu) baltymus. Gautas mielių fenotipas patvirtina, kad HEN1 sąveikauja su HYL1. Kontroliniuose eksperimentuose, EGY48[pSH18-34] mielėse, sintetinančiose DSD-HEN1 baltymą ir tik AD bei AD-HYL1 baltymą ir tik DSD, neaktyvuojama reporterinių genų raiška, todėl mielės neauga ant Gal/-Leu terpės, o ant Gal/+Leu auga baltos mielių kolonijos.

pEG202-NLS	pJG4-5	Gal/+Leu	Gal/-Leu
HEN1	+ HYL1		
HEN1	+ -		
-	+ HYL1		

3.28 pav. HEN1 sąveika su HYL1 mielių dviejų hibridų sistemoje. Kairėje nurodyta, kokias plazmides, koduojančias įterptą nurodyto baltymo geno seką arba neturinčias įterpimo („-“), turi EGY48[pSH18-34] mielės. Gal/+Leu ar Gal/-Leu atitinkamai – agarizuota minimali galaktozinė terpė, turinti X-gal ir leuciną ar šios ar. neturinti (2.1.6. skyrius).

Norint HYL1 ir HEN1 sąveiką patvirtinti *in vitro* metodu, atlikti glutationo S-transferazės (GST) ištraukimo (2.2.21. skyrius) eksperimentai panaudojant su GST sulietą HYL1 (GST-HYL1) baltymą bei HEN1 baltymą, N gale turintį šešių His ar. inkarą. Pastarieji baltymai sumaišyti ir po

inkubacijos užnešti ant GST substratu, redukuotu glutationu padengto sorbento. Nuplovus prie sorbento neprisijungusius baltymus, gautame „GST-HYL1“ mėginyje likę baltymai identifikuoti atlikus imunoblotą (2.2.22. skyrius). Panaudojant anti-GST antikūnus pastarojo mėginio takelyje išryškinta GST-HYL1 juostelė (3.29 pav.) rodo, kad eksperimento metu GST-HYL1 baltymas nėra inaktyvuojamas ir sąveikauja su sorbentu. Panaudojant anti-His antikūnus išryškinta HEN1 baltymo juostelė. Šio baltymo detekcija „GST-HYL1“ mėginyje rodo, kad HEN1 sąveikavo su prie sorbento prisijungusiu GST-HYL1 baltymu ir dėl to metiltransferazė nebuvo išplauta sorbento praplovimo metu. Norint įsitikinti, kad HEN1 ir GST-HYL1 sąveika yra specifinė, tokiomis pačiomis sąlygomis tirta, ar HEN1 sąveikauja su GST arba ištraukimo eksperimentuose naudojamu sorbentu. Atlikus imunoblotą panaudojant anti-His ir anti-GST antikūnus, „GST“ mėginio takelyje išryškinta tik glutationo S-transferazės juostelė (3.29 pav.). Vadinasi, analizuotame mėginyje šešių His inkarų turinčio HEN1 nėra. Gauti rezultatai rodo, kad GST prisijungė prie redukuotu glutationu padengto sorbento, o metiltransferazei nesąveikaujant su GST ar sorbentu ji pašalinta sorbento praplovimo metu. Nustaćius, kad HEN1 ir GST-HYL1 sąveika yra specifinė, tirta, ar tarpbaltyminės sąveikos stiprumas keičiasi esant pastarųjų baltymų substratui.



3.29 pav. HYL1 sąveikos su HEN1 ir jo domenais tyrimas GST ištraukimo metodu ir imunoblotu. Eksperimentai atlikti naudojant 68 pmol GST ar GST-HYL1 (su GST sulietas HYL1) ir 136 pmol pilno ilgio HEN1 ar iš jo domenų sudarytus baltymus N gale turinčius dvidešimties aminorūgščių seką su šešiomis His liekanomis. In – 1/5 His-HEN1-wt baltymo kiekio, naudoto GST ištraukimo eksperimento mėginiuose; GST-HYL1 ir GST – atitinkamai su GST-HYL1 ar GST sąveikavusio HEN1 ar jo sutrumpinto baltymo dalis. Eksperimentuose naudotų HYL1 ir HEN1 baltymų domeninės organizacijos pateiktos 1.16 pav. A, 3.1 pav. A. Baltymai turintys dvidešimties aminorūgščių polipeptidą su šešiomis histidino liekanomis detektuoti anti-His antikūnais chemiliuminescencinės reakcijos metu, o GST-HYL1 ir GST buvimas analizuojamuose mėginiuose patvirtintas anti-GST antikūnais spalvinės reakcijos metu.

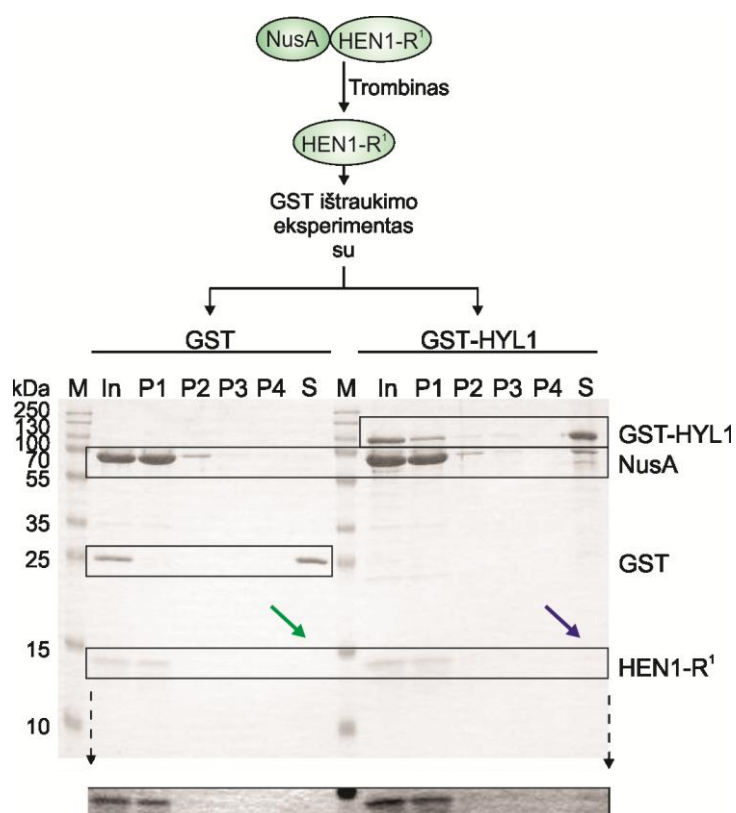
Tokiomis pačiomis sąlygomis atlikus eksperimentą kartu su GST-HYL1 ir HEN1 baltymais inkubuojant ir miR173/miR173* dupleksą, mėginio imunoblotu su anti-His antikūnais išryškintos juostelės intensyvumas nesiskiria nuo gauto į mėginį nepridėjus šios dgRNR. Tai leidžia daryti prielaidą, kad, esant ar nesant dvigrandinės mnkRNR, panašus HEN1 baltymo kiekis sudaro kompleksą su HYL1. Gauti rezultatai rodo, kad specifinei HEN1 ir HYL1 sąveikai mnkRNR dupleksas nėra būtinas.

HEN1 ir HYL1 tarpbaltyminėje sąveikoje dalyvaujantys metiltransferazės domenai. Nustatę, kad HEN1 tiesiogiai sąveikauja su HYL1 baltymu, nusprendėme patikrinti hipotezę, kad vienintelis sąveikų su dgRNR nesudarantis metiltransferazės P domenas dalyvauja tarpbaltyminėje sąveikoje.

Šis HEN1 domenas yra išsidėstęs šalia C galinio, metiltransferazinio domeno (3.1 pav. A), atsakingo už katalizinę funkciją. Norint iširti, kuri P ir M domenus apimanti HEN1 C galinės dalies sritis svarbi HEN1•HYL1 komplekso susidarymui, atlikti GST ištraukimo eksperimentai su trimis HEN1 sutrumpintais baltymais. Nustatyta, kad HEN1-PM bei HEN1-P baltymai, atitinkamai sudaryti iš P, M domenų bei tik iš P domeno (3.1 pav. B), sąveikauja su HYL1, tuo tarpu baltymas, sudarytas tik iš metiltransferazinio domeno HEN1-M (3.1 pav. B), nedalyvauja sąveikoje su šiuo dgRNR surišančiu baltymu (3.29 pav.). Gauti rezultatai leidžia daryti išvadą, kad HEN1 baltymo C galinėje dalyje būtent P domenas yra atsakingas už tarpbaltyminę sąveiką su HYL1.

Norint patikrinti, ar HEN1 N galo dgRNR surišantis R^2 ir/ar R^1 bei tarp šių dgRNR surišančių domenų išsidėstęs L domenas dalyvauja HEN1 sąveikaujant su HYL1, atliktas GST ištraukimo eksperimentas su HEN1- R^1LR^2 . Šis baltymas, sudarytas iš R^1 , L ir R^2 domenų (3.1 pav. B), sudaro kompleksą su HYL1 baltymu (3.29 pav.). Norint tiksliau nustatyti, kurie iš domenų yra būtini baltyminio komplekso susidarymui, buvo išgryninti baltymai: HEN1- R^1 , sudarytas tik iš R^1 domeno, HEN1-L, turintis L domeną, bei HEN1- R^2 , apimantis antrąjį dgRNR surišantį domeną (3.1 pav. B).

Detektuota tik iš L domeno sudaryto baltymo HEN1-L sąveikos su HYL1 juostelė yra labai mažo intensyvumo lyginant su pilno ilgio metiltransferazės ar HEN1-R¹LR² baltymo (3.29 pav.). Šie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad L domenas nėra atsakingas už stiprią HEN1 N galinės dalies sąveiką su HYL1. Atlikus GST ištraukimo kontrolinį eksperimentą, nustatyta, kad HEN1-R¹ sąveikauja su sorbentu. Vadinasi, HEN1-R¹ baltymo GST ištraukimo eksperimentams naudoti negalėjome. Padarę prielaidą, kad pastarojo baltymo agregacija sąlygoja jo sąveiką su sorbentu, išgryninome sutrumpintą HEN1 baltymą (3.30 pav.) HEN1-R¹ sulietą su transkripcijoje dalyvaujančiu *E. coli*



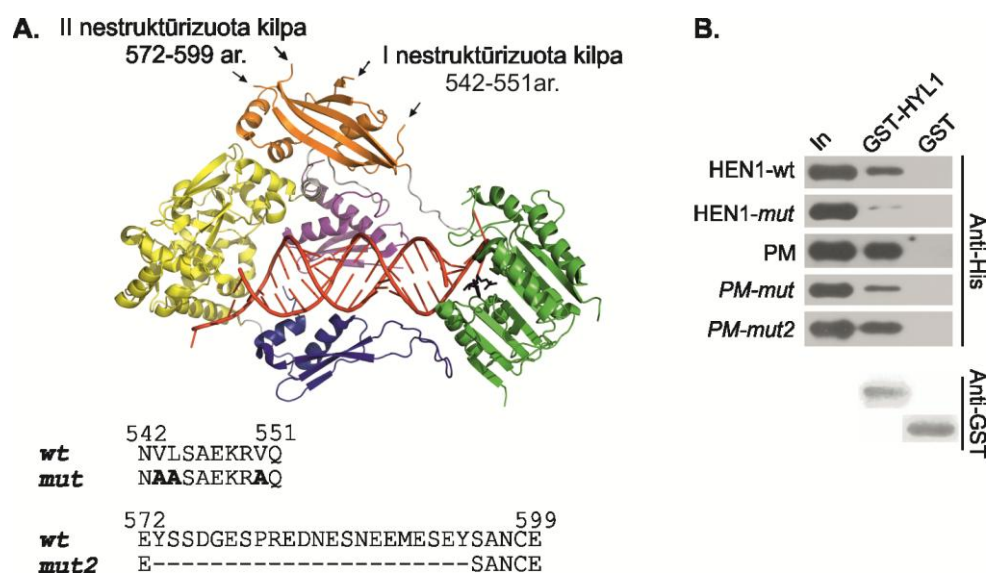
3.30 pav. HYL1 sąveikos su HEN1 sutrumpintu baltymu HEN1-R¹, sudarytu tik iš metiltransferazės pirmojo dgRNR surišančio domeno, tyrimas GST ištraukimo metodu. Po su NusA sulieto NusA-HEN1-R¹ baltymo paveikimo trombino proteaze gautas NusA neturintis baltymas HEN1-R¹ panaudotas sąveikos su GST ir GST-HYL1 tyrimui. M – baltymų molekulinės masės žymenys; In (angl. *input*) – 1/5 pradinio baltymų kiekio tarpbaltyminės sąveikos mėginiuose; P1 – po dviejų val. baltymų mišinio inkubacijos su sorbentu supernatante likusių baltymų; P2 –P4 – kiekvieno iš trijų sorbento plovimų supernatantuose likusių baltymų; S – prie sorbento prisijungusių HEN1-R¹ sąveikos su GST ir GST-HYL1 mėginio baltymų. Stačiakampiais apibrėžtos atitinkamo baltymo juostelės. Žalia, mėlyna rodyklės pažymi vietą gelyje, kur turėtume matyti HEN1-R¹ juostelę, jei šis baltymas sąveikautų su atitinkamai GST ir GST-HYL1 baltymais. Ši gelio dalis išdidinta ir pateikta po PAAG nuotrauka.

baltymu NusA, kuris dažnai padidina su juo sulieto baltymo tirpumą (Davis et al., 1999). Paveikus NusA-HEN1-R¹ trombino proteaze (2.2.8. skyrius) nuo jo nukirptas NusA. Tuomet GST ištraukimo metodu tirta gauto baltymo sąveika su GST-HYL1 ir GST baltymais. 3.30 pav. NDS-PAAG “S” takeliuose nematydami HEN1-R¹ baltymo juostelių (3.30 pav. žalia ir mėlyna rodyklėmis pažymėtos vietos) galime teigti, jog šis sutrumpintas HEN1 baltymas nesąveikauja nei su GST ar sorbentu, nei su GST-HYL1. Tuo tarpu GST ištraukimo eksperimentų metu tiek HEN1-R², tiek NusA-HEN1-R² po NusA nuskėlimo trombino proteaze sąveikavo su sorbentu. Tačiau parodžius, kad R¹ nedalyvauja tarpbaltyminėje sąveikoje, o L domeno indėlis nežymus, galima daryti išvadą, kad didžiausią vaidmenį HEN1-R¹LR²•HYL1 sąveikoje vaidina HEN1 antrasis dgRNR surišantis domenas R².

Gauti duomenys rodo, kad HEN1•HYL1 komplekso susidaryme dalyvauja metiltransferazės L, R² ir P domenai.

HEN1 P domeno aminorūgštys svarbios HEN1•HYL1 komplekso susidarymui. Kadangi GST-HYL1 suriša didesnę kiekį HEN1-P nei HEN1-R¹LR² baltymo (3.29 pav., „GST-HYL1“ takelyje HEN1-P baltymo juostelės intensyvumas yra žymiai stipresnis nei HEN1-R¹LR²), iškėlėme hipotezę, kad P domeno aminorūgštys gali būti kritiškai svarbios HEN1 ir HYL1 komplekso susidarymui. Norėdami tiksliau nustatyti P domeno sritis svarbias tarpbaltyminėje sąveikoje, išanalizavome HEN1 erdvinę struktūrą. 3.31 pav. A matyti, kad P domenas turi dvi nestruktūrizuotas kilpas, apimančias 542-551 ir 572-599 aminorūgštis. Iš literatūrinių šaltinių yra žinoma, kad neretai nestruktūrizuotos baltymų sritys dalyvauja tarpbaltyminės sąveikos susidaryme, ko pasekoje ir pačios tampa struktūrizuotomis (Fong et al., 2009; Wright et Dyson, 2009). Norint išsiaiškinti, ar šios dvi P domeno kilpos yra svarbios HEN1 ir HYL1 sąveikai, remiantis dr. Č. Venclovo rekomendacijomis, pET-HEN1-PM vektoriaus pagrindu sukonstruotos plazmidės, koduojančios du baltymus (3.31 pav. A apačioje): HEN1-PM-mut, turintis Val543, Leu544, Val550 pakeistus alaniniais (trumpesnioji kilpa jungia pakankamai nutolusias struktūrinės sritis, todėl jos pašalinimas ar

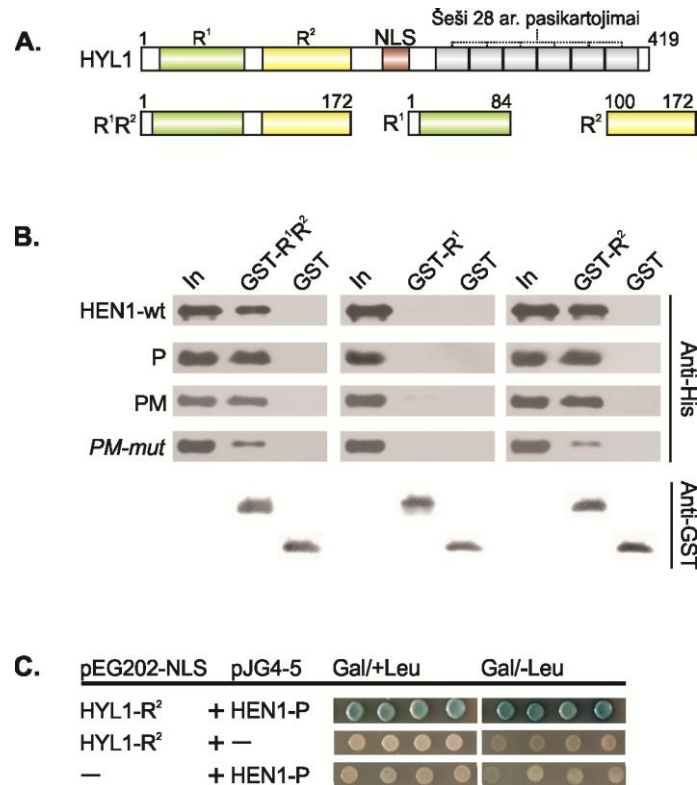
sutrumpinimas gali reikšmingai pakeisti visą P domeno struktūrą), bei HEN1-*PM-mut2*, turintis 573-594 ar. deleciją (ilgesnioji kilpa jungia viena šalia kitos išsidėsčiusias β -klostes, todėl galima tikėtis, kad šios kilpos sutrumpinimas tik nežymiai pakeis P domeno struktūrą). Išgryninus baltymus, atlikti GST ištraukimo ir imunobloto eksperimentai, iš kurių paaiškėjo, kad 573-594 ar. pašalinimas neturi įtakos imunoblotu stebimai HEN1 ir HYL1 sąveikai, tuo tarpu hidrofobinių valino 543 ir valino 550 bei leucino 544 aminorūgščių pakeitimas į trumpesnę šoninę grandinę turinčias alanino aminorūgštis pastebimai susilpnina tarpbaltyminę sąveiką (3.31 pav. B). Be to, reikšmingas tarpbaltyminės HEN1•HYL1 sąveikos susilpnėjimas stebimas tomis pačiomis sąlygomis atlikus eksperimentus ir su pilno ilgio HEN1 baltymu turinčiu šių trijų aminorūgščių mutacijas HEN1-*mut* (3.31 pav. B). Gauti rezultatai patvirtina, kad P domenas atlieka pagrindinį vaidmenį susidarant HEN1•HYL1 kompleksui.



3.31 pav. HEN1 P domeno aminorūgštys, atsakingos už baltymo sąveiką su HYL1. (A) HEN1•RNR tretinė struktūra su rodyklėmis pažymėtomis nestruktūrizuotomis P domeno kilpomis. Parengta pagal Huang et al., 2009 remiantis PDB ID 3HTX struktūra. Apačioje pateiktos šių kilpų aminorūgščių sekų palyginiai pilno ilgio HEN1 bei jo mutantiniuose baltymuose HEN1-*mut*, HEN1-PM-*mut* ir HEN1-PM-*mut2*. (B) Pilno ilgio HEN1 ir jo mutantinių baltymų HEN1-*mut*, HEN1-PM, HEN1-PM-*mut*, HEN1-PM-*mut2* sąveikos su HYL1 tyrimas GST ištraukimo ir imunoblotu metodu. Paveikslo aprašymas analogiškas pateiktam 3.29 pav. HEN1-*mut* ir HEN1-PM-*mut* – atitinkamai pilno ilgio HEN1 ir HEN1-PM baltymai, kurių V543, L544, V550 pakeistos alaniniais; HEN1-PM-*mut2* - HEN1-PM baltymas, turintis 573-594 ar. deleciją.

HYL1 baltymo R¹ ir R² domenų vaidmuo HEN1•HYL1 komplekso susidaryme. HYL1 baltymas turi du R domenus N gale, nežinomos funkcijos šešis 28 ar. pasikartojimus C gale bei tarp jų išsidėsčiusį branduolio lokalizacijos signalą (3.32 pav. A) (Ren et Yu, 2012; Yang et al., 2010). Norint nustatyti, kuri HYL1 dalis sąveikauja su HEN1 baltymu, pGEX-HYL1 vektoriaus pagrindu sukonstruotos plazmidės, koduojančios tris sutrumpintus baltymus: GST-HYL1-R¹R², sudarytą iš abiejų dgRNR surišančių domenų, GST-HYL1-R¹, sudarytą iš pirmojo dgRNR surišančio domeno, bei GST-HYL1-R², sudarytą iš R² domeno (šių baltymų be GST domeninės struktūros parodytos 3.32 pav. A). Išgryninus baltymus, EMSA-PAAG metodu (2.2.14. skyrius) patikrintas jų gebėjimas surišti RNR substratą. Iš 3.33 pav. pateiktos natyvaus gelio nuotraukos matyti, kad, priešingai nei HYL1 R², R¹ domenas suriša didžiąją dalį substrato. GST-HYL1-R¹ ir GST-HYL1-R¹R², GST-HYL1 takeliuose laisvo mnkRNR/mnkRNR* duplekso juostelių intensyvumas panašus, kas leidžia daryti prielaidą, jog pastarųjų baltymų afiniškumas siR173/siR173* dupleksui yra artimas. Gauti duomenys sutampa su Rasia ir bendraautorių, kurie rodo, kad HYL1 R¹ domenas yra esminis dgRNR surišime, o R² domenas gali atlikti pagalbinę funkciją (Rasia et al., 2010). Įsitikinus, kad išgryninti GST-HYL1-R¹R², GST-HYL1-R¹ ir GST-HYL1-R² baltymai yra funkcionalūs, atlikti GST ištraukimo eksperimentai. Paaiškėjo, kad GST-HYL1-R¹ nesąveikauja su metiltransferaze, tuo tarpu tik iš R² sudarytas GST-HYL1-R² ar abu R domenus turintis GST-HYL1-R¹R² baltymas jungiasi tiek su pilno ilgio metiltransferaze, tiek su HEN1-P baltymu, sudarytu tik iš P domeno (3.32 pav. B). Šie rezultatai rodo, kad HYL1 sąveika su metiltransferazės P domenu realizuojama per antrąjį dgRNR surišantį domeną. GST ištraukimo metodu ištyrus HEN1-PM ir HEN1-PM-mut, turinčio alaniniais pakeistas Val543, Leu544 ir Val550 aminorūgštis, sąveiką su GST-HYL1-R² baltymu (3.32 pav. B), pamatėme, kad šių ar. mutacijos stipriai susilpnina sutrumpinto HEN1 baltymo sąveiką su HYL1 antru dgRNR surišančiu domenu. Gautas rezultatas rodo, kad HEN1 P domeno hidrofobinės ar. Val543, Leu544 ir Val550 yra svarbios sudarant kontaktus su HYL1 R²

domenu. Pažymėtina, jog anksčiau parodyta, kad HYL1 R² domenas dalyvauja ir baltymo sąveikoje su augalų miRNR biogenezės baltymais DCL1 bei SERRATE (Machida et al., 2011; Qin et al., 2010).

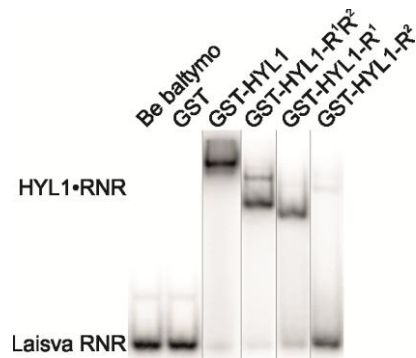


3.32 pav. Už HYL1 sąveiką su HEN1 metiltransferaze atsakingų domėnų paieška. (A) Iš atskirų HYL1 sričių sudarytų baltymų domeninė organizacija, parengta pagal Yang et al., 2010. R¹, R² – dgRNR surišantys domenai; NLS – branduolio lokalizacijos signalas. (B) Su GST sulietų HYL1 sutrumpintų variantų sąveikos su pilno ilgio HEN1 ir jo mutantiniais baltymais tyrimas GST ištraukimo ir imunoblotu metodu. Paveiklo aprašymas analogiškas pateiktam 3.29 pav. (C) HYL1 R² domeno dalyvavimo sąveikoje su HEN1 P domenu patvirtinimas mielių dviejų hibridų sistema. Paveiklo aprašymas analogiškas pateiktam prie 3.28 pav.

Eksperimentai, naudojant mielių dviejų hibridų sistemą, patvirtina HEN1 P domeno sąveiką su HYL1 R² domenu. EGY48[pSH18-34] mielės, sintetinančios HEN1 P domeną, sulietą su AD, bei HYL1 R² domeną, sulietą su DSD, auga ir mėlynuoja ant Gal/-Leu terpių (3.32 pav. C). Norint įsitikinti nustatytos sąveikos specifiškumu, patikrinta, ar DSD-HYL1-R² baltymas nesąveikauja su AD bei ar AD-HEN1 baltymas nesudaro kompleksų su DSD. Kadangi pastaruosius baltymus sintetinančios mielės neauga ant galaktozinės,

leucino neturinčios terpės bei nemėlynuoja ant Gal/+Leu terpės (3.32 pav. C), vadinasi, tirti baltymai nesąveikauja tarpusavyje.

Apibendrinant, eksperimentai, atlikti GST ištraukimo metodu ir mielių dviejų hibridų sistema, parodė, kad HEN1 P ir HYL1 R² domenų pakanka sąveikos tarp minėtų baltymų susidarymui.

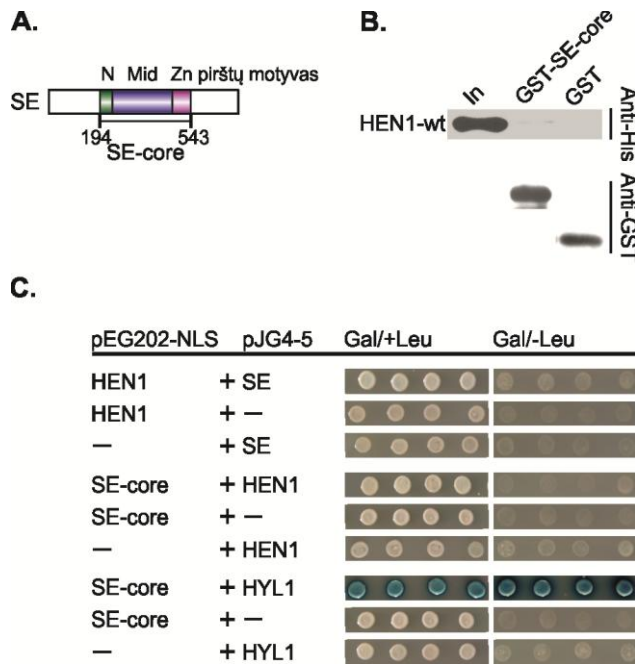


3.33 pav. Su GST sulietų HYL1 baltymų siR173/siR173* duplekso surišimo aktyvumo tyrimas EMSA-PAAG. Be baltymo (pirmas takelis iš dešinės į kairę) ar su 0,5 μM GST, su atitinkamu GST sulietu HYL1 baltymu inkubuotos ³²P 5' gale žymėtos dgRNR (45 nM) judrumas tirtas natyviame PAAG. GST – glutationo-S-transferazė; R¹ ir R² – HYL1 dgRNR surišantys domenai.

3.3.2. HEN1 sąveikos su mikroprocesoriaus komplekso baltymais SERRATE ir DCL1 tyrimas

HYL1 baltymas, su kuriuo sąveikauja metiltransferazė, yra vienas iš mikroprocesoriaus komplekso komponentų. Norint detaliau suprasti galimą HEN1 vaidmenį augalų miRNR biogenezėje, nusprendėme ištirti, ar HEN1 sąveikauja su kitais šį kompleksą sudarančiais baltymais, SERRATE (SE) bei DCL1.

HEN1 sąveika su SERRATE. SE - cinko pirštų motyvą turintis baltymas, kuris kartu su HYL1 užtikrina tikslų ir efektyvų DCL1 vykdomą miRNR/miRNR* dupleksų iškirpimą iš jo pirmtakų, pri-miRNR ir pre-miRNR (detaliau apie šį baltymą 1.2.1. skyriuje). HEN1 galima sąveika su SE baltymu tirta mielių dviejų hibridų sistema (2.2.19. skyrius), kai pilno ilgio cinko pirštų motyvą turintis baltymas (1.13 pav. A) sulietas su AD ir kai sutrumpintas, žinomos struktūros ir centrinę SE dalį (194-543 ar.) apimantis SE-core (3.34 pav. A) baltymas sulietas su BD, o HEN1 atitinkamai – su BD ir su AD. EGY48[pSH18-34] mielės, sintetinančios pastaruosius chimerinius baltymus, neauga ant Gal/-Leu terpės (3.34 pav. C). Gautas mielių fenotipas rodo, kad



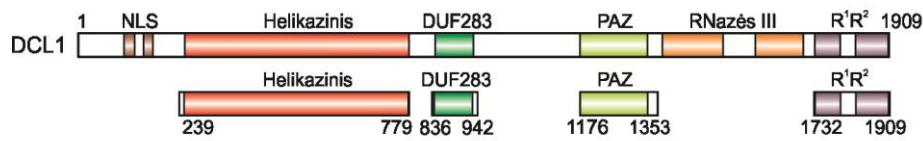
3.34 pav. HEN1 sąveika su pilno ilgio SE baltymu ir su žinomos struktūros centrine SE dalimi SE-core. (A) SE domeninė organizacija, parengta pagal Machida et al., 2011. SE centrinę dalį SE-core sudaro N galinis (N), MID (Mid; angl. *Middle*) domenai bei cinko pirštų motyvą turinti dalis. (B) HEN1 nesąveikavimo su centrine SE dalimi parodymas GST ištraukimo metodu. Paveikslo aprašymas analogiškas pateiktam 3.29 pav. (C) Mielių dviejų hibridų sistemoje su DSD sulietas HEN1 baltymas ar SE-core, koduojami atitinkamai pEG202-NLS-HEN1, pEG202-NLS-SE-core plazmidžių, nesijungia su aktyvuojančiu domenu, sulietu pilno ilgio SE baltymu ar HEN1, koduojamų atitinkamai pJG4-5-SE, pJG4-5-HEN1 plazmidžių. Nesusidarant tarpbaltyminei sąveikai mielės neauga ant Leu neturinčios terpės bei auga, bet nemėlynuoja ant Leu turinčios terpės. Publikuotos SE-core•HYL1 sąveikos tyrimas mielių dviejų hibridų sistemoje atliktas kaip teigiama kontrolė Machida et al., 2011. Paveikslo aprašymas analogiškas pateiktam 3.28 pav.

HEN1 nesudaro kompleksų nei su SE, nei su SE-core. GST ištraukimo metodu yra parodyta, kad SE-core sąveikauja su HYL1 baltymu (Machida et al., 2011). Stebint SE-core ir HYL1 sąveiką naudojamos mielių dviejų hibridų sistemos EGY48[pSH18-34] ląstelėse (3.34 pav. C), ne tik patvirtintas žinomas SE-core•HYL1 komplekso susidarymas kitu, *in vivo* metodu, bet ir įsitikinta, kad SE-core tikrai sintetinamas mielių ląstelėse. Norint įsitikinti, kad SE-core ir metiltransferazė nesąveikauja tarpusavyje, atlikti GST ištraukimo *in vitro* eksperimentai (2.2.21. skyrius). Naudojant anti-His antikūnus, imunobloto GST-SE-core takelyje HEN1 juostelė neišryškėjo (3.34 pav. B). Gautas rezultatas patvirtina, kad HEN1 nesudaro kompleksų su GST-SE-core baltymu.

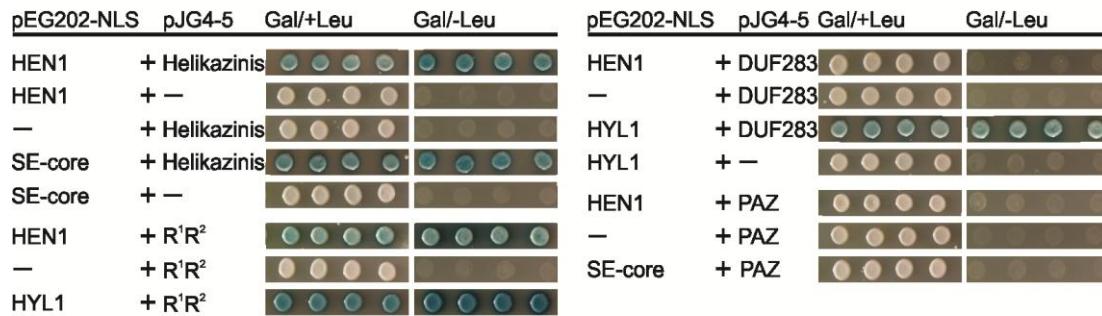
HEN1•DCL1 sąveikos nustatymas. DCL1 – trečio tipo ribonukleazė, kuris su SE ir HYL1 sudaro mikroprocesoriaus kompleksą, kuris vykdo tikslų miRNR/miRNR* duplekso iškirpimą iš pirmtakų, pri- ir pre-miRNR (plačiau apie šį baltymą 1.2.3. skyriuje). Nors ne visų jos septynių domenų funkcijos

yra žinomos, tačiau šiuo metu parodyta, kad ribonukleazės helikazinis ir PAZ domenai sudaro tarpbaltyminius kontaktus su šiais augalų miRNR biogenezės dalyviais: centrinę SE dalį apimančiu SE-core (Machida et al., 2011), DDL (Yu et al., 2008) ir NOT2b (Wang et al., 2013a) baltymais. Tuo tarpu sutrumpinti DCL1 baltymai, sudaryti iš DUF283 bei R¹ ir R² domenų, specifiškai jungiasi su HYL1 baltymu (Liu et al., 2013; Qin et al., 2010). Norint patikrinti DCL1 sąveiką su HEN1 mielių dviejų hibridų sistema, pJG4-5 vektoriaus pagrindu sukonstruotos plazmidės, koduojančios DCL1 domenus: helikazinį, DUF283, PAZ bei R¹ ir R² (3.35 pav. A) N gale sulietus su transkripciją aktyvuojančiu domenu (AD). EGY48[pSH18-34] ląsteles transformavus pastarosiomis plazmidėmis bei pEG202-NLS-HEN1, ant Gal/+Leu ir Gal/-Leu analizuota galima ribonukleazės domenų sąveika su pilno ilgio metiltransferaze. Gauti rezultatai rodo, kad bent du DCL1 domenai: helikazinis ir du iš eilės išsidėstę dgRNR surišantys domenai, R¹ ir R², dalyvauja jam sąveikaujant su HEN1 metiltransferaze (3.35 pav. B). Tuo tarpu DCL1•HYL1 komplekso susidarymui esminis ribonukleazės DUF283 domenas (Qin et al., 2010) sąveikų su pilno ilgio metiltransferaze nesudaro. Iš literatūrinių šaltinių yra žinoma, kad DCL1 R¹R² ir DUF283 domenai sąveikauja su HYL1 (Liu et al., 2013; Qin et al., 2010), o ribonukleazės helikazinis ir PAZ domenai – su SE-core (Machida et al., 2011). Norint įsitikinti, kad naudojamos mielės sintetina DCL1 domenus, tirta jų sąveika su pastaraisiais baltymais dviejų hibridų sistemos EGY48[pSH18-34] ląstelėse. Iš 3.35 pav. B dalyje pateiktų rezultatų matyti, kad mielės, sintetinančios HYL1 ir DCL1 R¹R² ar DUF283 domeną, mėlynuoja ir auga ant Gal/-Leu terpės. Taip pat ant šios terpės mėlynas kolonijas formuoja EGY48[pSH18-34] ląstelės, transformuotos SE-core ir ribonukleazės helikazinį domeną koduojančiomis plazmidėmis. Gauti rezultatai ne tik patvirtino žinomas sąveikas, bet ir įrodė, kad naudojamose mielėse tikrai sintetinami atitinkami DCL1 domenai. Tuo tarpu mielėse, transformuotose pEG202-NLS-SE-core ir pJG4-5-DCL1-PAZ plazmidėmis, SE-core sąveika su ribonukleazės PAZ domenu nėra stebima. Kadangi anksčiau skelbti literatūriniai duomenys rodo, kad tarp jų susidaro

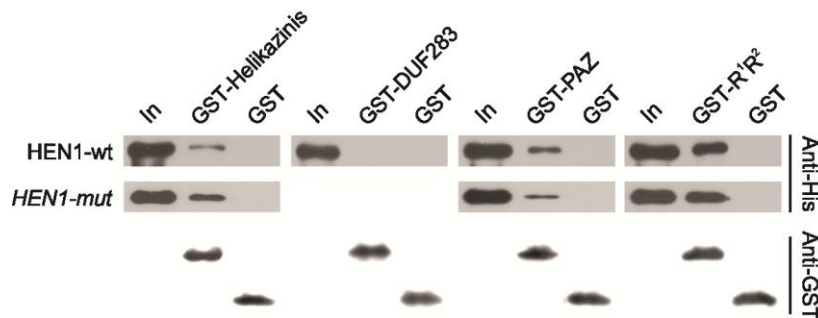
A.



B.



C.

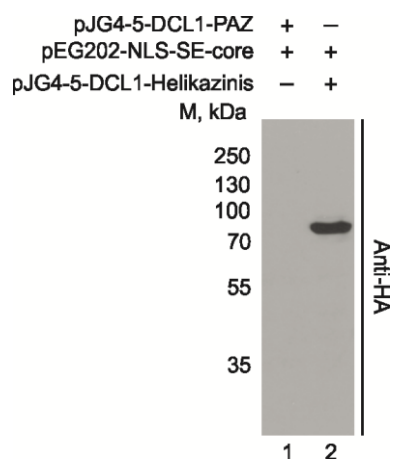


3.35 pav. HEN1 sąveika su iš DCL1 domenų sudarytais baltymais. (A) Viršuje - pilno ilgio DCL1 domeninė organizacija (parengta pagal Mlotshwa et al., 2005). Apačioje - tarpbaltyminės sąveikos tyrimams naudotų sutrumpintų ribonukleazės baltymų, apimančių atskirus DCL1 domenų, domeninė organizacija. Prie pastarųjų baltymų skaičiais nurodytos atitinkamą domeną sudarančios aminorūgštys. DUF283 pažymėtas DCL1 nežinomos funkcijos domenas 283 (angl. *Domain of Unknown Function 283*); PAZ – ribonukleazės Piwi-Argonaute-Zwille domenas, identifikuotas Piwi, Argonaute ir Zwille baltymuose; R¹, R² – DCL1 dgRNR surišantys domenai. (B) Su DSD sulieto pilno ilgio HEN1 baltymo, koduojamo pEG202-NLS-HEN1 plazmidės, sąveikos su iš atskirų DCL1 domenų sudarytais baltymais, sulietais su AD ir koduojamais pJG4-5-DCL1-Helikazinis, pJG4-5-DCL1-R¹R², pJG4-5-DCL1-DUF283, pJG4-5-DCL1-PAZ plazmidžių, tyrimas mielių dviejų hibridų sistema. Nesusidarant tarpbaltyminei sąveikai mielės neauga ant Leu neturinčios terpės bei auga, bet nemėlynuoja ant Leu turinčios terpės. Iš literatūrinių šaltinių žinomų tarpbaltyminių SE-core•DCL1-Helikazinis, HYL1•DCL1-R¹R², HYL1•DUF283 ir SE-core•DCL1-PAZ sąveikų tyrimai mielių dviejų hibridų sistemoje atlikti kaip teigiamos kontrolės (Hiraguri et al., 2005; Machida et al., 2011; Qin et al., 2010). Paveiklo aprašymas analogiškas pateiktam 3.28 pav. (C) HEN1 sąveikos su iš atskirų DCL1 domenų sudarytais baltymais tyrimas GST ištraukimo metodu. HEN1-*mut* – pilno ilgio HEN1 metiltransferazė, kurios V543, L544, V550 pakeisti alaniniais (3.1 pav. C; 3.31 pav. A). Paveiklo aprašymas analogiškas pateiktam 3.29 pav.

kontaktai (Machida et al., 2011), įtarta, jog mielėse neaktyvuojama reporterinių *LEU2* ir *LacZ* genų raiška, nes nevyksta ribonukleazės PAZ domeno sintezė. Eksperimentuose naudota pJG4-5-DCL1-PAZ plazmidė koduoja AD-HA-DCL1-PAZ baltymą, sudarytą iš ribonukleazės PAZ domeno N gale sulieto su AD ir už jo išsidėsčiusio HA (žmogaus gripo viruso apvalkalo baltymo hemaglutinino) epitopo (2.3 pav. B). Todėl norėdami patikrinti, ar EGY48[pSH18-34] mielės, turinčios pEG202-NLS-SE-core ir pJG4-5-DCL1-PAZ plazmidės, nesintetina DCL1 PAZ domeną, turintį AD-HA-DCL1-PAZ, atlikome šio chimerinio baltymo „paiešką“ mielių ląstelių lizate (2.2.20. skyrius) panaudojant HA epitopui specifinius antikūnus. 3.36 pav. pateiktoje imunobloto nuotraukoje matyti, kad pastarojo lizato takelyje (1 takelis) juostelės nėra. Jei eksperimentui naudoti anti-HA antikūnai yra funkciškai aktyvūs, gautas rezultatas rodo, kad naudojamose mielių dviejų hibridų sistemos ląstelėse ribonukleazės PAZ domeną turintis chimerinis baltymas nesintetinamas. Antikūnų funkcionalumui patikrinti atliktas mielių, transformuotų pEG202-NLS-SE-core ir pJG4-5-DCL1-Helikazinis plazmidėmis, kurios koduoja tarpusavyje sąveikaujančius BD-SE-core ir AD-HA-DCL1-Helikazinis baltymus, lizatų imunoblotas su anti-HA. Šio lizato takelyje (3.36 pav. 2 takelis) matoma 76,5 kDa AD-HA-DCL1-Helikazinis baltymo juostelė patvirtina, kad imunoblotams naudoti HA epitopui specifiniai antikūnai yra funkciškai aktyvūs. Kadangi EGY48[pSH18-34] mielės nesintetina chimerinio AD-HA-DCL1-PAZ baltymo, tai ištirti PAZ domeno svarbą DCL1•HEN1 komplekso susidarymui mielių dviejų hibridų sistema neįmanoma.

Siekiant patvirtinti, kad HEN1 sudaro kompleksus su DCL1 helikaziniu, R¹ ir R² domenais, bet ne su šios nukleazės DUF283 domenu, bei norint patikrinti galimą metiltransferazės sąveiką su pastarosios nukleazės PAZ domenu, atlikti GST ištraukimo eksperimentai su iš atskirų DCL1 domenų sudarytais, N gale su GST sulietais baltymais. Nustatyta, kad sutrumpinti DCL1 baltymai sudaryti iš R¹ ir R² domenų bei iš atskirų helikazinio ar PAZ domenų sudaro kompleksus su pilno ilgio metiltransferaze (3.35 pav. C). Tuo

tarpu HEN1 nestebimas mėginiuose nei su GST, nei su GST-DUF283. Tai rodo, kad DCL1 DUF283 domenas DCL1 ir HEN1 sąveikoje nedalyvauja. Pažymėtina, kad priešingai nei HYL1 baltymo atveju, trijų aminorūgščių pakaita P domene (alaniniais pakeistos Val543, Leu544 ir Val550 aminorūgštys) nesumažina HEN1 baltymo sąveikos su DCL1 (3.35 pav. C), kas leidžia manyti, kad šios trys aminorūgštys nėra esminės susidarant DCL1•HEN1 kompleksui.



3.36 pav. Naudojamos dviejų hibridų sistemos mielių EGY48[pSH18-34] gebėjimo sintetinti chimerinį AD-HA-DCL1-PAZ baltymą tikrinimas imunoblotu. 1 takelyje nematoma juostelė rodo, kad mielių, transformuotų pEG202-NLS-SE-core ir pJG4-5-DCL1-PAZ plazmidėmis, lizate HA epitopą turinčio AD-HA-DCL1-PAZ baltymo nėra. 2 takelyje anti-HA antikūnais išryškinta mielių, turinčių pEG202-NLS-SE-core ir pJG4-5-DCL1-Helikazinis plazmidės, lizate esančio, vadinasi sintetinamo, 76,5 kDa AD-HA-DCL1-Helikazinis baltymo juostelė. Pastarajame takelyje matoma juostelė rodo, kad HA epitopo detekcijai naudoti antikūnai yra funkciškai aktyvūs.

REZULTATŲ APTARIMAS

Šio darbo tiriamasis objektas - modelinio augalo *A. thaliana* HEN1 metiltransferazė - priklauso eukariotiniams organizmams būdingų mažųjų nekoduojančių RNR, 3' galinių nukleotidų 2'-O-metiltransferazių (priklauso metiltransferazių (EC 2.1.1) popoklasiui) šeimai. Parodyta, kad šios šeimos atstovų atliekamas metilinimas apsaugo mnkRNR nuo papildomo 3' galo uridilinio ir/ar 3'-5' degradacijos. Nors mnkRNR metiltransferazių katalizuojama reakcija yra ta pati, tačiau jų atpažįstami ir metilinami substratai skiriasi. Gyvūnų metiltransferazės modifikuoja viengrandines RNR, o augalų ir žaliadumblių metiltransferazės – tik dvigrandines RNR (Vilkaitis et al., 2010). Išskirtinė pastarųjų baltymų savybė – daugiadomeninė struktūra. Be konservatyvaus metiltransferazinio domeno, baltažiedžio vairo metiltransferazė turi papildomus keturis N gale išsidėsčiusius domenus, kurie nebūdingi HEN1 homologams gyvūnuose (Huang, 2012). Tai nežinomos funkcijos, į peptidil-prolino *cis-trans* izomerazę panašus P domenas, du R¹ ir R² domenai, kuriuose randamos dgRNR surišančios sritys, bei tarp pastarųjų išsidėstęs La motyvą turintis L domenas, kuris sąveikauja su mnkRNR/mnkRNR* duplekso metilinos grandinės 5' galu (1.22 pav.) (Huang et al., 2009). Nors šio baltymo unikali struktūra, specifiškumas dgRNR bei biologinė svarba buvo plačiai tirta pasaulio mokslininkų, tačiau išsamaus paaiškinimo, kaip vyksta substrato atpažinimas bei jo metilinimas pasigesta. Todėl norėdami detalizuoti *A. thaliana* HEN1, o kartu tam pačiam pošeimui priklausančių baltymų veikimo mechanizmą, šiame darbe tyrėme metiltransferazės sąveiką su substratais, susidarančių kompleksų stabilumą bei M, R¹ ir R² domenų svarbą šiuose procesuose. Analizavome konkrečios mnkRNR/mnkRNR* duplekso grandinės metilinimą bei siekdami geriau suprasti HEN1 biologinę reikšmę identifikavome vienintelio su substratu kontaktų nesudarančio P domeno nežinomą funkciją.

4.1. HEN1 sąveika su dgRNR substratais

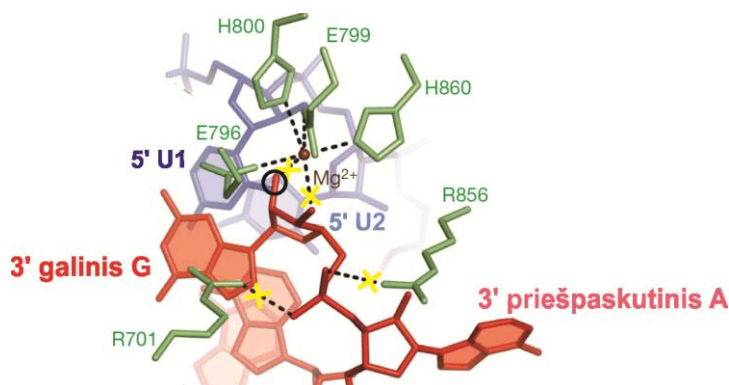
A. thaliana ląstelėse dažniausiai aptinkamos 21-24 nt ilgio dvigrandinės mnkRNR (Bologna et Voinnet, 2014), bet ne dvigrandinės DNR ar viengrandinės RNR, yra efektyviai modifikuojamos vairo metiltransferazės *in vitro* (Vilkaitis et al., 2010; Yang et al., 2006a; Yu et al., 2005). Tačiau nebuvo žinoma, ar HEN1 specifiškumas substrato tipui yra apsprendžiamas mnkRNR/mnkRNR* duplekso surišimo ar metilgrupės pernešimo nuo kofaktoriaus AdoMet ant dgRNR stadijoje. EMSA-PAAG metodu ištyrę HEN1 sąveiką su 21-23 nt mnkRNR/mnkRNR* kompleksais ir jiems struktūra, nukleotidų seka identiškomis ar skirtingomis dgDNR bei 21-28 nt ilgio vgRNR, vgDNR (3.2 pav.; 3.1.2. skyrius) nustatėme, kad baltymas sudaro kompleksus tik su dgRNR (3.3 pav.). Gauti rezultatai rodo, kad metiltransferazės specifiškumas modifikuojamiems substratams yra apsprendžiamas substrato surišimo stadijoje. *In vitro* HEN1 metiltransferazė modifikuoja, vadinasi, ir sudaro kompleksus su mnkRNR-DNR hibridais, kurių ilgis yra artimas augalų mnkRNR/mnkRNR* kompleksams (A. Plotnikova ir A. Osipenko, neskelbta). Žinant, kad *in vivo* vyraujanti DNR molekulių forma yra B, o dgRNR molekulių ir RNR-DNR hibridų – A, gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad ne tik dvigrandinio substrato ilgis, bet ir jo forma yra svarbi HEN1 iš visų ląstelinių nukleorūgščių atpažįstant dviejų klasių mnkRNR/mnkRNR* (siRNR/siRNR* ir miRNR/miRNR*) kompleksus.

Baltažiedžio vairo HEN1 dalyvauja ne tik miRNR, bet ir visų rūšių siRNR susidarymo keliuose (Bologna et Voinnet, 2014; Pumplin et Voinnet, 2013). Didžioji dalis *A. thaliana* mnkRNR yra metilintos, vadinasi, miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* kompleksai konkuruoja dėl HEN1 katalizuojamos modifikacijos (Yu et al., 2010). siRNR tipo kompleksai yra sudaryti iš pilnai komplementarių grandinių, o dvigrandinė miRNR paprastai turi nesuporuotų nt iškyšas, nekomplementarius nukleotidus. Augaluose aptinkamų miRNR, siRNR molekulių nukleotidų sekos yra skirtingos. Norint nustatyti, ar mnkRNR/mnkRNR* kompleksų pirminė ir/ar antrinė struktūros

veikia HEN1 afiniškumą substratams, EMSA-PAAG metodu ištyrėme pilno ilgio metiltransferazės sąveiką su siRNR tipo molekule bei su dviem miRNR/miRNR* dupleksais, besiskiriančiais nukleotidų seka bei struktūra (3.1.3. skyrius). Nustatėme, kad metiltransferazė suriša tirtas dvigrandines miRNR ir siRNR panašiu stiprumu (3.4 pav.). *In vitro* gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad vairo HEN1 neturi struktūrinės determinantės, leidžiančios atskirti dvigrandines miRNR nuo siRNR ląstelėse.

mnkRNR biogenezeje iš pirmtakų iškirpti mnkRNR/mnkRNR* dupleksai sąveikauja su Ago šeimos baltymu susidarant mnkRNR efektoriniam kompleksui RISC. Jam bręstant viena iš mnkRNR/mnkRNR* duplekso grandinių yra pašalinama. Augaluose subrendusiame RISC komplekse išlikusios mnkRNR grandinės yra metilintos. *In vitro* parodyta, kad metiltransferazė HEN1 modifikuoja abi mnkRNR/mnkRNR* duplekso grandines (Vilkaitis et al., 2010; Yang et al., 2006a; Yu et al., 2005). Remiantis šiais tyrimais, manoma, kad siRNR/siRNR* ir miRNR/miRNR* dupleksų abiejų grandinių 3' galinių nukleotidų metilinimas vyksta ir *in vivo*. Kadangi HEN1 turi tik vieną metiltransferazinį domeną, tai dgRNR abiejų grandinių modifikacija gali vykti tik per tarpinę hemimetilintą būseną – kai tik viena iš duplekso grandinių turi metilgrupę ir tik po to metilinama antroji grandinė (3.5 pav.). Tokiu atveju augalų ląstelėse turėtų egzistuoti nemetilintos, pilnai metilintos ir hemimetilintos dgRNR. Norėdami nustatyti kaip vienos ar dviejų metilgrupių buvimas substrate paveikia sąveikos su metiltransferaze stiprumą, ištyrėme HEN1-wt sąveiką su augaluose metilnamo miR173/miR173* duplekso metu susidaranciais tarpiniais produktais miR173^{CH3}/miR173*, miR173/miR173*^{CH3} ir galutiniu katalizuojamos reakcijos produktu miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} (3.6 pav. A). HEN1 kompleksų su nemetilinta ir vieną metilgrupę turinčioms dgRNR disociacijos konstantų reikšmės yra tos pačios nanomoliarinės reikšmės. Tuo tarpu metiltransferazės afiniškumas dvi metilgrupes 3' galuose turinčiam miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} dupleksui yra 20 kartų mažesnis (3.7 pav. A, C; 3.1 lentelė). Nustatytoje HEN1•mnkRNR/mnkRNR*•AdoHcy struktūroje mnkRNR/mnkRNR*

duplekso nemetilinamos grandinės 3' galinio nukleotido 2'-OH grupė nesudaro kontaktų su L domenu (1.23 pav.) (Huang et al., 2009). Tuo tarpu komplementarios metilinamos grandinės 3' galinio nukleotido 2'- ir 3'-hidroksigrupės koordinaciniais ryšiais įtvirtinamos M domene (4.1 pav.). Todėl vienintelis domenas, kurį gali paveikti metilgrupės pridėjimas 3' gale, yra M domenas. Spėjame, kad ši grupė fermento aktyviajame centre sukelia sterinius trukdžius, sąlygojančius 3' galinio nukleotido ribozės fosforilgrupės išsidėstymo erdvėje pakitimus, dėl kurių nesusidaro vandeniliniai ryšiai tarp pastarosios grupės ir M domeno Arg701 ar/ir Arg856 šoninių grupių bei koordinaciniai ryšiai tarp 3' galinio nt ribozės 2'-, 3'-OH grupių ir Mg^{2+} (4.1 pav.). Tačiau, ar būtent tai trukdo dgRNR 3' galo surišimui, galima būtų atsakyti tik nustatčius HEN1•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} komplekso struktūrą. Apibendrinant, gauti rezultatai leidžia teigti, kad M domenas dalyvauja substrato surišime (4.2 pav. apačioje). AdoHcy yra HEN1 katalizuojamos reakcijos produktas, susidarantis pernešus metilgrupę nuo kofaktoriaus AdoMet ant 2'-O-ribozės. Jo, kaip ir kofaktoriaus AdoMet, jungimosi vieta yra HEN1 aktyvusis centras M domene (1.22 pav. B). Todėl nustatę, kad HEN1



4.1 pav. mnkRNR/mnkRNR* duplekso metilinamos grandinės 3' galinio nukleotido įtvirtinimas HEN1 metiltransferaziniame domene pagal Huang et al., 2009. Šio nukleotido 2'- ir 3'-hidroksigrupės ir metiltransferazinio domeno Glu796, Glu799, His800, His856 koordinuojami Mg^{2+} . 3' galinio nukleotido fosforilgrupė sudaro vandenilinius ryšius su metiltransferazinio domeno Arg701, Arg856. Apibrėžta 3' galinio nukleotido ribozės metilinama padėtis. Ryšiai, kurie gali būti paveikti 3' galinio nukleotido metilgrupės 2'-O padėtyje, pažymėti "x".

metiltransferazės afiniškumas $\text{miR173}^{\text{CH}_3}/\text{miR173}^{\text{*CH}_3}$ padidėja į reakcijos mišinį pridėjus AdoHcy (3.7 pav. C; 3.1 lentelė), patvirtinome HEN1 M domeno svarbą substrato surišimui (4.2 pav. apačioje).

EMSA-PAAG metodu ištyrus tik iš metiltransferazinio domeno sudaryto baltymo HEN1-M sąveiką su $\text{miR173}/\text{miR173}^*$ nustatėme, kad, priešingai nei pilno ilgio HEN1-wt, šis baltymas nesudaro natyviame gelyje detektuojamo $\text{HEN1}\cdot\text{miR173}/\text{miR173}^*$ komplekso (3.13 pav.). Gauti rezultatai rodo, kad pastarojo komplekso susiformavimui vieno M domeno nepakanka - būtini metiltransferazės N galo domenai.

1.22 pav. B dalyje pateiktoje $\text{HEN1}\cdot\text{mnkRNR}/\text{mnkRNR}^*\cdot\text{AdoHcy}$ struktūroje matyti, kad P domenas nesudaro tiesioginių sąveikų su dgRNR, o L domenas yra atsakingas už RNR duplekso modifikuojamos grandinės 5' galo surišimą ir kartu su metiltransferaziniu domenu veikia kaip „molekulinė liniuotė“ nustatant metilinamo substrato ilgį (Huang et al., 2009). R^1 ir R^2 domenuose yra randamos dgRNR surišančios sritys, todėl spėjamas šių domenu dalyvavimas substrato surišime. Norėdami geriau suprasti R^1 ir R^2 domenu atliekamas funkcijas, ištyrėme HEN1 mutantinius baltymus. Nustatėme, kad metiltransferazei neturint R^1 domeno ($\text{HEN1-LR}^2\text{PM}$), $\text{HEN1}\cdot\text{miR173}/\text{miR173}^*$ kompleksai gelyje nesusidaro (3.14 pav. A). Tuo tarpu baltymas, sudarytas iš R^1 domeno HEN1-R^1 , galėjo prisijungti substratą, nes laisvą dgRNR atitinkanti juostelė natyviame gelyje nenustatyta (3.14 pav. A). Norėdami patvirtinti pirmojo dgRNR surišančio domeno svarbą dgRNR prijungime, tęsėme susirišimo eksperimentus su HEN1-KK69-70AA pilno ilgio metiltransferaze, kurioje potencialūs sąveikoje su dgRNR dalyvaujantys R^1 domeno lizinai buvo pakeisti alanino ar. (3.1 pav. C; 3.14 pav. B). Tai, jog šis mutantinis baltymas nesudaro kompleksų su $\text{miR173}/\text{miR173}^*$ duplesu (3.14 pav. A), rodo, kad pirmas dgRNR surišantis domenas yra esminis HEN1 ir substrato komplekso, stebimo EMSA-PAAG, susidarymui. Tuo tarpu vieno R^2 domeno nepakanka natyviame gelyje detektuojamo $\text{HEN1}\cdot\text{miR173}/\text{miR173}^*$ komplekso susidarymui (3.22 pav. A), o ir pilno ilgio metiltransferazė, turinti alaniniais pakeistas R^2 domeno Arg389, His397,

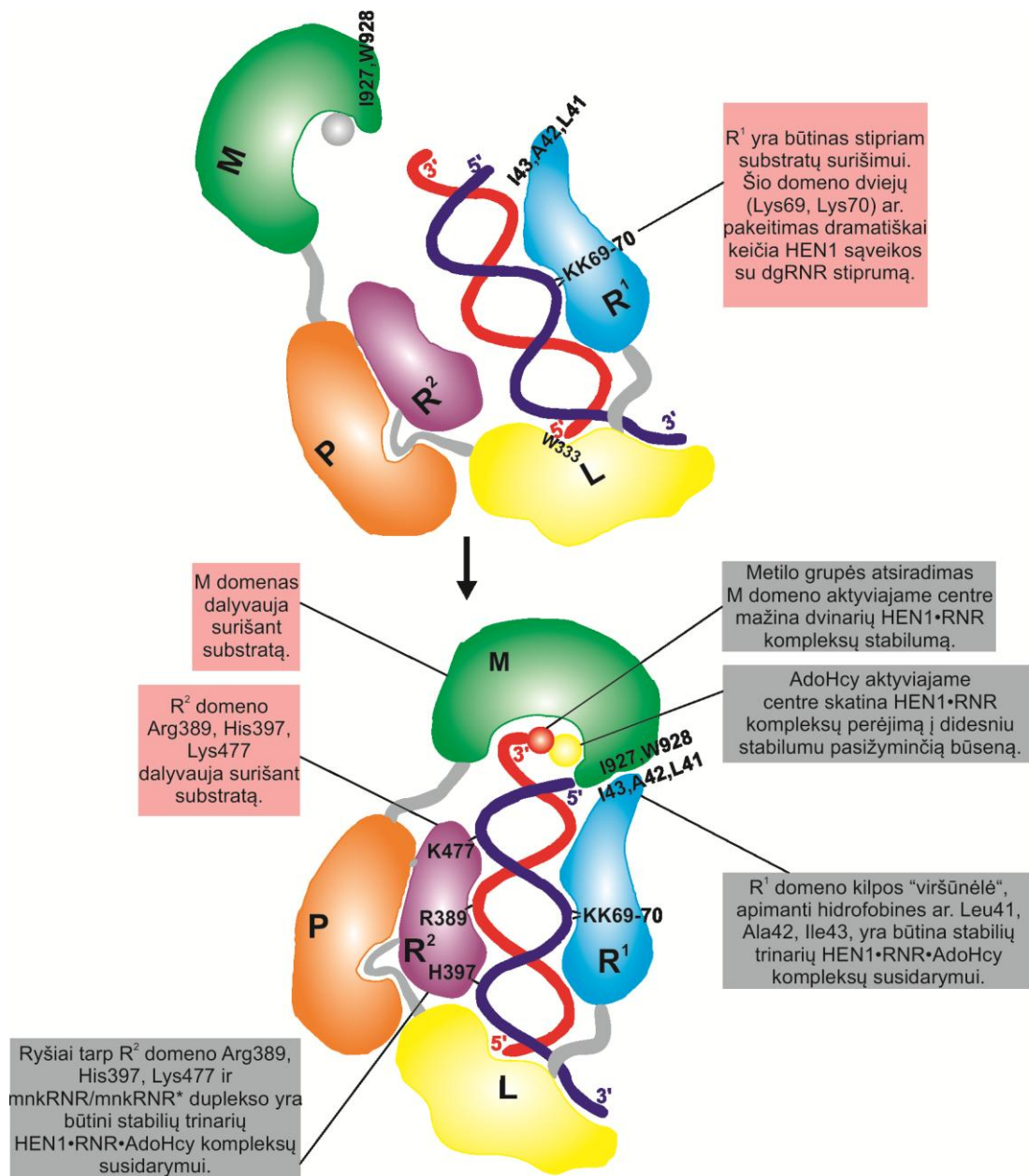
Lys477 (3.1 pav. C; 3.22 pav. B), dramatiškai nekeičia HEN1 sąveikos su miR173/miR173* dupleksu (3.22 pav. A). Vis dėlto, nors HEN1-RHK389,397,477AAA baltymas sudaro kompleksus su substratu, tačiau jo afiniškumas dgRNR yra maždaug 600 kartų mažesnis nei HEN1-wt (3.4 lentelė). Apibendrinant, gauti rezultatai rodo, kad metiltransferazės abu R domenai yra svarbūs formuojantis HEN1 ir dgRNR kompleksui, tačiau jų indėlis surišant substratą yra nevienodas.

Augaluose susidaro dviejų klasių mnkRNR/mnkRNR* dupleksai, kurie skiriasi grandinių komplementarumu: dvigrandinės siRNR sudarytos iš visiškai komplementarių grandinių, o miRNR molekulės turi nekomplementarias bazių poras, nesuporuotų nt iškyšas ar kilpas. Nustatytoje HEN1•mnkRNR/mnkRNR*•AdoHcy struktūroje R² nuo substrato yra nutolęs 3 Å, todėl šio domeno sąveikos su siRNR tipo dupleksais yra mažai tikėtinos. Remdamiesi šiais kristalografiniais duomenimis Huang su kolegomis iškėlė hipotezę, kad R² domenas gali būti svarbus specifinius antrinės struktūros elementus turinčių dvigrandinių miRNR surišimui (Huang et al., 2009). Norėdami išsiaiškinti, ar iš tiesų R² domenas yra svarbus atpažįstant skirtingų klasių mnkRNR/mnkRNR* dupleksus, palyginome HEN1-RHK389,397,477AAA sąveiką su siR173/siR173* ir miR173/miR173* dupleksais (3.2.3. skyrius). Nustatėme, kad, nepaisant miR173/miR173* ir siR173/siR173* dupleksų grandinių skirtingo komplementarumo, esant ar nesant kofaktoriaus analogui, tirti substratai HEN1-RHK389,397,477AAA surišami panašiu stiprumu (3.4 lentelė). Gauti duomenys paneigė Huang ir bendraautorių iškeltą hipotezę, kad R² domenas yra svarbus tik miRNR tipo dupleksų surišimui.

Huang su bendraautoriais parodė, kad stekingo sąveika tarp L domeno Trp333 ir dgRNR metilinamos grandinės 5' pirmo nukleotido heterociklinės bazės (1.23 pav.; 4.2 pav. viršuje) yra svarbi atpažįstant substratą, nes jos pakeitimas alanino ar susilpnina metiltransferazės sąveiką su mnkRNR/mnkRNR* (Huang et al., 2009). Detaliau L domeno vaidmuo substrato surišime nėra ištirtas. Pažymėtina, jog mutantinis baltymas sudarytas

tik iš HEN1 L domeno, kaip ir HEN1-M bei HEN1-R² baltymai, nesudaro EMSA-PAAG identifikuojamo kompleksu su mnkRNR/mnkRNR* duplesku (S. Baranauskė et G. Vilkaitis, neskelbta). Šiame darbe įrodėme, kad HEN1 R¹, R² bei M domenai dalyvauja substrato surišime (4.2 pav.). Tačiau pavieniui tik R¹ domenas sudaro EMSA-PAAG matomus kompleksus su substratu. R¹ domeno afiniškumas substratui yra tik keliais kartais mažesnis nei HEN1-wt (3.16 pav.; 3.4 lentelė), kas rodo, jog pastarasis domenas yra būtinas stipriam substratų surišimui. Pažymėtina, kad tik dviejų R¹ domeno ar. Lys60, Lys70 pakaitos pakanka, kad nesusidarytų natyviame gelyje matomi HEN1•RNR kompleksai. Remiantis gautais duomenimis, pasiūlėme HEN1 sąveikos su miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleskais modelį, pagal kurį pirmiausia R¹ sudaro kontaktus su dgRNR (4.2 pav. viršuje), o vėliau R² ir M domenai stabilizuoja HEN1•RNR kompleksą (4.2 pav. apačioje).

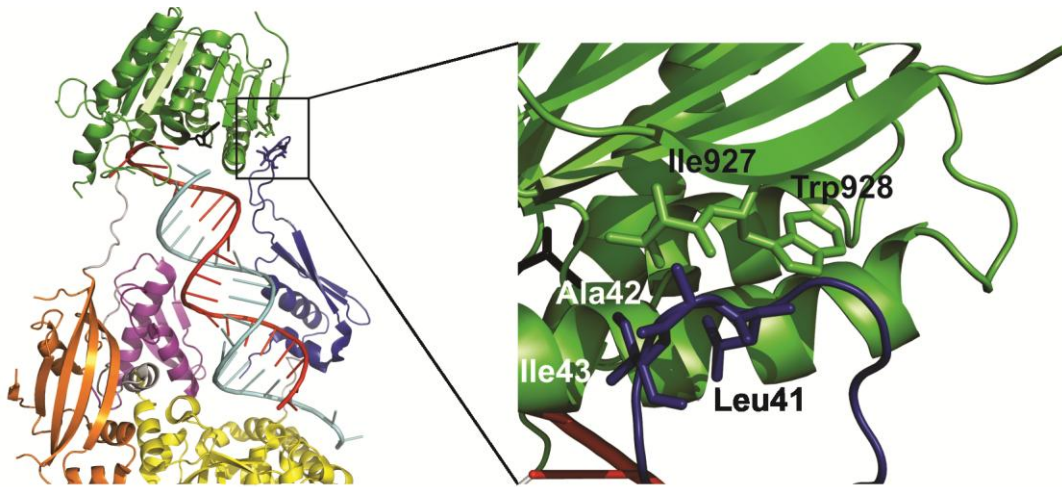
Norint palyginti R¹ ir R² domenų vaidmenį susidarančių HEN1•mnkRNR/mnkRNR* kompleksų stabilumui, ištyrėme kokiu greičiu išyra HEN1-wt kompleksai su nemetilintu substratu (miR173/miR173*) bei galutiniu katalizuojamos reakcijos produktu (miR173^{CH3}/miR173*^{CH3}), pridėjus konkurentinės RNR perteklių. Kadangi dvinarių HEN1 kompleksų su pastaraisiais substratais iširimo dinamiką (3.9 pav.) pavyko aprašyti tik pritaikius dviejų eksponenčių iširimo lygtį, spėjame, kad mišinyje egzistuoja dviejų konformacinių būsenų dvinariai kompleksai, tarpusavyje besiskiriantys stabilumu (3.5 lentelė). Tačiau didžiąją dalį dvinarių HEN1 kompleksų su pilnai metilintu substratu, priešingai nei su nemetilintomis dgRNR, sudaro mažesniu stabilumu pasižymintys kompleksai. Gauti rezultatai rodo, kad metilgrupės atsiradimas aktyviajame centre, sąlygojantis silpnesnę substrato 3' galo surišimą, yra HEN1•RNR kompleksų stabilumą mažinantis veiksnys (4.2 pav. apačioje). Tačiau tiek HEN1•miR173/miR173*, tiek HEN1•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} kompleksai pereina į stabilesnę būseną AdoHcy esant M domene (3.5 lentelė; 4.2 pav. apačioje). Gauti rezultatai rodo, kad M domenas yra svarbus ne tik surišant substratą, bet ir stabilių kompleksų susidarymui.



4.2 pav. Hipotetinis HEN1 metiltransferazės sąveikos su mnkRNR/mnkRNR* dupleksu modelis bei susidarančio komplekso stabilumą lemiantys veiksniai. Metiltransferazei HEN1 sudarant ryšius su substratu pirmiausia R¹ sudaro kontaktus su dgRNR, o tuomet surišant dupleksą prisideda R² ir M domenai. Metiltransferazės susirišimo su substratu stiprumą lemiantys veiksniai pateikti rausvose išnašose, o stabilumą – pilkos spalvos išnašose. Raudonu skrituliuku pažymėta metilgrupė, geltonu – reakcijos produktas AdoHcy ir pilku - kofaktorius AdoMet. HEN1 metiltransferazės R¹ domenas nupieštas mėlyna spalva, L domenas – geltona, R² domenas – violetine, P domenas – oranžine, M domenas – žalia. Pastaba: metilgrupė dgRNR nekeičia domenų sąveikos su substratu eiliškumo spėjamame modelyje.

Norėdami suprasti, kaip AdoHcy buvimas padidina HEN1•RNR kompleksų stabilumą analizavome vairo HEN1 komplekso su dvigrandine mnrRNR ir kofaktoriaus analogu AdoHcy struktūrą (1.22 pav. B). Iš jos matyti, kad R¹ domeno kilpos „viršūnėlė“, turinti hidrofobines ar. Leu41, Ala42, Ile43, išsidėsto šalia M domeno C galinės β juostos hidrofobinių aminorūgščių Ile927, Trp928 (4.3 pav.). Pažymėtina, jog išanalizavę augalų mnrRNR biogenezės baltymų R domenų ar. sekas (3.18 pav.) nustatėme, kad tokios ilgesnės ir papildomas hidrofobines ar. turinčios kilpos yra aptinkamos tik augalų mnrRNR metiltransferazių R domenuose. Remiantis šiais duomenimis, iškėlėme hipotezę, kad AdoHcy jungiantis M domene vyksta persitvarkymai ir susidaro kontaktai tarp metiltransferazinio domeno ir R¹ domeno netipinės kilpos „viršūnėlės“ ar. (4.2 pav. apačioje). Manome, tokiu būdu substratas „užrakinamas“ fermente ir užtikrinamas stabilių kompleksų susiformavimas. HEN1 R¹ domeno kilpos funkcinei analizei naudota pilno ilgio metiltransferazė, turinti 38-45 ar., apimančių netipinės kilpos „viršūnę“, pakaitą glicinu (3.1 pav. C; 3.19 pav.). Ištyrus HEN1-Δ38-45•miR173/miR173* kompleksų iširimo dinamiką, identifikavome dviejų skirtingu stabilumu pasižyminčių dvinarių kompleksų egzistavimą reakcijos mišinyje (3.5 lentelė). Nustatėme, kad, metiltransferazei neturint tiriamos kilpos, mažesnio stabilumo HEN1-Δ38-45•RNR kompleksai išyra kur kas greičiau, todėl jų iširimo greičio konstantos naudotu EMSA-PAAG metodu negalėjome apskaičiuoti. Priešingai nei HEN1-wt atveju, mažesniu stabilumu pasižymintys kompleksai sudaro didžiąją dalį dvinarių HEN1-Δ38-45•RNR kompleksų ir jie išlieka į reakcijos mišinį pridėjus AdoHcy. Dar didesnė R¹ domeno kilpos svarba kompleksų stabilumui išryškėjo ištyrus suformuoto HEN1-Δ38-45•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} komplekso iširimą laike (3.5 lentelė). Nustatėme, kad metiltransferazei, neturinčiai tiriamos kilpos, sąveikaujant su galutiniu reakcijos produktu susidaro tik mažo stabilumo kompleksai, kurių tik 1/10 dalis pereina į stabilesnę būseną AdoHcy esant M domene. Gauti rezultatai rodo, kad AdoHcy buvimas M domene bei sąveikos, susidaranti

tarp R¹ kilpos ir M domeno, sinergistiškai didina HEN1 kompleksų su substratu stabilumą.



4.3 pav. Hidrofobinės sąveikos tarp HEN1 metiltransferazinio domeno C galinės β juostos Ile927, Trp928 ir R¹ domeno kilpos, išsidėsčiusios tarp pirmos ir antros β juostų, Leu41, Ala42, Ile43. Pažymėjimai: metiltransferazinis domenas - žalia spalva; R¹ domenas - mėlyna spalva; R² domenas - violetine spalva; L domenas - geltona spalva; P domenas - oranžine spalva; mnkRNR/mnkRNR* duplekso metilinama ir nemetilinama grandinės - atitinkamai raudona ir žydra spalvomis.

Metiltransferazės R² domenas, kuris dalyvuoja prijungiant substratą, yra svarbus HEN1 kompleksų su dgRNR stabilizavimui. Šio domeno svarbos HEN1•RNR kompleksų stabilumui tyrimams naudojome pilno ilgio HEN1 baltymą HEN1-RHK389,397,477AAA (3.1 pav. C), kuriame sąveikoje su substratu dalyvaujantys R² domeno Arg389, His397, Lys477 pakeisti į alaninus (3.22 pav. B). Ištyrus dvinarių HEN1-RHK389,397,477AAA kompleksų su dgRNR iširimo dinamiką, nustatėme, kad, kaip ir HEN1- Δ 38-45 baltymo atveju, susidaro žymiai daugiau mažesniu, o ne didesniu stabilumu pasižymintys HEN1-RHK389,397,477AAA•RNR kompleksai, kurie išlieka į reakcijos mišinį pridėjus AdoHcy (3.5 lentelė). Taip pat mažesniu stabilumu pasižymintys HEN1-RHK389,397,477AAA•miRNR/miRNR* ir HEN1-RHK389,397,477AAA•siRNR/siRNR* kompleksai išyra greičiau nei HEN1-wt. Pažymėtina, kad HEN1-RHK389,397,477AAA baltymas, priešingai nei su miR173/miR173* dupleksu, neformuoja natyviame gelyje matomų kompleksų su miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} (3.24 pav. A). Pastarasis substratas nuo

nemodifikuoto skiriasi tik metilgrupių buvimu 3' galiniuose nukleotiduose. Nustatytoje HEN1•mnkRNR/mnkRNR*•AdoHcy struktūroje mnkRNR/mnkRNR* duplekso tik metilinamos grandinės 3' galinio nukleotido 2'- ir 3'-hidroksigrupės koordinaciniais ryšiais įtvirtinamos M domene (4.1 pav.) (Huang et al., 2009). Vadinasi, metilgrupė gali paveikti M domeno ar sąveikas su 3' galiniu nukleotidu (4.1 pav.). Remiantis šiais duomenimis, spėjame, kad R² domenas sudarydamas kontaktus su dgRNR, padeda metiltransferaziniam domenui surasti ir teisingai išsidėstyti ties dgRNR metilinamos grandinės 3' ir nemetilinamos grandinės 5' galų. Tuo tarpu mutantiniam baltymui HEN1-RHK389,397,477AAA•miR173/miR173* sudarant ryšius su pilnai metilintu substratu miR173^{CH₃}/miR173*^{CH₃}, nesusiformuojantys kontaktai tarp Arg389, His397, Lys477 ir substrato bei susidarantys 3' galinio nukleotido metilgrupės sąlygojami steriniai trukdžiai yra dvi dedamosios, kurios skatina M domeno „nuėjimą“ nuo dgRNR pastarojo galo ir greitą kompleksų iširimą.

Apibendrinant dvinarių HEN1•RNR ir trinarių HEN1•RNR•AdoHcy kompleksų stabilumo tyrimų rezultatus, metiltransferazei sąveikaujant su miR173/miR173* susidaro didesnio ir mažesnio stabilumo dvinariai HEN1•miR173/miR173* kompleksai, kurie pereina į didesniu stabilumu pasižyminčią konformacinę būseną kofaktoriaus analogui AdoHcy esant M domene. Pastarasis perėjimas nevyksta, jei baltymas neturi R¹ domeno kilpos „viršūnėlės“ aminorūgščių ar R² domeno Arg389, His397, Lys477. Vadinasi, vien didesniu stabilumu pasižyminčių HEN1•miR173/miR173*•AdoHcy kompleksų susidarymui būtini visi trys kompleksų stabilumą didinantys veiksniai: AdoHcy buvimas metiltransferazinio domeno aktyviajame centre; R¹ domeno kilpos „viršūnėlės“ hidrofobinių ar (Leu41, Ala42, Ile43) sąveikos su M domeno C galinės β juostos Ile927, Trp928; R² domeno Arg389, His397, Lys477 vandeniliniai ryšiai su dgRNR. Įvykus HEN1 katalizuojamai mnkRNR/mnkRNR* duplekso modifikacijai, fermento aktyviajame centre atsiranda metilgrupė. Norėdami nustatyti, ar šios grupės buvimas aktyviajame centre paveikia kompleksų stabilumą, tyrėme dvinario

HEN1•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} komplekso iširimo dinamiką. Nustatėme, kad, priešingai nei nemetilinto miR173/miR173* duplekso atveju, pilno ilgio metiltransferazei sąveikaujant su katalizuojamos reakcijos galutiniu produktu susidaro kur kas daugiau mažesniu stabilumu pasižymintys dvinariai HEN1•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3} kompleksai. Taigi, nors dgRNR 3' galinio nukleotido metilgrupė M domene skatina HEN1•RNR kompleksų iširimą, tačiau esant visiems trims aukščiau išvardintiems stabilumą didinantiems veiksniams susidaro tik didesniu stabilumu pasižymintys HEN1•miR173^{CH3}/miR173*^{CH3}•AdoHcy kompleksai. Jų iširimo pusperiodis yra tik maždaug du kartus mažesnis nei trinarių kompleksų su nemetilintu substratu. Gauti duomenys rodo, kad pastarieji trys stabilumą lemiantys veiksniai yra itin svarbūs metilinto substrato ilgam užlaikymui, kuris, remiantis duomenimis gautais tiriant metiltransferazės P domeno funkciją (3.3. skyrius), manome, yra reikalingas modifikuotos dgRNR išlikimui komplekse su miRNR biogenezės kelio baltymais HYL1 ir DCL1.

4.2. HEN1 vykdomas miR173/miR173* duplekso individualių grandinių metilinimas

Augaluose iš pre-miRNR pirmtakų iškirptas miRNR/miRNR* dupleksas yra modifikuojamas HEN1 metiltransferazės ir tokiu būdu apsaugomas nuo 3'-5' degradacijos (Tu et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhao et al., 2012a). Tuomet jis su Ago šeimos baltymu, paprastai AGO1, sudaro pre-miRISC kompleksą, iš kurio pašalinama ir degraduojama lydinčioji miRNR* grandinė. Todėl augaluose aptinkamos tik metilintos kreipiančiosios miRNR grandinės išlikusios subrendusiame miRISC komplekse. Nors žinome, kad *in vitro* HEN1 modifikuoja abi miRNR/miRNR* duplekso grandines (Vilkaitis et al., 2010), duomenų įrodančių abiejų grandinių metilinimą *in vivo* nėra.

Iškėlę hipotezę, kad *in vivo* mnkRNR/mnkRNR* dupleksų lydinčiosios grandinės degradaciją gali sąlygoti lėtesnė nei kreipiančiosios grandinės

modifikacija, apskaičiavome augaluose HEN1 metilinamo miR173/miR173* duplekso individualių grandinių metilinimo parametrus (3.1.5. skyrius) ir juos palyginome su hemimetilintų miR173^{CH3}/miR173* ir miR173/miR173*^{CH3} substratų (A. Osipenko) (3.2 lentelė). Nemetilinto ir hemimetilintų miR173/miR173* dupleksų individualių grandinių modifikacijos greičiai yra panašūs, kas rodo, jog metilgrupės buvimas vienoje duplekso grandinėje neturi įtakos vėlesnei komplementarios grandinės modifikacijai. Šie duomenys prieštarauja hipotetinei situacijai augaluose, kai, pavyzdžiui, (i) po kreipiančiosios miRNR grandinės modifikacijos, metilgrupė miRNR^{CH3}/miRNR* duplekse trukdo lydinčiosios miRNR* grandinės metilinimui; (ii) dėl pastarosios grandinės modifikacijos uždelsimo susidaro hemimetilintos dvigrandinės miRNR^{CH3}/miRNR* ir AGO1 kompleksas; (iii) iš jo pašalinama nemetilinta lydinčioji grandinė lengvai degraduojama, o išlikusi metilinta kreipiančioji grandinė suformuoja subrendusį miRISC (AGO1•miRNR^{CH3}) kompleksą. Taip pat priešingai nei buvo tikėtasi, remiantis 3.5 pav. pateiktu HEN1 katalizuojamos reakcijos modeliu, nustatytos lydinčiosios grandinės miR173* modifikacijos greičių konstantų amplitudžių reikšmės rodo, kad *in vitro* 4/5 visų atvejų (3.2 lentelė) metiltransferazė iš pradžių modifikuoja ne kreipiančiąją miR173, o lydinčiąją miR173* grandinę. Rezultatai, kad HEN1 *in vitro* rišasi su miR173/miR173* dupleksu orientacija palankia lydinčiosios miR173* grandinės metilinimui, patvirtinti izotopinio pakeitimo eksperimentais (Plotnikova et al., 2013). Vis dėlto *in vivo* kiti veiksniai gali lemti, kad HEN1 metilina tik į miRISC kompleksus įtraukiamą ir posttranskripcinėje genų raiškos reguliacijoje dalyvaujančią miR173 grandinę. Nustačius HEN1 sąveiką su HYL1 ir DCL1 (detaliau 3.3. ir 4.3. skyriuose), spėjame, kad vairyneje daugiabaltyminiame komplekse lydinčiosios miR173* grandinės modifikacija gali nevykti baltymui/-ams (HYL1 ar/ir DCL1) „paslepiant“ pastarosios grandinės 3' galinį nukleotidą nuo metiltransferazės.

4.3. Tarpbaltyminės HEN1 sąveikos

Į peptidil-prolino *cis-trans* izomerazę panašaus HEN1 P domeno, kuris vienintelis nesudaro sąveikų su substratu (1.22 pav. B), funkcija iki šiol nebuvo žinoma. Tkaczuk su kolegomis nustatė, kad šis domenas nėra atsakingas už prolino *cis-trans* izomerizaciją (Tkaczuk et al., 2006). Žinodami, kad augalų su imunosupresoriniu vaistu sąveikaujančių (FKBP; angl. *FK506-binding proteins*) baltymų į P domeną panašūs PPIaziniai domenai dalyvauja tarpbaltyminėje sąveikoje (Gollan et al., 2012; Huang et al., 2009; Kang et al., 2008; Vasudevan et al., 2015), iškėlėme hipotezę, jog P domenas gali būti svarbus HEN1 sąveikaujant su kitu miRNR biogenezės kelio baltymu.

Augalų miRNR biogenezės dgRNR surišantis baltymas HYL1, III tipo ribonukleazė DCL1 ir cinko pirštų motyvą turintis SERRATE (SE) sudaro mikroprocesoriaus kompleksą, kuris iškerpa 20-22 nt ilgio miRNR/miRNR* dupleksus iš jų pirmtakų, pri-miRNR ir pre-miRNR (Liu et al., 2012a). Iškirptą dvigrandinę miRNR atpažįsta ir modifikuoja HEN1 metiltransferazė. Tuomet metilintas dupleksas sudaro kompleksą su Ago šeimos baltymu (dažniausiai AGO1), iš kurio pašalinus lydinčiąją grandinę susiformuoja subrendęs, kreipiančiąją miRNR grandinę turintis genų raiškos slopinimo kompleksas miRISC. Yra parodyta, kad HYL1 lemia, kuri iš dviejų miRNR/miRNR* dupleksą sudarančių grandinių liks AGO1 turinčiame komplekse miRISC (Eamens et al., 2009). Vadinasi, HYL1 dalyvauja miRNR biogenezės stadijose ne tik prieš miRNR/miRNR* duplekso metilinimą, bet ir po jo. Šie duomenys leido iškelti hipotezę, kad HEN1 per P ar/ir kitus domenus sąveikauja su šiuo dgRNR surišančiu baltymu.

Galimą HEN1 ir HYL1 sąveiką tyrėme EMSA-PAAG metodu, titruojant suformuotus HYL1•siR173/siR173* ir HEN1•siR173/siR173* kompleksus atitinkamai HEN1 ir HYL1 baltymais (3.27 pav.). Abiem atvejais natyviuose geliuose matomos papildomos, mažo elektroforetinio judrumo juostelės, atitinkančios molekulinę masę didesnę nei HYL1•siR173/siR173* ar HEN1•siR173/siR173* kompleksų. Įtardami, kad ši juostelė atitinka trinarį

siR173/siR173*•HEN1•HYL1 kompleksą, nusprendėme HEN1 ir HYL1 sąveiką patvirtinti kitais metodais. Mielių dviejų hibridų sistema nustatėme HEN1 ir HYL1 komplekso susidarymą *in vivo* (3.28 pav.), o GST ištraukimo eksperimentais parodėme, kad HEN1 tiesiogiai ir specifiskai sąveikauja su HYL1 baltymu *in vitro* (3.29 pav.). Iki šiol buvo žinoma, kad HYL1 dalyvauja dviejose augalų miRNR biogenezės stadijose: iki miRNR/miRNR* duplekso susidarymo ir po jo metilinimo, kuomet HYL1 lemia kreipiančiosios grandinės išlikimą besiformuojančiame miRISC (Eamens et al., 2009) ir sąveikauja su šio komplekso baltymu AGO1 (Fang et Spector, 2007). Pažymėtina, kad trimis metodais patvirtinę HEN1•HYL1 sąveiką, įrodėme nenutrūkstamą dgRNR surišančio baltymo dalyvavimą visame miRNR susidarymo kelyje, nuo pri-miRNR hidrolizės iki miRISC susiformavimo.

Norėdami patikrinti prielaidą, kad metiltransferazės P domenas dalyvauja tarpbaltyminėje sąveikoje, GST ištraukimo metodu ištyrėme HYL1 sąveiką su trimis HEN1 sutrumpintais baltymais HEN1-M, HEN1-P, HEN1-PM (3.1 pav. B), sudarytais atitinkamai vien iš M, P ar P ir M domenų. Nustatėme, kad tik baltymai, turintys P domeną, sąveikauja su dgRNR surišančiu baltymu (3.29 pav.). Vadinasi, iš HEN1 C galinę dalį sudarančių M ir P domenų, tik pastarasis domenas yra atsakingas už tarpbaltyminę sąveiką su HYL1. Norėdami patikrinti, ar HEN1 N galo R² ir/ar R¹ bei tarp jų išsidėstęs L domenas dalyvauja tarpbaltyminėje sąveikoje, ištyrėme HEN1-R¹LR² ir HEN1-L baltymus (3.1 pav. B), sudarytus atitinkamai iš R¹, L, R² domenų ir vien iš L domeno. Abu analizuoti baltymai sudaro kompleksus su dgRNR surišančiu baltymu (3.29 pav.). Tačiau kur kas mažesnis HEN1-L sąveikos su HYL1 juostelės intensyvumas lyginant su HEN1-wt ar HEN1-R¹LR² baltymo, leidžia daryti prielaidą, kad ne L domenas yra atsakingas už stiprią HEN1 N galinės dalies sąveiką su HYL1. Nors GST ištraukimo metodu detektavome tik nespecifinę metiltransferazės R² domeno sąveiką su HYL1, tačiau nustatę, kad HEN1-R¹ baltymas, sudarytas tik iš pirmo dgRNR surišančio domeno, nesudaro kompleksų su HYL1 (3.30 pav.), o L domeno indėlis tarpbaltyminėje sąveikoje nežymus, darome išvadą, jog didžiausią vaidmenį HEN1-

R^1LR^2 •HYL1 sąveikoje vaidina HEN1 antras dgRNR surišantis domenas R^2 . Taigi, šis domenas dalyvauja ne tik HEN1 surišant substratą, bet ir tarpbaltyminėje sąveikoje. Tokios dvigubos R domenų funkcijos yra nustatytos ir gyvūnų mnkRNR biogenezėje dalyvaujančių, dvigrandinę RNR surišančių R2D2, PACT bei TRBP baltymų atitinkamai R^1 ir R^2 bei R^2 domenams (Cenik et al., 2011; Guo et al., 2012; Hartig et al., 2011; Kok et al., 2007; Liu et al., 2006; Takahashi et al., 2013). HEN1-P sąveikos su dgRNR surišančiu baltymu imunobloto juostelės intensyvumas yra didesnis nei HEN1- R^1LR^2 baltymo (3.29 pav.). Šie duomenys leidžia įtarti, kad P domenas atlieka pagrindinį vaidmenį susidarant HEN1•HYL1 kompleksui. Šį spėjimą patvirtina stebimas reikšmingas tarpbaltyminės HEN1•HYL1 sąveikos susilpnėjimas pilno ilgio metiltransferazėje pakeitus tris P domeno hidrofobines ar. Val543, Leu544, Val550 į alaninus (3.31 pav. B HEN1-*mut* baltymo sąveika su HYL1).

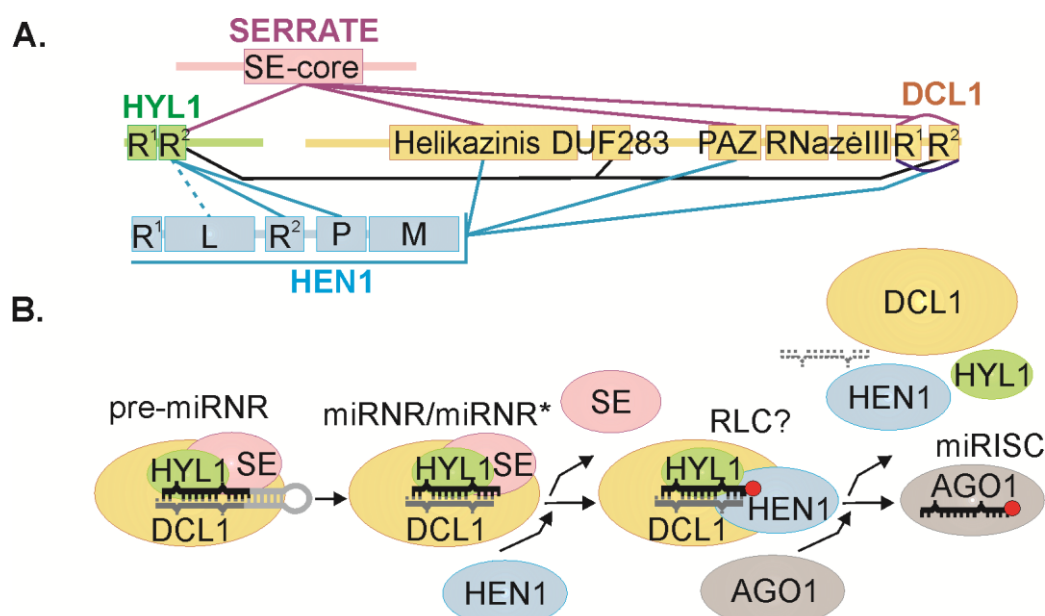
Norėdami nustatyti, kuris iš dviejų HYL1 R domenų sąveikauja su HEN1 baltymu, GST ištraukimo metodu tyrėme pilno ilgio metiltransferazės ir HEN1-P baltymo sąveiką su trimis HYL1 sutrumpintais baltymais (3.32 pav. A): GST-HYL1- R^1R^2 , sudarytu iš abiejų dgRNR surišančių domenų, GST-HYL1- R^1 , sudarytu iš pirmo dgRNR surišančio domeno, bei GST-HYL1- R^2 , sudarytu iš R^2 domeno. Nustatėme, kad HEN1•HYL1 komplekso susidarymui pakanka HYL1 nekanoninio (Rasia et al., 2010) R^2 domeno, kuris sąveikauja su HEN1 P domenu (3.32 pav. B). HYL1 antro dgRNR surišančio domeno sąveiką su metiltransferazės P domenu patvirtinome ir mielių dviejų hibridų sistemoje (3.32 pav. C). Žinant, kad HYL1 R^2 domenai sudaro kontaktus su mikroprocesoriaus komponentais SE ir DCL1 (Machida et al., 2011; Qin et al., 2010), galima daryti prielaidą, kad HEN1, SE ir DCL1 konkuruoja dėl sąveikos su dgRNR surišančiu baltymu. Vadinasi, augalų miRNR brendimo kelyje egzistuoja tam tikras šių baltymų tarpusavio sąveikų susidarymo eiliškumas.

Ar kartu su HYL1 mikroprocesoriaus kompleksą sudarantys DCL1 ir/ar SE baltymai sąveikauja su metiltransferaze, ištyrėme GST ištraukimo ir mielių dviejų hibridų metodu. Nustatėme, kad HEN1-wt nesąveikauja nei su pilno

ilgio cinko pirštų motyvą turinčiu baltymu SE, nei su jo žinomos struktūros centrine dalimi SE-core (3.34 pav.). Tuo tarpu tirdami metiltransferazės sąveiką su iš DCL1 domenų sudarytais baltymais nustatėme, su HEN1 sąveikauja helikazinis, PAZ bei dgRNR surišantys domenai (3.35 pav.), iš kurių helikazinis ir PAZ taip pat būtini baltymo sąveikai su SE (Machida et al., 2011), o už sąveiką su HYL1 atsakingas DUF283 (Qin et al., 2010), HEN1•DCL1 komplekso susidarymui nėra reikalingas.

Nubraižius nustatytų HEN1•HYL1, HEN1•DCL1 bei kitų autorių darbuose įrodytų HYL1•SE, DCL1•SE ir HYL1•DCL1 tarpdomeninių sąveikų tinklus (4.4 pav. A), matyti, kad HEN1 ir SE sąveikauja su tomis pačiomis HYL1 (R^2) ir DCL1 (helikazinis, PAZ) baltymų sritimis. Tai leidžia daryti prielaidą, kad metiltransferazė gali prisijungti prie HYL1•DCL1 komplekso tik po SE atsiskyrimo nuo mikroprocesoriaus komplekso. Remdamiesi gautais duomenimis, manome, kad mikroprocesoriui iškirpus miRNR/miRNR* dupleksą iš jo pirmtakų, SE “perleidžia” savo sąveikos partnerius (HYL1 ir DCL1) metiltransferazei HEN1 susiformuojant HYL1•HEN1•DCL1 kompleksui (4.4 pav. B). Tuomet įvykus dgRNR metilinimui pastarasis kompleksas be ar su metiltransferaze vykdo miRNR/miRNR* duplekso perkėlimą į AGO1 užtikrinant jo kreipiančiosios miRNR grandinės išlikimą besiformuojančiame miRISC komplekse. Šį vėlyvosios augalų miRNR biogenezės stadijos modelį sukūrėme remdamiesi šiais miRNR susidarymo kelio faktais: (i) nėra duomenų, įrodančių SE dalyvavimą miRNR biogenezės kelyje po miRNR/miRNR* duplekso susidarymo. Tuo tarpu parodyta, kad HYL1 dalyvauja po miRNR/miRNR* duplekso metilinimo vykstančiame grandinės, išliekančios miRISC komplekse, pasirinkime, nes, priešingai nei laukinio tipo vaireniuose, *hyl1* augaluose detektuojami lydinčiųjų grandinių kiekio padidėjimai (Eamens et al., 2009; Manavella et al., 2012); (ii) modeliniuose gyvūnų organizmuose nustatyta, kad Dicer šeimos ribonukleazės kompleksai su dgRNR surišančiu baltymu (TRBP arba PACT žmogaus organizme, R2D2 vaisinėse muselėse) yra reikalingi mnkRNR/mnkRNR* perkėlimui į Ago šeimos baltymą (Dueck et Meister, 2014; Liu et al., 2012b;

Noland et Doudna, 2013). Vadinasi, ribonukleazės ir dgRNR surišančio baltymo heterodimeras yra reikalingas ne tik efektyviam ir teisingam mnkRNR/mnkRNR* dupleksų iš jų pirmtakų iškirpimui, bet ir tarnauja platforma subrendusių RISC kompleksų susiformavimui. Fang ir Spector įrodžius, kad HYL1 sąveikauja su AGO1 baltymu (Fang et Spector, 2007), tikėtina, kad augaluose taip pat egzistuoja panašios baltyminės sudėties kompleksas, užtikrinantis miRNR/miRNR* duplekso perkėlimą į AGO1 orientacija palankia kreipiančiosios grandinės išlikimui miRISC. Nors *in vitro* HYL1 nesudaro stabilių kompleksų su dvigrandine mnkRNR (3.26 pav. C), tačiau tikėtina, kad kur kas didesnis stabilumas užtikrinamas DCL1 ir/ar HEN1.



4.4 pav. Mikroprocesoriaus kompleksą sudarančių baltymų ir HEN1 tarpusavio sąveikų tinklas (A) bei nustatytų tarpbaltyminių kontaktų interpretacija paremtas vėlyvosios miRNR biogenezės kelias (B). (A) Linijos sujungia sąveikaujančių baltymų sritis, domenus: juodos, violetinės pažymi iš literatūrinių šaltinių žinomas, žydros – naujai atrastas HEN1 tarpbaltymines sąveikas. R¹, R² – dgRNR surišantys domenai, L – La motyvą turintis domenas, P – į peptidil-prolino *cis-trans* izomerazę panašus domenas, M – metiltransferazinis domenas. (B) Iš DCL1, HYL1 bei SE sudarytam mikroprocesoriaus kompleksui skeliant miRNR pirmtakus – pri-miRNR (neparodyta) ir pre-miRNR – susidaro miRNR/miRNR* dupleksas. Tikėtina, jog po pastarojo iškirpimo mikroprocesoriaus komplekse SE baltymą pakeičia metiltransferazė HEN1, kuriai sąveikaujant su HYL1 ir DCL1 selektyviai metilinama kreipiančioji miRNR grandinė. HEN1•HYL1•DCL1 drauge sudaro ir RISC pakraunantį kompleksą RLC bei nukreipia modifikuotą kreipiančiąją grandinę sąveikai su AGO1 ir funkcionalaus miRISC susidarymui. Juodai pažymėta kreipiančioji grandinė, raudonas rutuliukas jos gale – metilgrupė.

Iki šiol nėra žinoma, ar augalų mnkRNR metiltransferazė modifikuoja miRNR/miRNR* duplekso abi ar tik vieną konkrečią grandinę. Nors *in vitro* šis fermentas katalizuoja abiejų dvigrandinių mnkRNR 3' galinių nukleotidų metilinimą, tačiau manome, kad *in vivo* HYL1•DCL1 kompleksas orientuoja HEN1 taip, kad ši metiltransferazė gali modifikuoti tik kreipiančiąją grandinę. Tuo tarpu lydinčiosios grandinės 3' galinis nukleotidas paslepiamas baltyminiame komplekse ir tokiu būdu apsaugomas nuo metilinimo. *Arabidopsis* aptinkamos tik metilintos, RISC kompleksą su Ago baltymu sudarančios miRNR (Yu et al., 2005). Yra žinoma, kad nemetilintos grandinės uridilinamos HESO1, URT1 ir degraduojamos (Tu et al., 2015). Spėjame, kad HEN1 modifikuojant miRNR/miRNR* duplekso tik kreipiančiąją grandinę, papildoma metilgrupė užtikrina šios grandinės išlikimą formuojantis miRISC, o HESO1 ar URT1 tarsi atlieka "kokybės kontrolę", sudarydama kompleksą su AGO1 ir tikrindama, ar miRISC esanti grandinė turi metilgrupę 3' galinio nt ribozės 2'-O padėtyje. Tikimės, kad ši intriguojanti prielaida bus patikrinta papildomais tyrimais ateityje.

IŠVADOS

1. Mažųjų nekoduojančių RNR (mnkRNR) metiltransferazė HEN1 specifiskai atpažįsta siRNR/siRNR* ir miRNR/miRNR* dupleksus substrato surišimo stadijoje.
2. Nustatytos panašios HEN1 kompleksų su siRNR/siRNR* ir miRNR/miRNR* klasės substratais disociacijos konstantų reikšmės rodo, kad metiltransferazė vienodai gerai suriša pirmine ir antrine struktūra besiskiriančius mnkRNR/mnkRNR* dupleksus.
3. Metiltransferazei HEN1 surišant substratą yra svarbūs kontaktai, susidarantys tarp dvigrandinės mažosios nekoduojančios RNR ir baltymo metiltransferazinio bei dvigrandinę RNR (dgRNR) surišančių domenų R¹ ir R².
4. HEN1 R¹ ir R² domenų indėlis prisijungiant mnkRNR/mnkRNR* dupleksą nėra vienodas. Siūlomas HEN1 sąveikos su mnkRNR/mnkRNR* dupleksu modelis, pagal kurį pirmiausia dgRNR surišantis domenas R¹ sudaro kontaktus su dgRNR, o vėliau R² bei metiltransferazinis domenas stabilizuoja HEN1•mnkRNR/mnkRNR* kompleksą.
5. Metiltransferazė HEN1 sąveikauja su dviem augalų miRNR biogenezėje dalyvaujančiais mikroprocesoriaus komplekso komponentais: dgRNR surišančiu baltymu HYL1 ir trečio tipo ribonukleaze DCL1.
6. HEN1 į peptidil-prolino *cis-trans* izomerazę panašus domenas P, kurio funkcija iki šiol nebuvo žinoma, sąveikauja su HYL1 antru dgRNR surišančiu domenu. Susidarant HEN1•HYL1 kompleksui dalyvauja ir HEN1 R² bei La motyvą turintis L domenas.
7. Ribonukleazės DCL1 helikazinis, Piwi-Argonaute-Zwille ir dgRNR surišantys domenai sąveikauja su HEN1.

8. HEN1 nesąveikauja su trečiu mikroprocesoriaus komplekso baltymu cinko pirštų motyvą turinčiu SERRATE.
9. Siūlomas vėlyvosios *Arabidopsis thaliana* miRNR brendimo stadijos modelis, pagal kurį po miRNR/miRNR* duplekso iškirpimo iš pirmtakų mikroprocesoriaus komplekso SERRATE baltymas yra pakeičiamas metiltransferaze HEN1.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta straipsniuose:

1. **Baranauskė S.***, Mickutė M.*, Plotnikova A., Finke A., Venclovas Č., Klimašauskas S., Vilkaitis G. 2015. Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase: HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins. *Nucleic Acids Res.* 43(5): 2802-12.

* du pirmieji autoriai, abiejų indėlis vienodas.

2. Plotnikova A.*, **Baranauskė S.***, Osipenko A., Klimašauskas S., Vilkaitis G. 2013. Mechanistic insights into small RNA recognition and modification by the HEN1 methyltransferase. *Biochem. J.* 453(2): 281-90.

* du pirmieji autoriai, abiejų indėlis vienodas.

Disertacijoje pateikta medžiaga pristatyta tarptautinėse konferencijose:

1. **Baranauskė S.**, Mickutė M., Klimašauskas S., Vilkaitis G. Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase. "The Non-Coding Genome", Heidelbergas, Vokietija, 2015 10 18-21. Stendinis pranešimas.
2. **Baranauskė S.**, Mickutė M., Plotnikova A., Klimašauskas S., Vilkaitis G. Domain organisation and functional analysis of small RNA methyltransferase HEN1. „40th FEBS Congress“, Berlynas, Vokietija, 2015 07 04-09. Stendinis pranešimas.
3. **Jachimovičiūtė S.**, Plotnikova A., Mickutė M., Osipenko A., Vilkaitis G. Mapping the functional domains of plant HEN1 small RNA methyltransferase. "The 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress“, Sevilija, Ispanija, 2012 09 04-09. Stendinis pranešimas.

4. **Jachimovičiūtė S.**, Plotnikova A., Klimašasukas S., Vilkaitis G. Substrate-interacting domains of the small RNA methyltransferase HEN1. “7th Plant Science Student Conference”, Halė, Vokietija, 2011 06 14-17. Žodinis pranešimas.
5. **Jachimovičiūtė S.**, Plotnikova A., Klimašasukas S., Vilkaitis G. Functional analysis of the small RNA methyltransferase HEN1. COST Action TD09/05 meeting “Epigenetics – Bench to Bedside”, Splitas, Kroatija, 2011 04 28-30. Žodinis pranešimas.
6. **Jachimovičiūtė S.**, Vilkaitis G, Klimašasukas S. Functional Domains of the small RNA Methyltransferase HEN1. CANGENIN training school “High-throughput Screens in Genome Integrity and Cancer”, Oksfordas, Jungtinė Karalystė, 2010 05 24-27. Stendinis pranešimas.

CURRICULUM VITAE

Vardas, Pavardė Simona Baranauskė
Ankstesnė pavardė Jachimovičiūtė

Gimimo data 1984-05-25

Darbo adresas Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas,
DNR modifikacijos tyrimų skyrius
Saulėtekio al. 7,
Vilnius LT-10257,
Lietuva

Telefonas +37067901457

E. pašto adresai simona.jachimoviciute@bti.vu.lt,
sjachimoviciute@yahoo.com

Išsilavinimas ir dabartinės pareigos

2008-2015 Biochemijos doktorantūros studijos,
Vilniaus universiteto Biotechnologijos institutas

2008 Bioinžinerijos magistras,
Vilniaus Gedimino Technikos universitetas

2006 Bioinžinerijos bakalauras,
Vilniaus Gedimino technikos universitetas

Nuo 2012 Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto jaunesnioji
mokslo darbuotoja

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abe, M., Yoshikawa, T., Nosaka, M., Sakakibara, H., Sato, Y., Nagato, Y., Itoh, J. (2010). WAVY LEAF1, an ortholog of Arabidopsis HEN1, regulates shoot development by maintaining MicroRNA and trans-acting small interfering RNA accumulation in rice. *Plant Physiol.* *154*, 1335–1346.
2. Abe, M., Naqvi, A., Hendriks, G.-J., Feltzin, V., Zhu, Y., Grigoriev, A., Bonini, N.M. (2014). Impact of age-associated increase in 2'-O-methylation of miRNAs on aging and neurodegeneration in *Drosophila*. *Genes Dev.* *28*, 44–57.
3. Ameres, S.L., Zamore, P.D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 475–488.
4. Ameres, S.L., Horwich, M.D., Hung, J.-H., Xu, J., Ghildiyal, M., Weng, Z., Zamore, P.D. (2010). Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science* *328*, 1534–1539.
5. Ameres, S.L., Hung, J.-H., Xu, J., Weng, Z., Zamore, P.D. (2011). Target RNA-directed tailing and trimming purifies the sorting of endo-siRNAs between the two *Drosophila* Argonaute proteins. *RNA N. Y. N* *17*, 54–63.
6. Arora, S., Rana, R., Chhabra, A., Jaiswal, A., Rani, V. (2013). miRNA-transcription factor interactions: a combinatorial regulation of gene expression. *Mol. Genet. Genomics MGG* *288*, 77–87.
7. Asgari, S. (2013). MicroRNA functions in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *43*, 388–397.
8. Axtell, M.J. (2013). Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *64*, 137–159.
9. Axtell, M.J., Westholm, J.O., Lai, E.C. (2011). Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol.* *12*, 221.
10. Betancur, J.G., Yoda, M., Tomari, Y. (2012). miRNA-like duplexes as RNAi triggers with improved specificity. *Front. Genet.* *3*, 127.
11. Bhayani, M.K., Calin, G.A., Lai, S.Y. (2012). Functional relevance of miRNA sequences in human disease. *Mutat. Res.* *731*, 14–19.
12. Bologna, N.G., Voinnet, O. (2014). The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Biol.* *65*, 473–503.
13. Bologna, N.G., Schapire, A.L., Palatnik, J.F. (2013). Processing of plant microRNA precursors. *Brief. Funct. Genomics* *12*, 37–45.
14. Borges, F., Martienssen, R.A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 727–741.
15. Boutet, S., Vazquez, F., Liu, J., Béclin, C., Fagard, M., Gratias, A., Morel, J.B., Créte, P., Chen, X., Vaucheret, H. (2003). Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Curr. Biol. CB* *13*, 843–848.
16. Broderick, J.A., Salomon, W.E., Ryder, S.P., Aronin, N., Zamore, P.D. (2011). Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. *RNA N. Y. N* *17*, 1858–1869.
17. Brodersen, P., Voinnet, O. (2009). Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 141–148.
18. Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* *320*, 1185–1190.
19. Bronkhorst, A.W., van Rij, R.P. (2014). The long and short of antiviral defense: small RNA-based immunity in insects. *Curr. Opin. Virol.* *7*, 19–28.

20. Budak, H., Akpinar, B.A. (2015). Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. *Funct. Integr. Genomics* *15*, 523–531.
21. Burdisso, P., Suarez, I.P., Bologna, N.G., Palatnik, J.F., Bersch, B., Rasia, R.M. (2012). Second double-stranded RNA binding domain of dicer-like ribonuclease 1: structural and biochemical characterization. *Biochemistry (Mosc.)* *51*, 10159–10166.
22. Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Gilbert, K.B., Montgomery, T.A., Nguyen, T., Cuperus, J.T., Carrington, J.C. (2012). Functional analysis of three Arabidopsis ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell* *24*, 3613–3629.
23. Cenic, E.S., Zamore, P.D. (2011). Argonaute proteins. *Curr. Biol. CB* *21*, R446–449.
24. Chen, X. (2008). A silencing safeguard: links between RNA silencing and mRNA processing in Arabidopsis. *Dev. Cell* *14*, 811–812.
25. Chen, C.-Y., Liu, X., Boris-Lawrie, K., Sharma, A., Jeang, K.-T. (2013). Cellular RNA helicases and HIV-1: insights from genome-wide, proteomic, and molecular studies. *Virus Res.* *171*, 357–365.
26. Chen, X., Liu, J., Cheng, Y., Jia, D. (2002). HEN1 functions pleiotropically in Arabidopsis development and acts in C function in the flower. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 1085–1094.
27. Cuperus, J.T., Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Burke, R.T., Takeda, A., Sullivan, C.M., Gilbert, S.D., Montgomery, T.A., Carrington, J.C. (2010). Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 997–1003.
28. Curtin, S.J., Watson, J.M., Smith, N.A., Eamens, A.L., Blanchard, C.L., Waterhouse, P.M. (2008). The roles of plant dsRNA-binding proteins in RNAi-like pathways. *FEBS Lett.* *582*, 2753–2760.
29. Czech, B., Hannon, G.J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 19–31.
30. Czech, B., Malone, C.D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J.A., Sachidanandam, R., et al. (2008). An endogenous small interfering RNA pathway in Drosophila. *Nature* *453*, 798–802.
31. Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M., Harrison, R.G. (1999). New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli. *Biotechnol. Bioeng.* *65*, 382–388.
32. Di Leva, G., Garofalo, M., Croce, C.M. (2014). MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* *9*, 287–314.
33. Dlakić, M. (2006). DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *22*, 2711–2714.
34. Dong, H., Lei, J., Ding, L., Wen, Y., Ju, H., Zhang, X. (2013). MicroRNA: function, detection, and bioanalysis. *Chem. Rev.* *113*, 6207–6233.
35. Dong, Z., Han, M.-H., Fedoroff, N. (2008). The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 9970–9975.
36. Doyle, M., Jantsch, M.F. (2002). New and old roles of the double-stranded RNA-binding domain. *J. Struct. Biol.* *140*, 147–153.
37. Doyle, M., Badertscher, L., Jaskiewicz, L., Güttinger, S., Jurado, S., Huguenschmidt, T., Kutay, U., Filipowicz, W. (2013). The double-stranded RNA binding domain of human Dicer functions as a nuclear localization signal. *RNA N. Y. N* *19*, 1238–1252.
38. Dueck, A., Meister, G. (2014). Assembly and function of small RNA - argonaute protein complexes. *Biol. Chem.* *395*, 611–629.
39. Dunoyer, P., Brosnan, C.A., Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., Humber, C., Voinnet, O. (2010). An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J.* *29*, 1699–1712.

40. Eamens, A.L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Wang, M.-B., Waterhouse, P.M. (2009). The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA N. Y. N* 15, 2219–2235.
41. Eamens, A.L., Wook Kim, K., Waterhouse, P.M. (2012a). DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* 7, 1224–1229.
42. Eamens, A.L., Kim, K.W., Curtin, S.J., Waterhouse, P.M. (2012b). DRB2 is required for microRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 7, e35933.
43. Elton, T.S., Yalowich, J.C. (2015). Experimental procedures to identify and validate specific mRNA targets of miRNAs. *EXCLI J.* 14, 758–790.
44. Fang, Y., Spector, D.L. (2007). Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Curr. Biol. CB* 17, 818–823.
45. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
46. Fong, J.H., Shoemaker, B.A., Garbuzynskiy, S.O., Lobanov, M.Y., Galzitskaya, O.V., Panchenko, A.R. (2009). Intrinsic disorder in protein interactions: insights from a comprehensive structural analysis. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000316.
47. Förstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V.V., Denli, A.M., Bratu, D.P., Klattenhoff, C., Theurkauf, W.E., Zamore, P.D. (2005). Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol.* 3, e236.
48. Frank, F., Sonenberg, N., Nagar, B. (2010). Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 465, 818–822.
49. Frank, F., Hauver, J., Sonenberg, N., Nagar, B. (2012). *Arabidopsis* Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *EMBO J.* 31, 3588–3595.
50. Fukudome, A., Kanaya, A., Egami, M., Nakazawa, Y., Hiraguri, A., Moriyama, H., Fukuhara, T. (2011). Specific requirement of DRB4, a dsRNA-binding protein, for the in vitro dsRNA-cleaving activity of *Arabidopsis* Dicer-like 4. *RNA N. Y. N* 17, 750–760.
51. Fukunaga, R., Zamore, P.D. (2014). A universal small molecule, inorganic phosphate, restricts the substrate specificity of Dicer-2 in small RNA biogenesis. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 1671–1676.
52. Fukunaga, R., Han, B.W., Hung, J.-H., Xu, J., Weng, Z., Zamore, P.D. (2012). Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals. *Cell* 151, 533–546.
53. Gammon, D.B., Mello, C.C. (2015). RNA interference-mediated antiviral defense in insects. *Curr. Opin. Insect Sci.* 8, 111–120.
54. Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M.D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E.L.W., Zapp, M.L., Weng, Z., et al. (2008). Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science* 320, 1077–1081.
55. Ghildiyal, M., Xu, J., Seitz, H., Weng, Z., Zamore, P.D. (2010). Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *RNA N. Y. N* 16, 43–56.
56. Golemis, E. A., Serebriiskii, I., Finley, R.L., Kolonin, M.G., Gyuris, J., Brent, R. (2011). Interaction trap/two-hybrid system to identify interacting proteins. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Editor. Board Juan Bonifacino A1 Chapter 17, Unit 17.3.
57. Gollan, P.J., Bhave, M., Aro, E.-M. (2012). The FKBP families of higher plants: Exploring the structures and functions of protein interaction specialists. *FEBS Lett.* 586, 3539–3547.

58. Gredell, J.A., Dittmer, M.J., Wu, M., Chan, C., Walton, S.P. (2010). Recognition of siRNA asymmetry by TAR RNA binding protein. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 3148–3155.
59. Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631–640.
60. Gruber, J.J., Zatechka, D.S., Sabin, L.R., Yong, J., Lum, J.J., Kong, M., Zong, W.-X., Zhang, Z., Lau, C.-K., Rawlings, J., et al. (2009). Ars2 links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation. *Cell* 138, 328–339.
61. Gu, S., Jin, L., Huang, Y., Zhang, F., Kay, M.A. (2012). Slicing-independent RISC activation requires the argonaute PAZ domain. *Curr. Biol. CB* 22, 1536–1542.
62. Gunawardane, L.S., Saito, K., Nishida, K.M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., Siomi, M.C. (2007). A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* 315, 1587–1590.
63. Guo, F., Tamanoi, F. (2012). In *The Enzymes. Eukaryotic RNases and their Partners in RNA Degradation and Biogenesis* (Academic Press), 32, 1–229.
64. Guo, W., Liew, J.Y., Yuan, Y.A. (2014). Structural insights into the arms race between host and virus along RNA silencing pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 89, 337–355.
65. Ha, M., Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 509–524.
66. Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950–952.
67. Han, B.W., Zamore, P.D. (2014). piRNAs. *Curr. Biol. CB* 24, R730-733.
68. Hartig, J.V., Förstemann, K. (2011). Loqs-PD and R2D2 define independent pathways for RISC generation in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 39, 3836–3851.
69. He, L., Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 522–531.
70. Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J., Jacobsen, S.E. (2006). Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat. Genet.* 38, 721–725.
71. Heyam, A., Lagos, D., Plevin, M. (2015). Dissecting the roles of TRBP and PACT in double-stranded RNA recognition and processing of noncoding RNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 6, 271–289.
72. Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K., Fukuhara, T. (2005). Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 57, 173–188.
73. Hirose, T., Mishima, Y., Tomari, Y. (2014). Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy. *EMBO Rep.* 15, 489–507.
74. Horwich, M.D., Li, C., Matranga, C., Vagin, V., Farley, G., Wang, P., Zamore, P.D. (2007). The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr. Biol. CB* 17, 1265–1272.
75. Huang, R.H. (2012). Unique 2'-O-methylation by Hen1 in eukaryotic RNA interference and bacterial RNA repair. *Biochemistry (Mosc.)* 51, 4087–4095.
76. Huang, Y., Ji, L., Huang, Q., Vassilyev, D.G., Chen, X., Ma, J.-B. (2009). Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature* 461, 823–827.
77. Huang, Y., Zhang, J.L., Yu, X.L., Xu, T.S., Wang, Z.B., Cheng, X.C. (2013). Molecular functions of small regulatory noncoding RNA. *Biochem. Biokhimiia* 78, 221–230.

78. Huntzinger, E., Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 99–110.
79. Ibrahim, F., Rymarquis, L.A., Kim, E.-J., Becker, J., Balassa, E., Green, P.J., Cerutti, H. (2010). Uridylation of mature miRNAs and siRNAs by the MUT68 nucleotidyltransferase promotes their degradation in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 3906–3911.
80. Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M.C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhashi, I., Meshi, T., Ishikawa, M. (2010). In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol. Cell* *39*, 282–291.
81. Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* *96*, 23–28.
82. Iwakawa, H., Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol.* *25*, 651–665.
83. Iwasaki, S., Sasaki, H.M., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Tadakuma, H., Tomari, Y. (2015). Defining fundamental steps in the assembly of the *Drosophila* RNAi enzyme complex. *Nature* *521*, 533–536.
84. Iwata, Y., Takahashi, M., Fedoroff, N.V., Hamdan, S.M. (2013). Dissecting the interactions of SERRATE with RNA and DICER-LIKE 1 in *Arabidopsis* microRNA precursor processing. *Nucleic Acids Res.* *41*, 9129–9140.
85. Ji, L., Chen, X. (2012). Regulation of small RNA stability: methylation and beyond. *Cell Res.* *22*, 624–636.
86. Johanson, T.M., Lew, A.M., Chong, M.M.W. (2013). MicroRNA-independent roles of the RNase III enzymes Drossha and Dicer. *Open Biol.* *3*, 130144.
87. Jonas, S., Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* *16*, 421–433.
88. Kai, Z.S., Pasquinelli, A.E. (2010). MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 5–10.
89. Kamminga, L.M., Luteijn, M.J., den Broeder, M.J., Redl, S., Kaaij, L.J.T., Roovers, E.F., Ladurner, P., Berezikov, E., Ketting, R.F. (2010). Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in zebrafish. *EMBO J.* *29*, 3688–3700.
90. Kamminga, L.M., van Wolfswinkel, J.C., Luteijn, M.J., Kaaij, L.J.T., Bagijn, M.P., Sapetschnig, A., Miska, E.A., Berezikov, E., Ketting, R.F. (2012). Differential impact of the HEN1 homolog HENN-1 on 21U and 26G RNAs in the germline of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* *8*, e1002702.
91. Kang, C.B., Hong, Y., Dhe-Paganon, S., Yoon, H.S. (2008). FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals* *16*, 318–325.
92. Katiyar-Agarwal, S., Jin, H. (2010). Role of small RNAs in host-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* *48*, 225–246.
93. Kawamata, T., Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 368–376.
94. Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* *115*, 209–216.
95. Kim, Y., Kim, V.N. (2012). MicroRNA factory: RISC assembly from precursor microRNAs. *Mol. Cell* *46*, 384–386.
96. Kim, V.N., Han, J., Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 126–139.
97. Kim, Y.J., Maizel, A., Chen, X. (2014). Traffic into silence: endomembranes and post-transcriptional RNA silencing. *EMBO J.* *33*, 968–980.
98. Kim, Y.-K., Heo, I., Kim, V.N. (2010). Modifications of small RNAs and their associated proteins. *Cell* *143*, 703–709.

99. Kobayashi, H., Tomari, Y. (2016). RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 71–81.
100. Koh, H.R., Kidwell, M.A., Raganathan, K., Doudna, J.A., Myong, S. (2013). ATP-independent diffusion of double-stranded RNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 151–156.
101. Kok, K.H., Ng, M.-H.J., Ching, Y.-P., Jin, D.-Y. (2007). Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *J. Biol. Chem.* 282, 17649–17657.
102. Kuhn, C.-D., Joshua-Tor, L. (2013). Eukaryotic Argonautes come into focus. *Trends Biochem. Sci.* 38, 263–271.
103. Kurihara, Y., Takashi, Y., Watanabe, Y. (2006). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA N. Y. N* 12, 206–212.
104. Kurth, H.M., Mochizuki, K. (2009). 2'-O-methylation stabilizes Piwi-associated small RNAs and ensures DNA elimination in *Tetrahymena*. *RNA N. Y. N* 15, 675–685.
105. Kushnirov, V.V. (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast Chichester Engl.* 16, 857–860.
106. Kwak, P.B., Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 145–151.
107. Laraki, G., Clerzius, G., Daher, A., Melendez-Peña, C., Daniels, S., Gagnon, A. (2008). Interactions between the double-stranded RNA-binding proteins TRBP and PACT define the Medipal domain that mediates protein-protein interactions. *RNA Biol.* 5, 92–103.
108. Lau, P.-W., Guiley, K.Z., De, N., Potter, C.S., Carragher, B., MacRae, I.J. (2012). The molecular architecture of human Dicer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 436–440.
109. Lee, H.Y., Doudna, J.A. (2012). TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA N. Y. N* 18, 2012–2019.
110. Lee, H.Y., Zhou, K., Smith, A.M., Noland, C.L., Doudna, J.A. (2013). Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Res.* 41, 6568–6576.
111. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
112. Lee, Y., Hur, I., Park, S.-Y., Kim, Y.-K., Suh, M.R., Kim, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 25, 522–532.
113. Li, C., Zhang, B. (2016). MicroRNAs in Control of Plant Development. *J. Cell. Physiol.* 231, 303–313.
114. Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., Chen, X. (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr. Biol. CB* 15, 1501–1507.
115. Li, J., Tan, S., Kooger, R., Zhang, C., Zhang, Y. (2014). MicroRNAs as novel biological targets for detection and regulation. *Chem. Soc. Rev.* 43, 506–517.
116. Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.-E., Smith, D.P., Wang, X. (2003). R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 301, 1921–1925.
117. Liu, Q., Shi, L., Fang, Y. (2012a). Dicing bodies. *Plant Physiol.* 158, 61–66.
118. Liu, Q., Yan, Q., Liu, Y., Hong, F., Sun, Z., Shi, L., Huang, Y., Fang, Y. (2013). Complementation of HYPONASTIC LEAVES1 by double-strand RNA-binding domains of DICER-LIKE1 in nuclear dicing bodies. *Plant Physiol.* 163, 108–117.
119. Liu, X., Jiang, F., Kalidas, S., Smith, D., Liu, Q. (2006). Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes. *RNA N. Y. N* 12, 1514–1520.

120. Liu, X., Jin, D.-Y., McManus, M.T., Mourelatos, Z. (2012b). Precursor microRNA-programmed silencing complex assembly pathways in mammals. *Mol. Cell* *46*, 507–517.
121. Liu, Y.-X., Wang, M., Wang, X.-J. (2014). Endogenous small RNA clusters in plants. *Genomics Proteomics Bioinformatics* *12*, 64–71.
122. Lucas, K., Raikhel, A.S. (2013). Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *43*, 24–38.
123. Luo, D., Kohlway, A., Pyle, A.M. (2013). Duplex RNA activated ATPases (DRAs): platforms for RNA sensing, signaling and processing. *RNA Biol.* *10*, 111–120.
124. Luteijn, M.J., Ketting, R.F. (2013). PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 523–534.
125. Ma, E., MacRae, I.J., Kirsch, J.F., Doudna, J.A. (2008). Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J. Mol. Biol.* *380*, 237–243.
126. Ma, E., Zhou, K., Kidwell, M.A., Doudna, J.A. (2012). Coordinated activities of human dicer domains in regulatory RNA processing. *J. Mol. Biol.* *422*, 466–476.
127. Machida, S., Yuan, Y.A. (2013). Crystal structure of Arabidopsis thaliana Dwdle forkhead-associated domain reveals a conserved phospho-threonine recognition cleft for dicer-like 1 binding. *Mol. Plant* *6*, 1290–1300.
128. Machida, S., Chen, H.-Y., Adam Yuan, Y. (2011). Molecular insights into miRNA processing by Arabidopsis thaliana SERRATE. *Nucleic Acids Res.* *39*, 7828–7836.
129. Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., Doudna, J.A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* *311*, 195–198.
130. Manavella, P.A., Hagmann, J., Ott, F., Laubinger, S., Franz, M., Macek, B., Weigel, D. (2012). Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. *Cell* *151*, 859–870.
131. Maniataki, E., Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev.* *19*, 2979–2990.
132. Masliah, G., Barraud, P., Allain, F.H.-T. (2013). RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 1875–1895.
133. Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., et al. (2008). Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* *133*, 116–127.
134. Miyoshi, K., Miyoshi, T., Hartig, J.V., Siomi, H., Siomi, M.C. (2010). Molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and microRNA biogenesis pathways in Drosophila. *RNA N. Y. N* *16*, 506–515.
135. Mlotshwa, S., Schauer, S.E., Smith, T.H., Mallory, A.C., Herr, J.M., Roth, B., Merchant, D.S., Ray, A., Bowman, L.H., Vance, V.B. (2005). Ectopic DICER-LIKE1 expression in P1/HC-Pro Arabidopsis rescues phenotypic anomalies but not defects in microRNA and silencing pathways. *Plant Cell.* *17*, 2873–2885.
136. Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Vance, V. (2008). Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends Plant Sci.* *13*, 375–382.
137. Molnár, A., Schwach, F., Studholme, D.J., Thuenemann, E.C., Baulcombe, D.C. (2007). miRNAs control gene expression in the single-cell alga Chlamydomonas reinhardtii. *Nature* *447*, 1126–1129.
138. Moran, Y., Praher, D., Fredman, D., Technau, U. (2013). The evolution of microRNA pathway protein components in Cnidaria. *Mol. Biol. Evol.* *30*, 2541–2552.
139. Morris, K.V., Mattick, J.S. (2014). The rise of regulatory RNA. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 423–437.

140. Mui Chan, C., Zhou, C., Brunzelle, J.S., Huang, R.H. (2009). Structural and biochemical insights into 2'-O-methylation at the 3'-terminal nucleotide of RNA by Hen1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17699–17704.
141. Nicholson, A.W. (2014). Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *5*, 31–48.
142. Nishida, K.M., Miyoshi, K., Ogino, A., Miyoshi, T., Siomi, H., Siomi, M.C. (2013). Roles of R2D2, a cytoplasmic D2 body component, in the endogenous siRNA pathway in *Drosophila*. *Mol. Cell* *49*, 680–691.
143. Noland, C.L., Doudna, J.A. (2013). Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways. *RNA N. Y. N* *19*, 639–648.
144. Noland, C.L., Ma, E., Doudna, J.A. (2011). siRNA repositioning for guide strand selection by human Dicer complexes. *Mol. Cell* *43*, 110–121.
145. Okamura, K., Robine, N., Liu, Y., Liu, Q., Lai, E.C. (2011). R2D2 organizes small regulatory RNA pathways in *Drosophila*. *Mol. Cell Biol.* *31*, 884–896.
146. Pantaleo, V. (2011). Plant RNA silencing in viral defence. *Adv. Exp. Med. Biol.* *722*, 39–58.
147. Park, J.-E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D.K., Chang, H., Jee, D., Patel, D.J., Kim, V.N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* *475*, 201–205.
148. Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol. CB* *12*, 1484–1495.
149. Patil, V.S., Zhou, R., Rana, T.M. (2014). Gene regulation by non-coding RNAs. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *49*, 16–32.
150. Péliissier, T., Clavel, M., Chaparro, C., Pouch-Péliissier, M.-N., Vaucheret, H., Deragon, J.-M. (2011). Double-stranded RNA binding proteins DRB2 and DRB4 have an antagonistic impact on polymerase IV-dependent siRNA levels in *Arabidopsis*. *RNA N. Y. N* *17*, 1502–1510.
151. Plotnikova, A., Baranauskė, S., Osipenko, A., Klimašauskas, S., Vilkaitis, G. (2013). Mechanistic insights into small RNA recognition and modification by the HEN1 methyltransferase. *Biochem. J.* *453*, 281–290.
152. Pooggin, M.M. (2013). How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 15233–15259.
153. Prigge, M.J., Wagner, D.R. (2001). The *Arabidopsis* serrate gene encodes a zinc-finger protein required for normal shoot development. *Plant Cell* *13*, 1263–1279.
154. Pumplin, N., Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 745–760.
155. Pyle, A.M. (2008). Translocation and unwinding mechanisms of RNA and DNA helicases. *Annu. Rev. Biophys.* *37*, 317–336.
156. Qin, H., Chen, F., Huan, X., Machida, S., Song, J., Yuan, Y.A. (2010). Structure of the *Arabidopsis thaliana* DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein-protein interaction. *RNA N. Y. N* *16*, 474–481.
157. Quick-Cleveland, J., Jacob, J.P., Weitz, S.H., Shoffner, G., Senturia, R., Guo, F. (2014). The DGCR8 RNA-binding heme domain recognizes primary microRNAs by clamping the hairpin. *Cell Rep.* *7*, 1994–2005.
158. Raczynska, K.D., Stepien, A., Kierzkowski, D., Kalak, M., Bajczyk, M., McNicol, J., Simpson, C.G., Szweykowska-Kulinska, Z., Brown, J.W.S., Jarmolowski, A. (2014). The SERRATE protein is involved in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* *42*, 1224–1244.
159. Ramachandran, V., Chen, X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in *Arabidopsis*. *Science* *321*, 1490–1492.

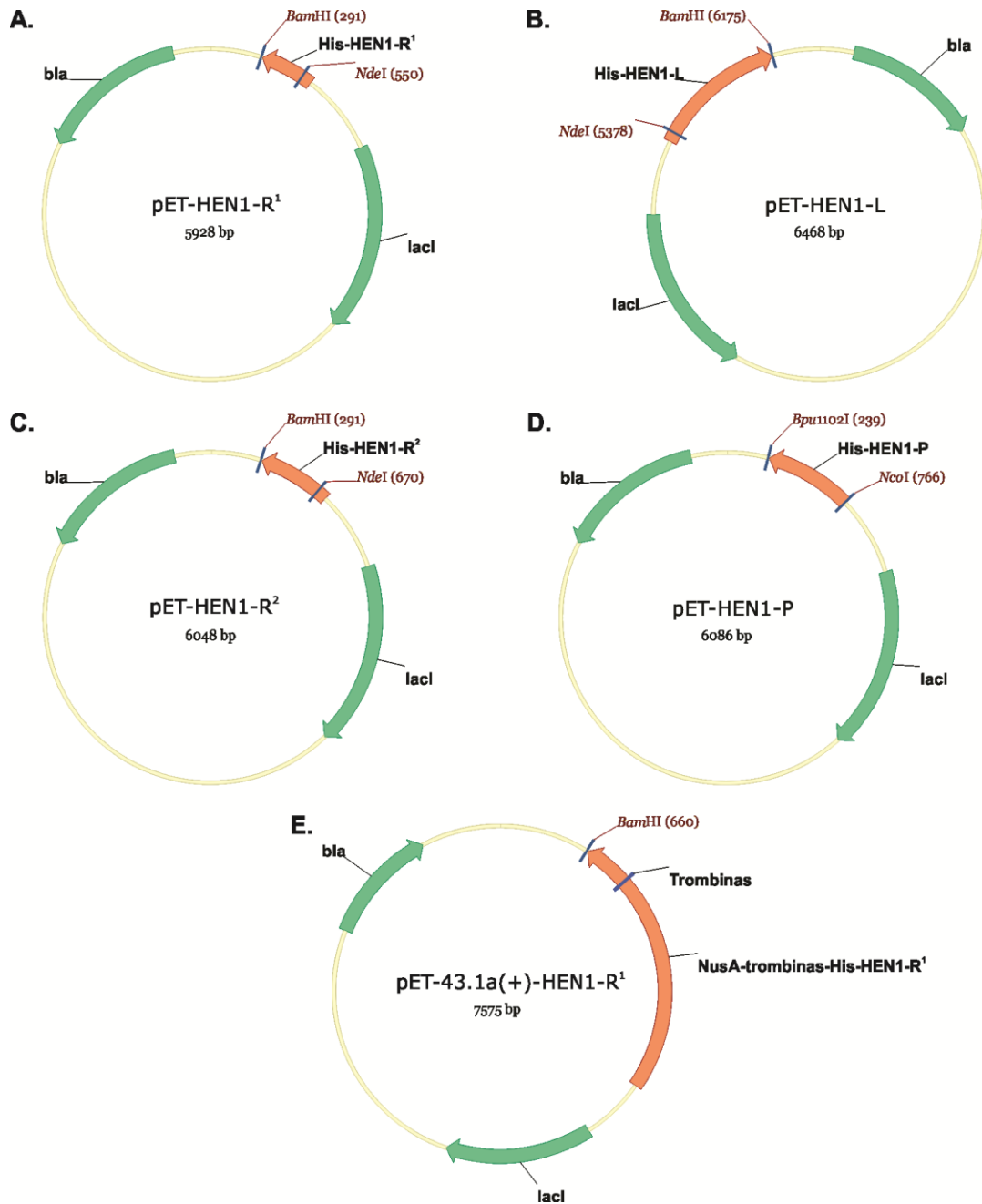
160. Rasia, R.M., Mateos, J., Bologna, N.G., Burdisso, P., Imbert, L., Palatnik, J.F., Boisbouvier, J. (2010). Structure and RNA interactions of the plant MicroRNA processing-associated protein HYL1. *Biochemistry (Mosc.)* *49*, 8237–8239.
161. Ren, G., Yu, B. (2012). Critical roles of RNA-binding proteins in miRNA biogenesis in Arabidopsis. *RNA Biol.* *9*, 1424–1428.
162. Ren, G., Xie, M., Dou, Y., Zhang, S., Zhang, C., Yu, B. (2012). Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 12817–12821.
163. Ren, G., Xie, M., Zhang, S., Vinovskis, C., Chen, X., Yu, B. (2014). Methylation protects microRNAs from an AGO1-associated activity that uridylates 5' RNA fragments generated by AGO1 cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 6365–6370.
164. van Rij, R.P., Berezikov, E. (2009). Small RNAs and the control of transposons and viruses in Drosophila. *Trends Microbiol.* *17*, 163–171.
165. Rogers, K., Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell* *25*, 2383–2399.
166. Romero-Cordoba, S.L., Salido-Guadarrama, I., Rodriguez-Dorantes, M., Hidalgo-Miranda, A. (2014). miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol. Ther.* *15*, 1444–1455.
167. Rytter, J.M., Schultz, S.C. (1998). Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J.* *17*, 7505–7513.
168. Sabin, L.R., Zhou, R., Gruber, J.J., Lukinova, N., Bambina, S., Berman, A., Lau, C.-K., Thompson, C.B., Cherry, S. (2009). Ars2 regulates both miRNA- and siRNA-dependent silencing and suppresses RNA virus infection in Drosophila. *Cell* *138*, 340–351.
169. Saito, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Siomi, H., Siomi, M.C. (2007). Pimet, the Drosophila homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev.* *21*, 1603–1608.
170. Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (CSHL Press).
171. Sanei, M., Chen, X. (2015). Mechanisms of microRNA turnover. *Curr. Opin. Plant Biol.* *27*, 199–206.
172. Santosh, B., Varshney, A., Yadava, P.K. (2015). Non-coding RNAs: biological functions and applications. *Cell Biochem. Funct.* *33*, 14–22.
173. Sashital, D.G., Doudna, J.A. (2010). Structural insights into RNA interference. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *20*, 90–97.
174. Sato, K., Siomi, M.C. (2013). Piwi-interacting RNAs: biological functions and biogenesis. *Essays Biochem.* *54*, 39–52.
175. Schubert, H.L., Blumenthal, R.M., Cheng, X. (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 329–335.
176. Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199–208.
177. Scott, D.D., Norbury, C.J. (2013). RNA decay via 3' uridylation. *Biochim. Biophys. Acta* *1829*, 654–665.
178. Senturia, R., Laganowsky, A., Barr, I., Scheidemantle, B.D., Guo, F. (2012). Dimerization and heme binding are conserved in amphibian and starfish homologues of the microRNA processing protein DGCR8. *PLoS One* *7*, e39688.
179. Smith, P., Wang, L.K., Nair, P.A., Shuman, S. (2012). The adenylyltransferase domain of bacterial Pnkp defines a unique RNA ligase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 2296–2301.
180. Soares, Z.G., Gonçalves, A.N.A., de Oliveira, K.P.V., Marques, J.T. (2014). Viral RNA recognition by the Drosophila small interfering RNA pathway. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* *16*, 1013–1021.

181. Stroynowska-Czerwinska, A., Fiszer, A., Krzyzosiak, W.J. (2014). The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *71*, 2253–2270.
182. Sun, G. (2012). MicroRNAs and their diverse functions in plants. *Plant Mol. Biol.* *80*, 17–36.
183. Svoboda, P. (2014). Renaissance of mammalian endogenous RNAi. *FEBS Lett.* *588*, 2550–2556.
184. Takahashi, T., Miyakawa, T., Zenno, S., Nishi, K., Tanokura, M., Ui-Tei, K. (2013). Distinguishable in vitro binding mode of monomeric TRBP and dimeric PACT with siRNA. *PLoS One* *8*, e63434.
185. Tanner, N.K., Linder, P. (2001). DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell* *8*, 251–262.
186. Taylor, D.W., Ma, E., Shigematsu, H., Cianfrocco, M.A., Noland, C.L., Nagayama, K., Nogales, E., Doudna, J.A., Wang, H.-W. (2013). Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 662–670.
187. Tétreault, N., De Guire, V. (2013). miRNAs: their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clin. Biochem.* *46*, 842–845.
188. Thieme, C.J., Schudoma, C., May, P., Walther, D. (2012). Give It AGO: The Search for miRNA-Argonaute Sorting Signals in *Arabidopsis thaliana* Indicates a Relevance of Sequence Positions Other than the 5'-Position Alone. *Front. Plant Sci.* *3*, 272.
189. Tian, Y., Simanshu, D.K., Ma, J.-B., Park, J.-E., Heo, I., Kim, V.N., Patel, D.J. (2014). A phosphate-binding pocket within the platform-PAZ-connector helix cassette of human Dicer. *Mol. Cell* *53*, 606–616.
190. Tkaczuk, K.L., Obarska, A., Bujnicki, J.M. (2006). Molecular phylogenetics and comparative modeling of HEN1, a methyltransferase involved in plant microRNA biogenesis. *BMC Evol. Biol.* *6*, 6.
191. Tomari, Y., Du, T., Zamore, P.D. (2007). Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* *130*, 299–308.
192. Tsutsumi, A., Kawamata, T., Izumi, N., Seitz, H., Tomari, Y. (2011). Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila* Dicer-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1153–1158.
193. Tu, B., Liu, L., Xu, C., Zhai, J., Li, S., Lopez, M.A., Zhao, Y., Yu, Y., Ramachandran, V., Ren, G., et al. (2015). Distinct and cooperative activities of HESO1 and URT1 nucleotidyl transferases in microRNA turnover in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* *11*, e1005119.
194. Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R., Kazemzadeh-Bavili, M. (2014). Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int. J. Genomics* *2014*, 970607.
195. Vasudevan, D., Gopalan, G., Kumar, A., Garcia, V.J., Luan, S., Swaminathan, K. (2015). Plant immunophilins: a review of their structure-function relationship. *Biochim. Biophys. Acta* *1850*, 2145–2158.
196. Vilkaitis, G., Plotnikova, A., Klimasauskas, S. (2010). Kinetic and functional analysis of the small RNA methyltransferase HEN1: the catalytic domain is essential for preferential modification of duplex RNA. *RNA N. Y. N* *16*, 1935–1942.
197. Wang, L., Song, X., Gu, L., Li, X., Cao, S., Chu, C., Cui, X., Chen, X., Cao, X. (2013a). NOT2 proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple MicroRNA biogenesis factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *25*, 715–727.
198. Wang, L.K., Smith, P., Shuman, S. (2013b). Structure and mechanism of the 2',3' phosphatase component of the bacterial Pnkp-Hen1 RNA repair system. *Nucleic Acids Res.* *41*, 5864–5873.
199. Wang, P., Chan, C.M., Christensen, D., Zhang, C., Selvadurai, K., Huang, R.H. (2012). Molecular basis of bacterial protein Hen1 activating the ligase activity of

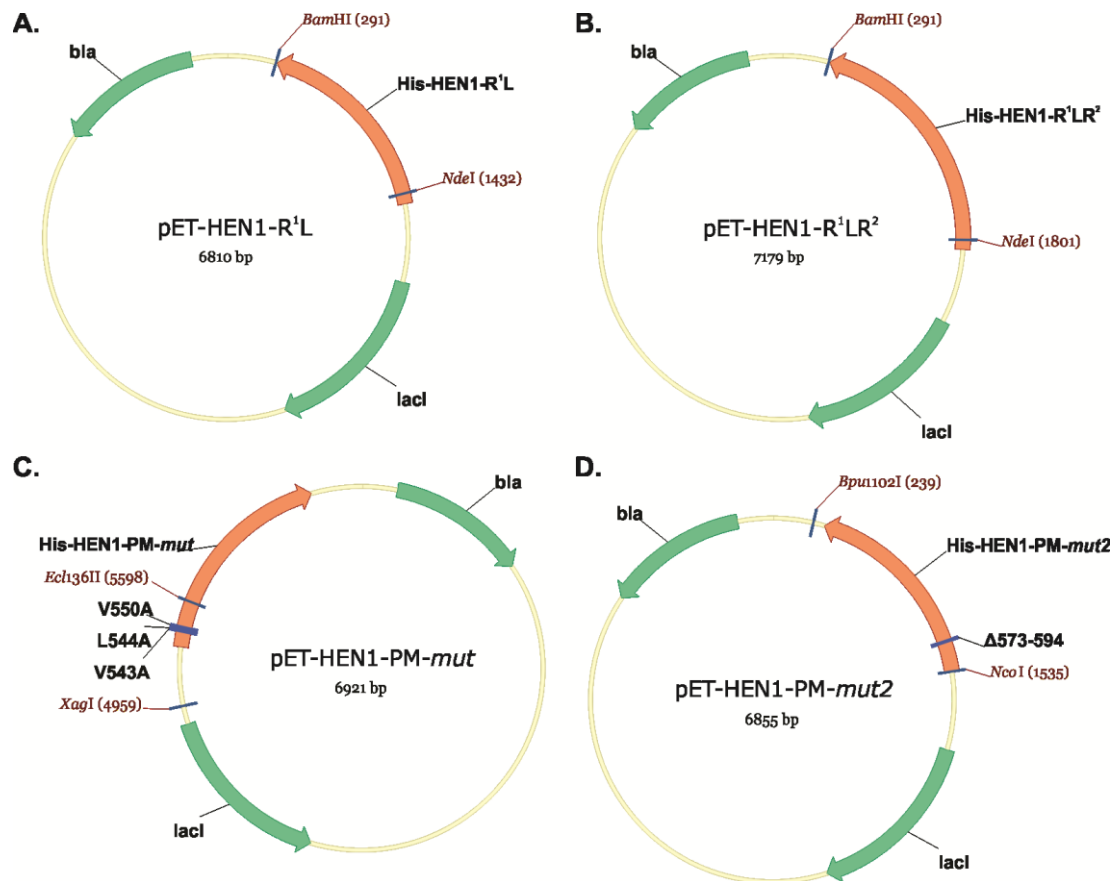
- bacterial protein Pnkp for RNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 13248–13253.
200. Wang, X., Zhang, S., Dou, Y., Zhang, C., Chen, X., Yu, B., Ren, G. (2015). Synergistic and independent actions of multiple terminal nucleotidyl transferases in the 3' tailing of small RNAs in Arabidopsis. *PLoS Genet.* *11*, e1005091.
201. Wilson, R.C., Tambe, A., Kidwell, M.A., Noland, C.L., Schneider, C.P., Doudna, J.A. (2015). Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol. Cell* *57*, 397–407.
202. Wostenberg, C., Lary, J.W., Sahu, D., Acevedo, R., Quarles, K.A., Cole, J.L., Showalter, S.A. (2012). The role of human Dicer-dsRBD in processing small regulatory RNAs. *PLoS One* *7*, e51829.
203. Wright, P.E., Dyson, H.J. (2009). Linking folding and binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *19*, 31–38.
204. Wu, F., Yu, L., Cao, W., Mao, Y., Liu, Z., He, Y. (2007). The N-terminal double-stranded RNA binding domains of Arabidopsis HYPONASTIC LEAVES1 are sufficient for pre-microRNA processing. *Plant Cell* *19*, 914–925.
205. Wu, L., Mao, L., Qi, Y. (2012). Roles of dicer-like and argonaute proteins in TAS-derived small interfering RNA-triggered DNA methylation. *Plant Physiol.* *160*, 990–999.
206. Xie, Z., Qi, X. (2008). Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim. Biophys. Acta* *1779*, 720–724.
207. Xie, M., Zhang, S., Yu, B. (2015). microRNA biogenesis, degradation and activity in plants. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *72*, 87–99.
208. Yamashita, S., Nagata, T., Kawazoe, M., Takemoto, C., Kigawa, T., Güntert, P., Kobayashi, N., Terada, T., Shirouzu, M., Wakiyama, M., et al. (2011). Structures of the first and second double-stranded RNA-binding domains of human TAR RNA-binding protein. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *20*, 118–130.
209. Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A., Huang, H. (2006a). SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *47*, 841–850.
210. Yang, S.W., Chen, H.-Y., Yang, J., Machida, S., Chua, N.-H., Yuan, Y.A. (2010). Structure of Arabidopsis HYPONASTIC LEAVES1 and its molecular implications for miRNA processing. *Struct. Lond. Engl.* *18*, 594–605.
211. Yang, X., Ren, W., Zhao, Q., Zhang, P., Wu, F., He, Y. (2014). Homodimerization of HYL1 ensures the correct selection of cleavage sites in primary miRNA. *Nucleic Acids Res.* *42*, 12224–12236.
212. Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B., Chen, X. (2006b). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res.* *34*, 667–675.
213. Ye, X., Paroo, Z., Liu, Q. (2007). Functional anatomy of the Drosophila microRNA-generating enzyme. *J. Biol. Chem.* *282*, 28373–28378.
214. Yeom, K.-H., Lee, Y., Han, J., Suh, M.R., Kim, V.N. (2006). Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res.* *34*, 4622–4629.
215. Younis, A., Siddique, M.I., Kim, C.-K., Lim, K.-B. (2014). RNA Interference (RNAi) Induced Gene Silencing: A Promising Approach of Hi-Tech Plant Breeding. *Int. J. Biol. Sci.* *10*, 1150–1158.
216. Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* *307*, 932–935.
217. Yu, B., Bi, L., Zheng, B., Ji, L., Chevalier, D., Agarwal, M., Ramachandran, V., Li, W., Lagrange, T., Walker, J.C., et al. (2008). The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 10073–10078.

218. Yu, B., Bi, L., Zhai, J., Agarwal, M., Li, S., Wu, Q., Ding, S.-W., Meyers, B.C., Vaucheret, H., Chen, X. (2010). siRNAs compete with miRNAs for methylation by HEN1 in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 38, 5844–5850.
219. Zaratiegui, M. (2015). Molecular biology: RNA interference hangs by a thread. *Nature* 520, 162–164.
220. Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57–68.
221. Zhang, X., Xia, J., Lii, Y.E., Barrera-Figueroa, B.E., Zhou, X., Gao, S., Lu, L., Niu, D., Chen, Z., Leung, C., et al. (2012). Genome-wide analysis of plant nat-siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. *Genome Biol.* 13, R20.
222. Zhang, X., Lii, Y., Wu, Z., Polishko, A., Zhang, H., Chinnusamy, V., Lonardi, S., Zhu, J.-K., Liu, R., Jin, H. (2013). Mechanisms of small RNA generation from cis-NATs in response to environmental and developmental cues. *Mol. Plant* 6, 704–715.
223. Zhao, Y., Mo, B., Chen, X. (2012a). Mechanisms that impact microRNA stability in plants. *RNA Biol.* 9, 1218–1223.
224. Zhao, Y., Yu, Y., Zhai, J., Ramachandran, V., Dinh, T.T., Meyers, B.C., Mo, B., Chen, X. (2012b). The Arabidopsis nucleotidyl transferase HESO1 uridylyates unmethylated small RNAs to trigger their degradation. *Curr. Biol. CB* 22, 689–694.
225. Zhou, R., Rana, T.M. (2013). RNA-based mechanisms regulating host-virus interactions. *Immunol. Rev.* 253, 97–111.
226. Zhu, H., Zhou, Y., Castillo-González, C., Lu, A., Ge, C., Zhao, Y.-T., Duan, L., Li, Z., Axtell, M.J., Wang, X.-J., et al. (2013). Bidirectional processing of pri-miRNAs with branched terminal loops by Arabidopsis Dicer-like1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1106–1115.

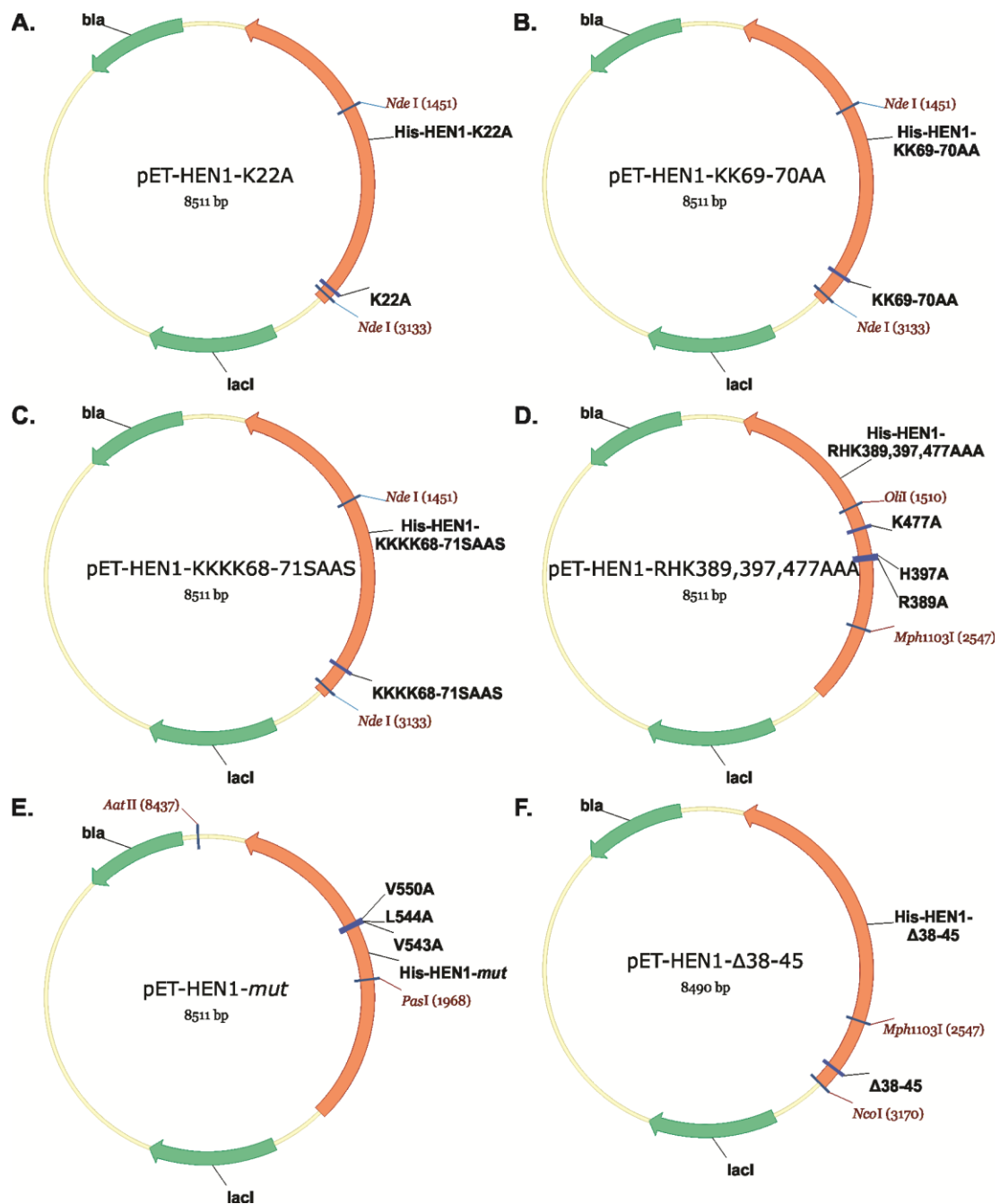
PRIEDAI



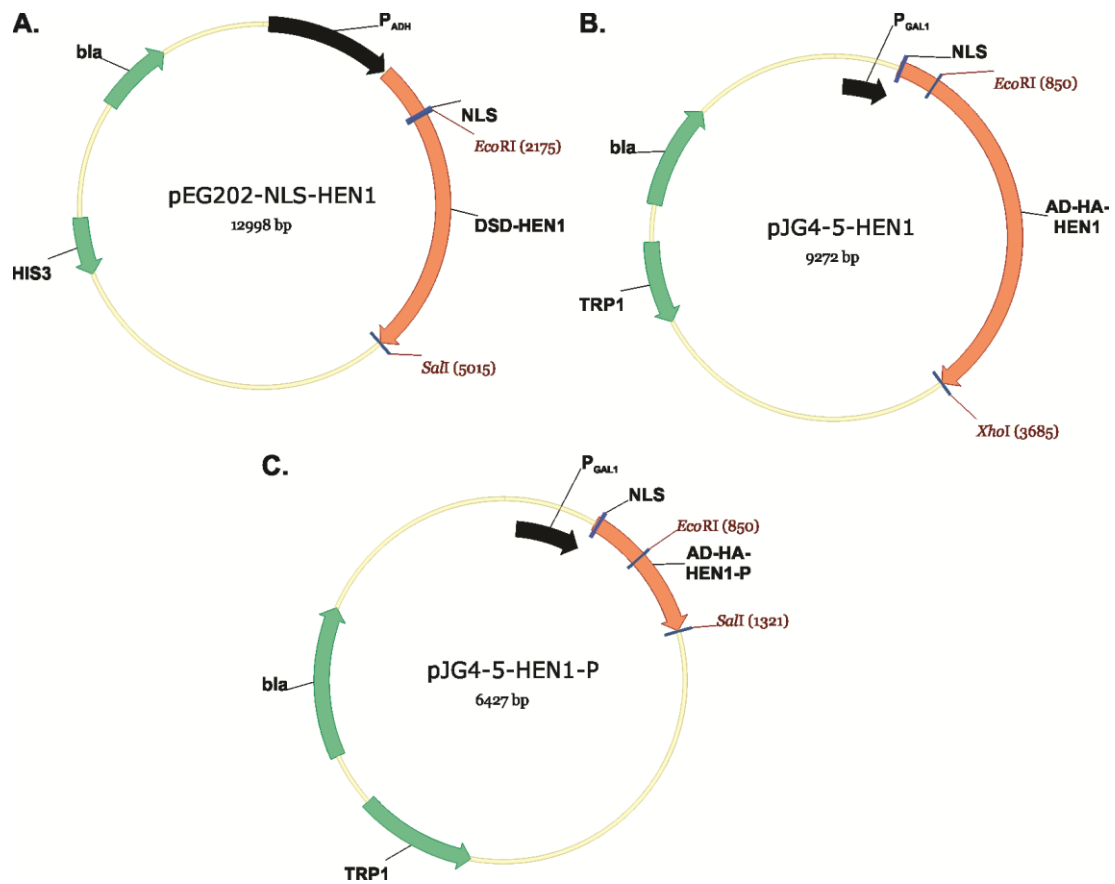
P1. Sukonstruotų pET-HEN1-R¹ (A), pET-HEN1-L (B), pET-HEN1-R² (C), pET-HEN1-P (D) ir pET-43.1a(+)-HEN1-R¹ (E) plazmidžių schemas. Atitinkamai (A), (B), (C), (D) plazmidės koduoja HEN1-R¹, HEN1-L, HEN1-R², HEN1-P baltymus N gale sulietus su šešių histidino ar. inkarų turinčiu dvidešimties aminorūgščių polipeptidu, o (E) plazmidė – NusA-HEN1-R¹ baltymą, tiksliau, HEN1-R¹ baltymą N gale sulietą su NusA baltymu, trombino proteazės atpažinimo seka bei pastaruoju 20 ar. polipeptidu. Trombinas – trombino proteazės atpažįstamą seką koduojantis DNR fragmentas; bla – genas, koduojantis β-laktamazę, lemiantis *E. coli* atsparumą ampicilinui; lacI – lac promotoriaus aktyvumą slopinančio baltymo (lac represoriaus) koduojanti seka. Rusva spalva pažymėtos išlikusios restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekos po HEN1 sutrumpintus baltymus koduojančių sekų įterpimo.



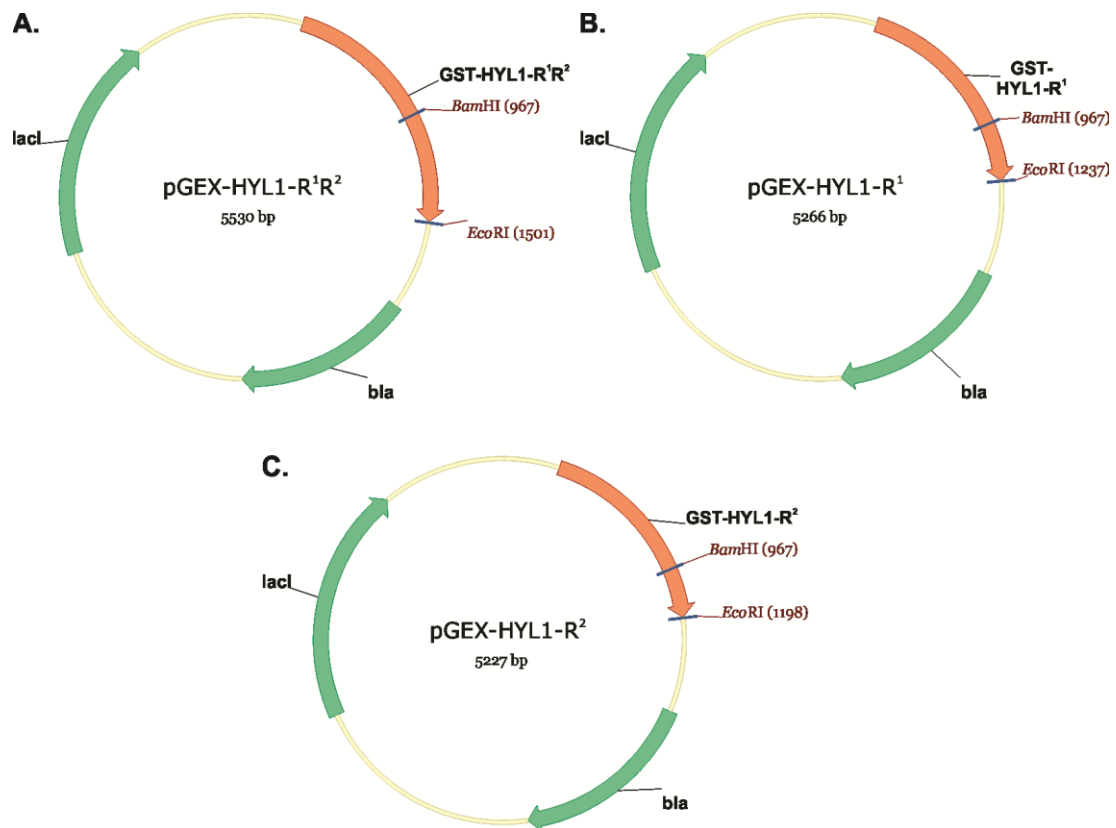
P2. Sukonstruotų pET-HEN1-R¹L (A), pET-HEN1-R¹LR² (B) ir pET-HEN1-PM-*mut* (C), pET-HEN1-PM-*mut2* (D) plazmidžių schemas. Atitinkamai (A), (B), (C), (D) plazmidės koduoja HEN1-R¹L, HEN1-R¹LR² ir HEN1-PM-*mut*, HEN1-PM-*mut2* baltymus N gale sulietus su šešių histidino ar. inkarų turinčiu dvidešimties aminorūgščių polipeptidu. Santrumpos analogiškos pateiktoms P1 pav. pET-HEN1-PM-*mut* plazmidėje V550A, L544A, V543A nurodytos atitinkamai HEN1 baltymo Val543, Leu544, Val550 koduojančių trijų bazių porų pakeitimo alaniną koduojančių trejomis bp vietos. pET-HEN1-PM-*mut2* plazmidėje Δ573-594 pažymėta metiltransferazės 573-594 ar. koduojančių bazių porų delecija. Rusva spalva pažymėtos išlikusios restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekos po HEN1 sutrumpintus baltymus koduojančių sekų įterpimo.



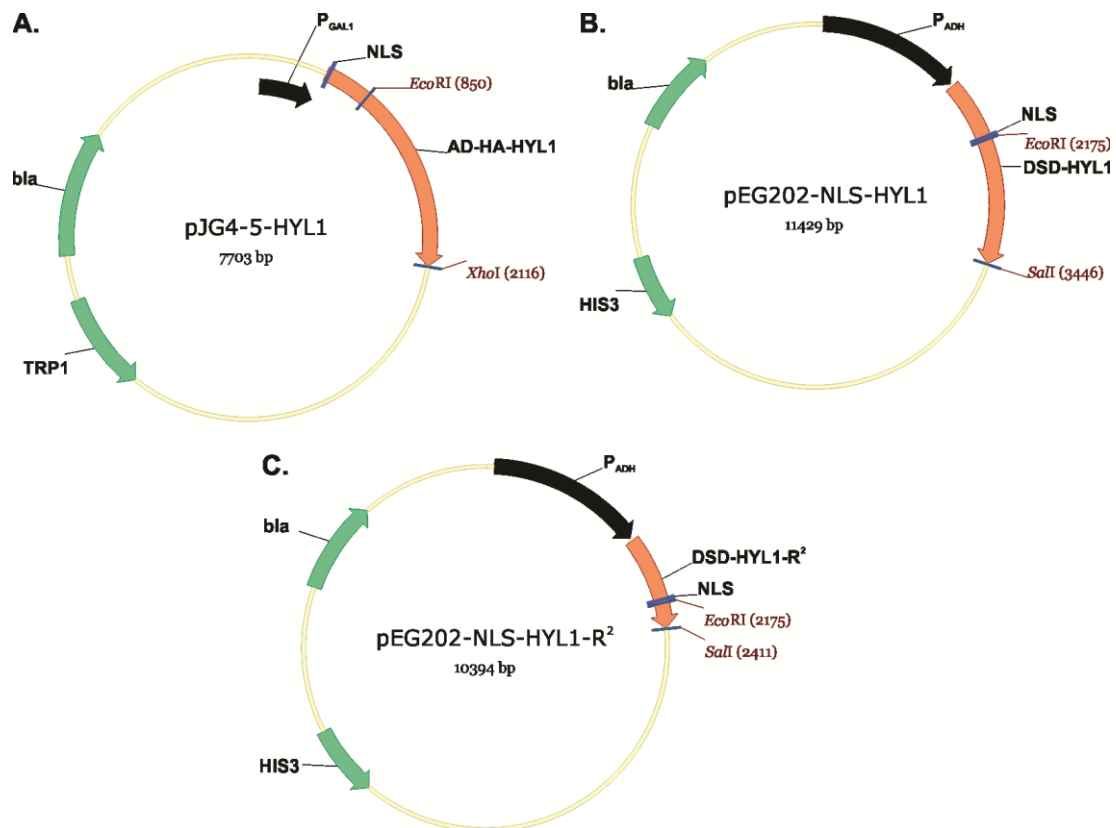
P3. Sukonstruotų pET-HEN1-K22A (A), pET-HEN1-KK69-70AA (B), pET-HEN1-KKKK68-71SAAS (C), pET-HEN1-RHK389,397,477AAA (D), pET-HEN1-*mut* (E) bei pET-HEN1- Δ 38-45 (F) plazmidžių schemas. (A), (B), (D), (E) plazmidės koduoja pilno ilgio metiltransferazę su šešių His ar. inkaru N gale ir turinčią atitinkamai alaniniais pakeistas ar.: Lys22, Lys69 ir Lys70, Arg389 ir His397 bei Lys477, Val543 ir Leu544 bei Val550. Šias ar. koduojančių bp pakeitimo alaniną koduojančiomis trejomis bp vietos atitinkamose plazmidėse pažymėtos: K22A, KK69-70AA, R389A ir H397A bei K477A, V543A ir L544A bei V550A. Plazmidė pET-HEN1-KKKK68-71SAAS koduoja pilno ilgio HEN1 N gale sulietą šešių His ar. inkaru ir seriniais pakeistomis Lys68, Lys71 bei alaniniais pakeistomis Lys69, Lys70 aminorūgštimis (pakeitimų vieta His-HEN1-KKKK68-71SAAS baltymo gene pažymėta KKKK68-71SAAS). pET-HEN1- Δ 38-45 (F) koduoja pilno ilgio metiltransferazę turinčią papildomus šešias His ar. N gale bei 38-45 ar. pakaitą glicinu (ši vieta His-HEN1- Δ 38-45 baltymą koduojančioje sekoje nurodyta Δ 38-45). Rusva spalva pažymėtos išlikusios restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekos po HEN1 mutantų koduojančių sekų įterpimo. Paveikslas aprašymas analogiškas pateiktam P2.



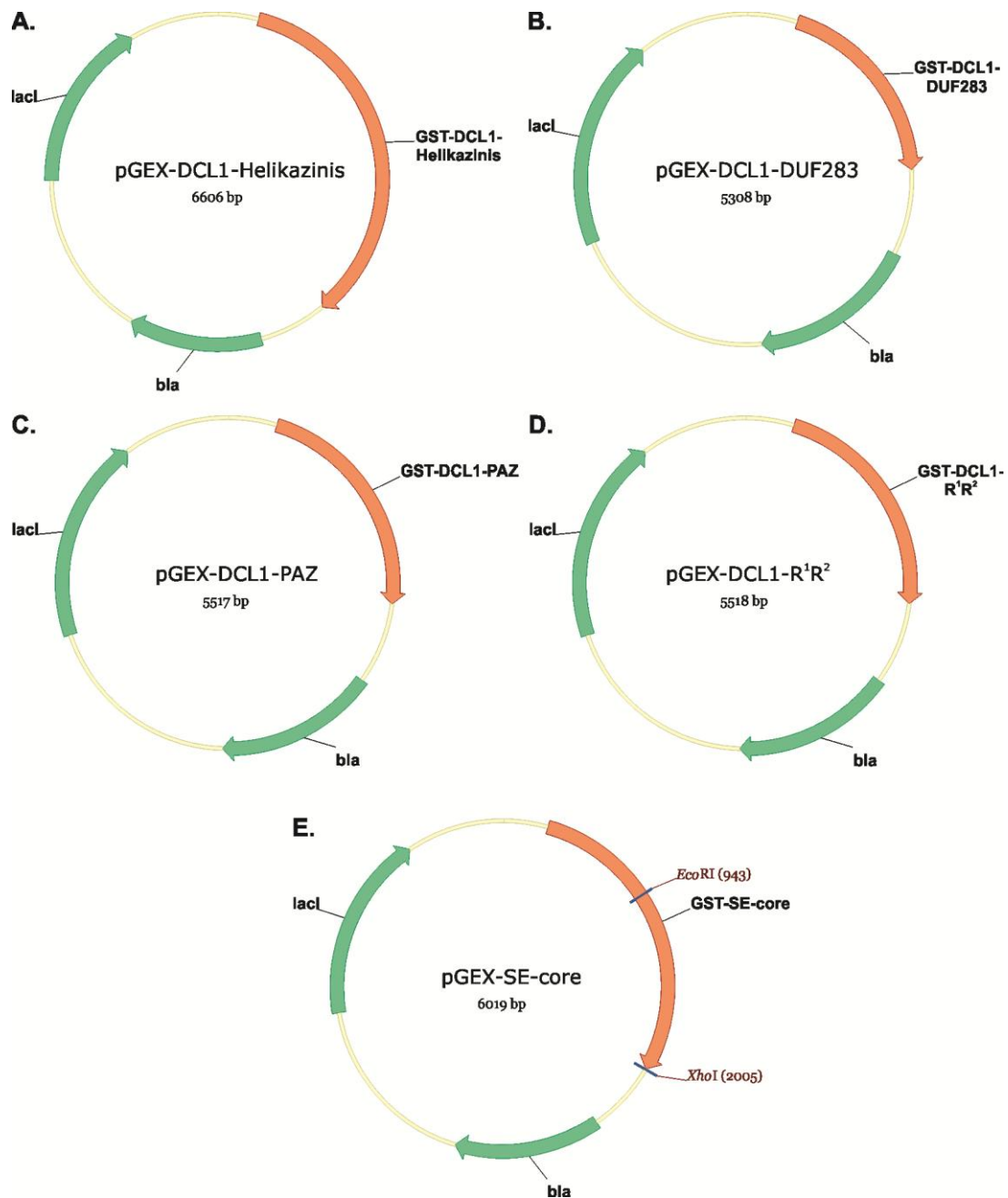
P4. Sukonstruotų pEG202-NLS-HEN1 (A), pJG4-5-HEN1 (B) ir pJG4-5-HEN1-P (C) plazmidžių schemas. pEG202-NLS-HEN1 plazmidė koduoja chimerinį DSD-HEN1 baltymą, sudarytą iš DNR surišančio domeno (DSD) ir HEN1 metiltransferazės. pJG4-5-HEN1 bei pJG4-5-HEN1-P atitinkamai koduoja pilno ilgio metiltransferazę bei jos P domeną N gale sulietus su transkripciją aktyvinančiu domenu (AD) ir hemaglutinino epitopu (HA). Išskirtos DNR sekos koduojančios: NLS – branduolio lokalizacijos signalą; bla - β-laktamazę, lemiančią šių plazmidžių padauginimui naudojamų *E. coli* ląstelių atsparumą ampicilinui; HIS3 – mielių HIS3 genas, būtinas histidino biosintzei ląstelėms augant ant pastarosios ar. neturinčios terpės; TRP1 – mielių TRP1 genas, užtikrinantis triptofano biosintzeę ląstelėms augant ant šios ar. neturinčios terpės. P_{ADH} yra konstitutyvus alkoholio dehidrogenazės geno promotorius, o P_{GAL1} – galaktoze indukuojamas GAL1 geno promotorius. Rusva spalva pažymėtos išlikusios restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekos po HEN1 ar jo P domeną koduojančių sekų įterpimo.



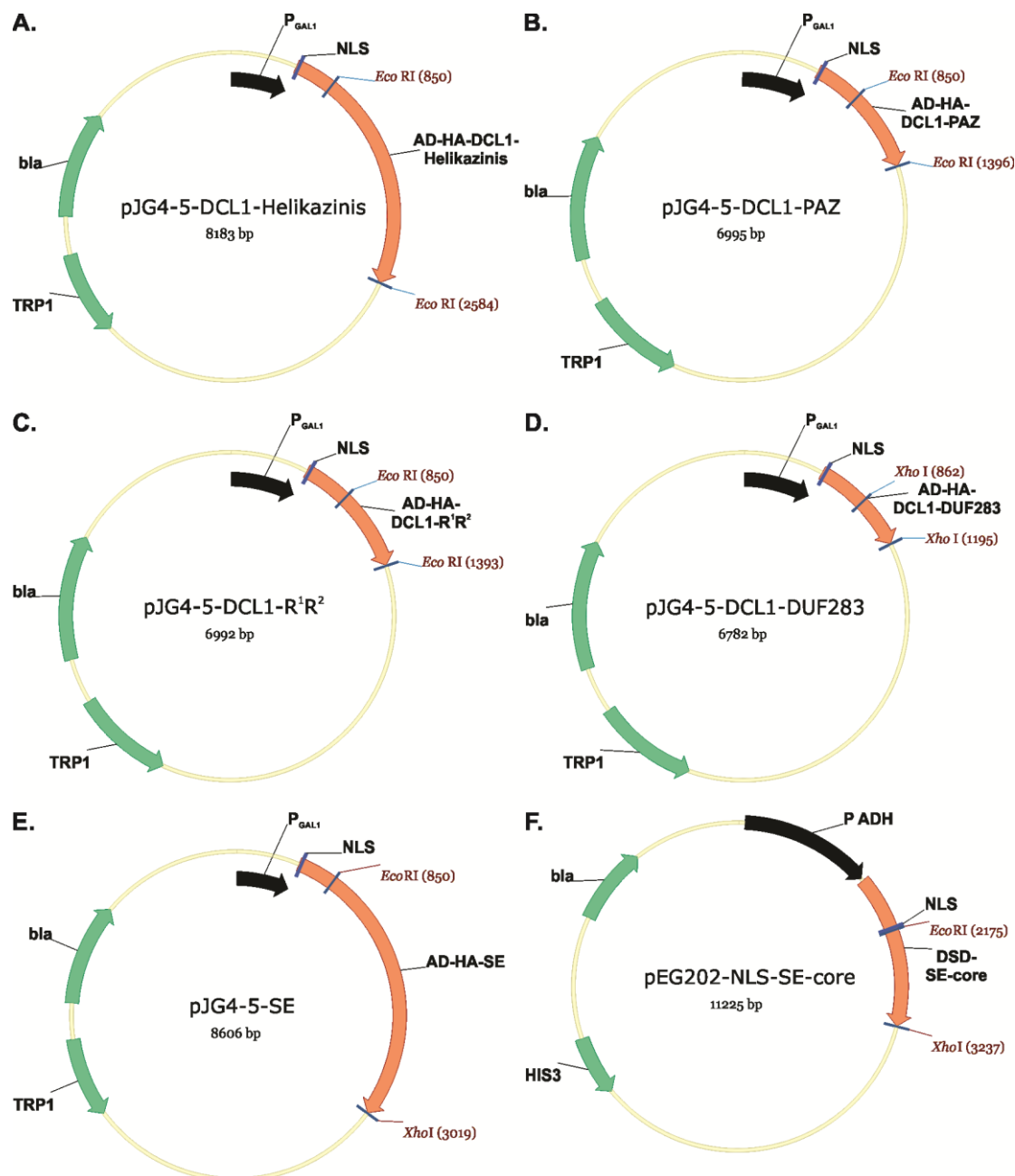
P5. Sukonstruotų pGEX-HYL1-R¹R² (A) bei pGEX-HYL1-R¹ (B), pGEX-HYL1-R² (C) plazmidžių schemas. (A), (B) bei (C) plazmidės koduoja N gale su glutationo S-transferaze (GST) sulietus sutrumpintus HYL1 baltymus sudarytus atitinkamai iš pirmojo ir antrojo dvigrandinę RNR surišančių domenų R¹R², tik iš R¹ domeno bei iš R² domeno. Santrumpos analogiškos pateiktoms P1 pav. Rusva spalva pažymėtos išlikusios restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekos po sutrumpintus HYL1 baltymus koduojančių sekų įterpimo.



P6. Sukonstruotų pJG4-5-HYL1 (A), pEG202-NLS-HYL1 (B) ir pEG202-NLS-HYL1-R² plazmidžių schemas. pJG4-5-HYL1 koduoja chimerinį AD-HA-HYL1 baltymą sudarytą iš transkripciją aktyvinančio domeno (AD), hemaglutinino epitopo (HA) bei pilno ilgio dvigrandinę RNR surišančio baltymo HYL1. pEG202-NLS-HYL1 ir pEG202-NLS-HYL1-R² plazmidės koduoja HYL1 ir jo antrąjį dvigrandinę RNR surišantį domeną R² N gale sulietus su DNR surišančiu domenu (DSD). Santrumpos analogiškos pateiktoms P4 pav. Rusva spalva pažymėtos išlikusios restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekos po HYL1 ar jo R² domeno koduojančių sekų įterpimo.



P7. Sukonstruotų pGEX-DCL1-Helikazinis (A), pGEX-DCL1-DUF283 (B), pGEX-DCL1-PAZ (C), pGEX-DCL1-R¹R² (D) ir pGEX-SE-core (E) plazmidžių schemas. (A), (B), (C) bei (D) plazmidės koduoja N gale su glutationo S-transferaze (GST) sulietus sutrumpintus DCL1 baltymus sudarytus atitinkamai iš šių nukleazės domenų: helikazinio, DUF283 (angl. *Domain of Unknown Function 283*), Piwi, Argonaute ir Zwillie baltymuose identifikuotas PAZ bei pirmojo ir antrojo dvigrandinę RNR surišančių domenų R¹R². pGEX-SE-core plazmidė (E) koduoja chimerinį GST-SE-core baltymą sudarytą iš glutationo S-transferazės ir žinomos struktūros, centrinės SERRATE baltymo dalies SE-core. Santrumpos analogiškos pateiktoms P1 pav. Rusva spalva pažymėtos išlikusios restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekos po SE-core geno įterpimo.



P8. Sukonstruotų pJG4-5-DCL1-Helikazinis (A), pJG4-5-DCL1-PAZ (B), pJG4-5-DCL1-R¹R² (C), pJG4-5-DCL1-DUF283 (D), pJG4-5-SE (E) ir pEG202-NLS-SE-core (F) plazmidžių schemas. (E) bei (A), (B), (C), (D) plazmidės koduoja N gale su transkripcija aktyvinančiu domenu (AD) ir hemaglutinino epitopu (HA) sulietą SERRATE (SE) bei sutrumpintus DCL1 baltymus, sudarytus iš atitinkamų domenų: helikazinio, Piwi, Argonaute ir Zwiile baltymuose identifikuoto PAZ, pirmojo ir antrojo dvigrandinę RNR surišančių R¹R², DUF283 (angl. *Domain of Unknown Function 283*). pEG202-NLS-SE-core plazmidė (F) koduoja chimerinį DSD-SE-core baltymą sudarytą iš DNR surišančio domeno (DSD) ir žinomos struktūros, centrinės SERRATE baltymo dalies SE-core. Santrumpos analogiškos pateiktoms P4 pav. Rusva spalva pažymėtos išlikusios restrikcijos endonukleazių atpažinimo sekos po sutrumpintus DCL1 baltymus bei SE, SE-core koduojančių sekų įterpimo.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju moksliniam vadovui dr. G. Vilkaičiui už suteiktą pasitikėjimą ir galimybę vykdyti mokslinius darbus, puikų vadovavimą, toleranciją ir pagalbą ruošiant disertaciją. Dėkoju DNR modifikacijos tyrimų skyriaus vadovui prof. habil. dr. S. Klimašauskui už mokslines diskusijas ir straipsnių korekcijas.

Esu dėkinga dr. Č. Venclovui už atliktas *in silico* analizes ir patarimus, nukreipusius tyrimus tinkama linkme. Dr. R. Slibinskui, dr. E. Čipliui, dr. A. Kanopkai, I. Pečiulienei - už skolintus-dovanotus antikūnus bei dr. A. Gedvilaitei - už draugišką pasidalijimą „DupLex-A“ mielių dviejų hibridų sistema.

Taip pat norėčiau padėkoti skyriaus kolektyvui už pateiktas pastabas ir geranoriškumą. Buvusiai magistrantei M. Mickutei, su kuria kartu buvo atlikta dalis disertacijoje pristatomų darbų. Dr. M. Tomkuvienei - už iš dr. G. Žvirblio gautą pET-43.1a(+) plazmidę. Dr. R. Rakauskaitei - už išsamius atsakymus mielių klausimais. G. Urbanavičiūtei - už nuoširdžius mokymus ir visapusišką paramą.

Dėkoju manęs nepamiršantiems ir visada palaikantiems pirmiesiems vadovams dr. J. Sereikaitei, dr. D. Matuliui ir dr. L. Baranauskienei už suteiktas pamokas ir įkvėpimą tolimesniems moksliniams darbams.

Ir ypatingai esu dėkinga tėvams, vyrui, dukrai ir artimiesiems, be kurių pristatomas darbas neegzistotų...

Simona,
Trakai, 2016