

VILNIAUS UNIVERSITETAS

MIGLĖ TOMKUVIENĖ

RNR IR DNR SPECIFINIS ŽYMĖJIMAS
PANAUDOJANT METILTRANSFERAZES

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04P)

Vilnius, 2013

Disertacija rengta 2006-2013 m. Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute.

Mokslinis vadovas Prof. habil. dr. **Saulius Klimašauskas** (Vilniaus universitetas; fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	6
ĮVADAS	8
1 LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1 Biologinis metilinimas	12
1.2 Gamtinis RNR modifikavimas.....	14
1.2.1 RNR metilinimas	15
1.2.2 Biologinė RNR modifikavimo reikšmė: tRNR, rRNR ir snRNR pavyzdžiai.....	17
1.2.3 RNR metiltransferazės	19
1.2.4 RNR modifikuojantys ribonukleoproteininiai kompleksai	21
1.3 C/D ribonukleoproteininių kompleksų sandara ir funkcijos.....	23
1.3.1 C/D RNP komplekso nariai	23
1.3.2 C/D RNP struktūra ir katalizės mechanizmas	28
1.3.3 C/D RNP funkcijos.....	33
1.3.4 C/D RNP taikinio atpažinimo ypatumų tyrimai ir panaudojimas ...	34
1.4 Specifinio RNR žymėjimo būdai	37
1.5 Metiltransferazių aktyvumu ir sintetiniais kofaktoriais pagrįstas specifinis biomolekulių žymėjimas.....	39
1.6 Azidų-alkinų cikloprijungimo reakcijos	43
2 MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI.....	46
2.1 Medžiagos	46
2.1.1 Reagentai	46
2.1.2 Radioaktyvios medžiagos.....	46
2.1.3 Bakterijų padermės.....	46
2.1.4 DNR preparatai.....	47
2.1.5 RNR preparatai.....	49
2.1.6 Baltymų preparatai	49
2.1.7 Sintetiniai kofaktoriai	49
2.1.8 Molekulinės biologijos rinkiniai	50
2.1.9 Standartiniai tirpalai	50
2.2 Metodai	50
2.2.1 Darbai <i>in silico</i>	51
2.2.2 Baltymų raiška ir gryninimas	51
2.2.3 Preparatų užterštumo ribonukleazėmis tikrinimas	54
2.2.4 Kreipiančiųjų ir ilgų substratinių RNR paruošimas transkripcijos <i>in vitro</i> būdu.....	55

2.2.5 RNR elektroforezė gelyje ir gryninimas	55
2.2.6 Baltymų ir RNR sąveikos tyrimas elektroforetinio poslinkio metodu	56
2.2.7 Metilinimo aktyvumo įvertinimas naudojant tričiu žymėtą AdoMet	56
2.2.8 RNR modifikavimo naudojant sintetinius kofaktoriaus analogus tyrimas	57
2.2.9 <i>Pyrococcus abyssi</i> aFib aktyvaus centro mutagenezė.....	58
2.2.10 Kreipiančiosios RNR perprogramavimas.....	58
2.2.11 Aukšto slėgio skysčių chromatografija ir masių spektrometrija (HPLC-MS)	59
2.2.12 RNR mTAG žymėjimas	60
2.2.13 Atvirkštinės transkripcijos užlaikymo metodas	61
2.2.14 DNR modifikavimas <i>in vitro</i> , esant sintetinio kofaktoriaus ir AdoMet konkurencijai.....	62
2.2.15 Modifikuotos DNR žymėjimas azidų-alkinų cikloprijungimo reakcijos būdu <i>in vitro</i>	62
2.2.16 DNR mTAG žymėjimas ląstelių lizate.....	63
3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	64
3.1 Programuojamas sekai specifinis RNR žymėjimas panaudojant archėjų C/D RNP.....	64
3.1.1 C/D RNP komponentų gryninimas ir komplekso surinkimas <i>in vitro</i>	65
3.1.2 C/D RNP metilinimo aktyvumo įvertinimas naudojant tričiu žymėtą AdoMet.....	67
3.1.3 RNR modifikavimas naudojant sintetinius kofaktoriaus analogus .	69
3.1.4 <i>Pyrococcus abyssi</i> aFib aktyvaus centro mutagenezė.....	75
3.1.5 Mezofilinės archėjos RNP baltymų klonavimas ir gryninimas.....	76
3.1.6 C/D RNP specifiškumo programavimas	77
3.1.7 Programuojamas tRNR žymėjimas fluoroforu.....	81
3.1.7 Programuojamas modelinės pre-iRNR žymėjimas fluoroforu.....	86
3.2 Bioortogonalus sekai specifinis DNR žymėjimas.....	88
3.2.1 eM.HhaI aktyvumas su sintetiniais kofaktoriais	90
3.2.2 Sekai specifinis DNR žymėjimas fluoroforu ląstelių lizate	93
3.3 Rezultatų aptarimas.....	96
3.3.1 Programuojamas sekai specifinis RNR žymėjimas panaudojant archėjų C/D RNP	96

3.3.2. Selektyvus DNR žymėjimas biologinėse sistemose.....	99
IŠVADOS	101
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	102
FINANSINĖ PARAMA	104
CURRICULUM VITAE.....	105
PADĖKA	106
Literatūros sąrašas.....	107

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

2'-O-m	2'-O-metilribozė
AAC	Azidų-alkinų 1,3-cikloprijungimas
AdoMet	S-adenozil-L-metioninas
AdoHcy	S-adenozil-L-homocisteinas
amr.	aminorūgštis(ys)
bp	bazių poros
BSA	jaučio serumo albuminas
CuAAC	Cu(I) jonų katalizuojamas azidų-alkinų 1,3-cikloprijungimas
DEPC	dietilpirokarbonatas
DMSO	dimetilsulfoksidas
eM.HhaI	baltymų inžinerijos būdu mTAG reakcijoms pritaikyta M.HhaI
EtBr	Etidžio bromidas
HPLC-MS	aukšto slėgio skysčių chromatografija ir masių spektrometrija
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktozidas
M. arba MTazė	metiltransferazė
mTAG	metiltransferazių katalizuojama aktyvuotų grupių pernaša nuo sintetinių kofaktoriaus analogų, angl. <i>methyltransferase-directed Transfer of Activated Groups</i> .
NDS	natrio dodecilsulfatas
nt	nukleotidas(ai)
PAA	poliakrilamidas
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoridas, proteazių inhibitorius
R. arba REazė	restrikcijos endonukleazė
RNazė	ribonukleazė
RNP	ribonukleoproteininis, t.y. sudarytas iš RNR ir baltymų,

	kompleksas
snoRNP	mažasis branduolėlio RNP (atitinka eukariotų C/D ir H/ACA RNP)
snoRNR	mažoji branduolėlio RNR (atitinka eukariotų C/D ir H/ACA RNR)
sRNP	mažasis RNP (atitinka archėjų C/D ir H/ACA RNP)
sRNR	mažoji RNR (atitinka archėjų C/D ir H/ACA RNR)
TBTA	tris(benziltriazolimetil)aminas
TLC	plonasluoksni chromatografija, angl. <i>thin-layer chromatography</i>
UV	ultravioletinė šviesa
Wt	laukinis tipas
Ψ	pseudouridinas

Tekste naudojamos standartinės aminorūgščių pavadinimų vienos ir trijų raidžių santrumpos bei standartinės nukleorūgščių bazių pavadinimų vienos raidės santrumpos.

ĮVADAS

DNR ir RNR sudėtyje randami keturi pagrindiniai nukleotidai: adenino (A), guanino (G), citozino (C) ir timino (T, DNR) arba uracilo (U, RNR). Jiems išsidėstant polinukleotidinėse grandinėse susidaro unikalios sekos, užrašinės, saugojančios ir perduodančios genetinę informaciją. Sekos taip pat gali lemti nukleorūgščių struktūrą ir funkcijas. Nukleotidai polinukleotidų sudėtyje gali būti kovalentiškai modifikuoti prijungiant įvairias papildomas chemines grupes. Taip dar labiau praplečiama nukleorūgštyse užrašyta informacija ir sustyguojamas jų funkcionalumas.

Tiriant DNR ir RNR, neretai svarbu prijungti įvairius reporterinius ar giminingumo žymenis tik prie pasirinktų sekų, tam tikrose vietose – t.y. specifiskai. Tačiau metodų, skirtų specifiniam kovalentiniam nukleorūgščių žymėjimui, galimybės kol kas dar ribotos, vertinant jų efektyvumą, sekų ir įvedamų funkcinių grupių pasirinkimą. Todėl jaučiamas poreikis naujų molekulinų įrankių, skirtų šiam tikslui, jie intensyviai kuriami. Specifinio biomolekulių žymėjimo metodas, pavadintas mTAG (angl. *methyltransferase-directed transfer of activated groups*), pagrįstas tuo, kad fermentai metiltransferazės (MTazės), naudojančios kofaktorių AdoMet, gali būti aktyvios ir su sintetiniais jo analogais, turinčiais ilgesnes nei metil- pernešamas grandines (Dalhoff ir kt., 2006; Lukinavičius ir kt., 2007; Klimašauskas ir Weinhold, 2007). Šios grandinės dažniausiai turi galines funkcines grupes, prie kurių vėliau cheminių reakcijų pagalba galima prijungti norimus žymenis. Kadangi metilinimo reakcijos yra plačiai paplitusios gamtoje, randama labai įvairių MTazių. Jos gali būti specifiskos substratams nuo mažų metabolitų iki baltymų, DNR ir RNR (Cheng ir Blumenthal, 1999). Iš funkcinių grupių, kurios leidžia specifiskai prijungti žymenis, kaip ypatingai perspektyvios išsiskiria azido- ir galinė alkinil- grupės. Jų tarpusavio reakcija - azidų-alkinų 1,3-cikloprijungimas (AAC) - efektyviai vyksta fiziologinėmis sąlygomis. Be to, ši reakcija yra bioortogonali, t.y. šių funkcinių grupių nėra jokiuose

žinomuose gamtiniuose junginiuose ir jos nereaguoja su gamtinėmis molekulėmis (Kolb ir kt., 2001).

Pirmieji bandymai pritaikyti mTAG metodą DNR žymėjimui (Lukinavičius ir kt., 2007) parodė, kad naudojant ilgas pernešamas grandines, mažėja tikimybė, kad laukinio tipo MTazės bus aktyvios su tokiais kofaktoriais. Todėl DNR MTazė HhaI genų inžinerijos būdu buvo pakeista taip, kad galėjo pernešti netgi dvylikos atomų ilgio grandines (Lukinavičius ir kt., 2012). Tačiau iki šiol dar nebuvo sukurta pakankamai stabilių sintetinių kofaktorių, tinkamų žymės prijungimui azidų-alkinų cikloprijungimo būdu. Kolegoms susintetinus tokius azido- ir alkinil- grupes turinčius kofaktorius, čia aprašomų darbų metu buvo tiriama, ar mTAG metodui pritaikyta M.HhaI juos gali efektyviai naudoti ir ar tokią MTazės-kofaktorių sistemą galima pritaikyti DNR žymėjimui biologiniuose mišiniuose.

Specifiniam RNR žymėjimui gali būti naudojamos atitinkamos RNR MTazės. Archėjose ir eukariotuose randami C/D ribonukleoproteininiai kompleksai (C/D RNP), sudaryti iš RNR ir keleto baltymų. Šie RNP kompleksai pasižymi unikaliu substrato atpažinimo mechanizmu: komplekso sudėtyje esanti RNR, vadinama kreipiančiąja, komplementarumo principu atpažįsta substratinę RNR ir taip nukreipia metiltransferazinį aktyvumą į specifinį taikinį. Archėjų C/D RNP atpažįstama seka paprastai yra 11 nt ilgio, o metilinimas nukreipiamas į nukleotidą, komplementarų penktajam kreipiančiosios RNR nukleotidui, skaičiuojant nuo konservatyvaus motyvo. Tokiu būdu metilinamas konkretaus nukleotido ribozės 2'-O atomas. Taikinį atpažįstančią RNR dalį galima keisti, kartu atitinkamai pasikeičiant ir metilinamai RNR sekai. Kitos žinomos RNR MTazės substrato atpažinimui naudoja baltymo-RNR sąveiką, todėl jų specifiškumą nėra taip paprasta pakeisti (apžvelgta Motorin ir Helm, 2011). Tad dėl potencialiai keičiamo ir aukšto specifiškumo, kai modifikuojamas vienas konkretus nukleotidas atpažįstamoje 11 nt ilgio sekoje, C/D RNP kompleksai mums pasirodė labai patrauklus objektas mTAG koncepcijai pritaikyti. Nusprendėme parodyti, kad C/D RNP gali veikti su sintetiniais kofaktoriais ir būti molekulinio įrankiu,

leidžiančiu pažymėti RNR pasirinktose sekos vietose. Tokiam RNR žymėjimo metodui kurti pasirinkome literatūroje išsamiai aprašytą, aktyvų *in vitro*, iš rekombinantinių komponentų surenkamą C/D RNP kompleksą iš hipertermofilinės archėjos *Pyrococcus abyssi* (Bortolin ir kt., 2003; Nolvos ir kt., 2005).

Pagrindiniai darbo tikslai ir uždaviniai:

- 1) Ištirti modifikuotos DNR metiltransferazės HhaI (varianto Q82A/Y254S/N204A) aktyvumą su sintetiniais kofaktoriais, turinčiais pernešamas okt-2,7-diinil- ir 6-azido-heks-2-inil- grupes, ir įvertinti šios reakcijos tinkamumą specifiniam DNR žymėjimui *in vitro* ir ląstelių lizatuose.
- 2) Nustatyti *Pyrococcus abyssi* C/D ribonukleoproteininio komplekso (RNP) metiltransferazės tinkamumą RNR modifikacijos reakcijoms naudojant sintetinius AdoMet analogus, turinčius prailgintas pernešamas grupes.
- 3) Ištirti, ar C/D RNP vykdoma mTAG reakcija gali būti nukreipta į pasirinktas modelinių tRNR ir iRNR molekulių vietas.
- 4) Parodyti (įvertinti) C/D RNP aktyvumu pagrįstos mTAG reakcijos tinkamumą specifiniam modelinių RNR žymėjimui pasirinktose sekose.

Mokslinis naujumas

Pirmą kartą ištirtas, parodytas ir įvertintas RNR 2'-O-metiltransferazės C/D RNP aktyvumas su prailgintas pernešamas grupes turinčiais sintetiniais kofaktoriais, susidarant atitinkamai 2'-O-modifikuotiems nukleotidams. Parodyta galimybė sintetiškai keičiant kreipiančiąją RNR, prop-2-inilgrupės pernašą nukreipti į norimas substratinės RNR sekos vietas.

Pirmą kartą parodytas ir įvertintas DNR citozino-5 metiltransferazės HhaI aktyvumas su sintetiniais kofaktoriais, turinčiais pernešamas okt-2,7-diinil- ir 6-azido-heks-2-inil- grupes.

Praktinė reikšmė

Sukurtas unikalus specifinio RNR žymėjimo metodas, leidžiantis be suvaržymų pasirinkti norimą pažymėti RNR seką. Taip pat pristatomas DNR mTAG žymėjimo variantas, pasižymintis bioortogonalumu, leidžiančiu visą specifinio žymėjimo procesą atlikti ląstelių lizate. Šios naujos specifinio nukleorūgščių žymėjimo galimybės gali būti pritaikytos biochemijos, biomedicinos, nanotechnologijų ir kitose tyrimų srityse bei kuriant medicinos diagnostikos priemones.

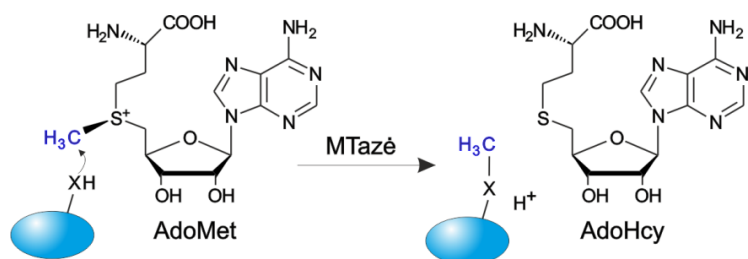
Ginamieji teiginiai:

- 1) DNR metiltransferazė HhaI(Q82A/Y254S/N204A) perneša okt-2,7-diinil- ir 6-azido-heks-2-inil- grupes nuo sintetinių kofaktorių ant taikinio nukleotido DNR substrate *in vitro*. Naudojant šią metiltransferazę, 6-azido-heks-2-inilgrupę turintį sintetinį kofaktorių ir nekatalizuojamą azidų-alkinų cikloprijungimo reakciją, DNR specifiskai gali būti pažymėta ląstelių lizate.
- 2) RNR metiltransferazė C/D RNP (iš *Pyrococcus abyssi*) perneša prop-2-inilgrupę nuo sintetinio kofaktoriaus SeAdoYn ant taikinio nukleotido RNR substrate *in vitro*. Įvairių kitų 2-5 anglies atomų ilgio grupių nuo C/D RNP priklausoma pernaša nuo sintetinių kofaktorių ant RNR vyksta silpniau, o ilgesnių – nevyksta.
- 3) Pakeičiant kreipiančiosios RNR seką C/D RNP komplekse, prop-2-inilgrupės pernašą/prijungimą galima nukreipti į pasirinktą modelinių tRNR ir iRNR vietą nukleotido tikslumu.
- 4) Prop-2-inilgrupe modifikuotos RNR molekulės azidų-alkinų cikloprijungimo reakcijos pagalba gali būti specifiskai pažymėtos fluorescencinėmis žymėmis.

1 LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Biologinis metilinimas

Fermentai metiltransferazės (MTazės) katalizuoja metilgrupės pernašą nuo kofaktoriaus ant įvairių substratų: nuo mažų metabolitų iki biomakromolekulių (DNR, RNR, baltymų) (pav. 1.1). Metilinimas dažniausiai vyksta nukleofilinio pakeitimo principu, metilgrupę prijungiant prie O-, N-, C-, S- ir Se- nukleofilinių centrų. MTazės intensyviai tyrinėjamos tiek dėl didelės ir įvairialypės biologinės reikšmės, tiek dėl plačių galimybių jas panaudoti biotechnologijoje. MTazių atliekamos funkcijos siejamos su organizmo vystymusi, harmoninga veikla bei, sutrikimų atveju, įvairių ligų, įskaitant vėžį, patogenezę. Ypatingai susidomėjimas MTazėmis ir jų funkcijomis išaugo todėl, kad DNR, baltymų ir galbūt netgi RNR MTazės atlieka svarbų vaidmenį epigenetiškai reguliuojant genų raišką. Biotechnologijoje MTazės panaudojamos biokataliziniams gamtinių ir sintetinių junginių metilinimui įvairių junginių sintezėje farmacijos, agrochemijos, skonių ir kvapų bei pan. pramonėje. Parodžius, kad MTazės gali veikti su sintetiniais kofaktoriais, kuriuose metilgrupė pakeista ilgesnėmis grandinėmis ir įvairaus reaktyvumo funkcinėmis grupėmis, sparčiai išplito tokio transalkilinimo panaudojimas, ypač pritaikant jį biomolekulių žymėjimui (apžvelgta Struck ir kt., 2012).



Pav. 1.1.

MTazių katalizuojama metilgrupės pernaša nuo kofaktoriaus AdoMet ant nukleofilinės grupės substratinėje molekulėje.

Daugiausiai žinoma MTazių, kurios kaip metilgrupės donorą naudoja kofaktorių *S*-adenozil-L-metioniną (AdoMet). Reakcijos metu susidaro metilintas produktas ir *S*-adenozil-L-homocisteinas (AdoHcy) (pav. 1.1). Tokių reakcijų gausą ir svarbą rodo tai, kad AdoMet ląstelėse yra antras po ATP

pagal įvairių reakcijų, kuriose naudojamas kaip kofaktorius, kiekį (Cheng ir Blumenthal, 1999).

Šiuo metu žinomos penkios pagrindinės AdoMet naudojančių MTazių klasės, išskirtos remiantis struktūros ypatumais. Pirmosios klasės MTazėms būdinga taip vadinama Rosmano sankloda: šešių β -klosčių lakštas, apsuptas α -spiralėmis. Ši sankloda būdinga ir kitokiems fermentams, naudojantiems kofaktorius, sudėtyje turinčius adenziną, pvz. NAD(P). Rosmano sanklodos tipo MTazės dar turi papildomą, septintąją, β -klostę. Ši MTazių klasė yra pati didžiausia, jos atstovai katalizuoja daugumą metilinimo reakcijų ir yra randami visuose gyvybės domenuose. Jai priklauso įvairių mažų metabolitų MTazės, visos žinomos DNR MTazės, dauguma RNR ir kai kurios baltymų MTazės. Jau yra nustatyta daug (daugiau nei 50 skirtingų fermentų) I-osios klasės MTazių tretinių struktūrų. Visos jos labai panašios, nors pirminės aminorūgščių sekos panašumas gali tesiekti 10% (apžvelgta Cheng ir Blumenthal, 1999; Schubert ir kt., 2003; Struck ir kt., 2012). Visos šios MTazės su AdoMet sąveikauja labai panašiai. Konservatyvus Asp arba Glu sudaro vandenilines jungtis su ribozės hidroksilo grupėmis. Adenino žiedas apsupamas hidrofobinių sąveikų ir vandenilinių ryšių. Aplink metionino grupę taip pat sudaromas vandenilinių ryšių tinklas. Tik su sieros atomu ir pernešama metilgrupe jokie ryšiai nesudaromi. Dėl to MTazės neatskiria AdoMet nuo reakcijos produkto AdoHcy ir pastarasis yra konkurencinis metilinimo reakcijos slopiklis (Cheng ir Blumenthal, 1999). Lyginant su kitomis MTazių klasėmis, AdoMet yra „ištiestas“: metioninas, ribozė ir adeninas išsidėsto $\sim 180^\circ$ kampu. Kitų klasių surišto kofaktoriaus adeninas ir metioninas yra labiau palenkti ribozės link (apžvelgta Schubert ir kt., 2003).

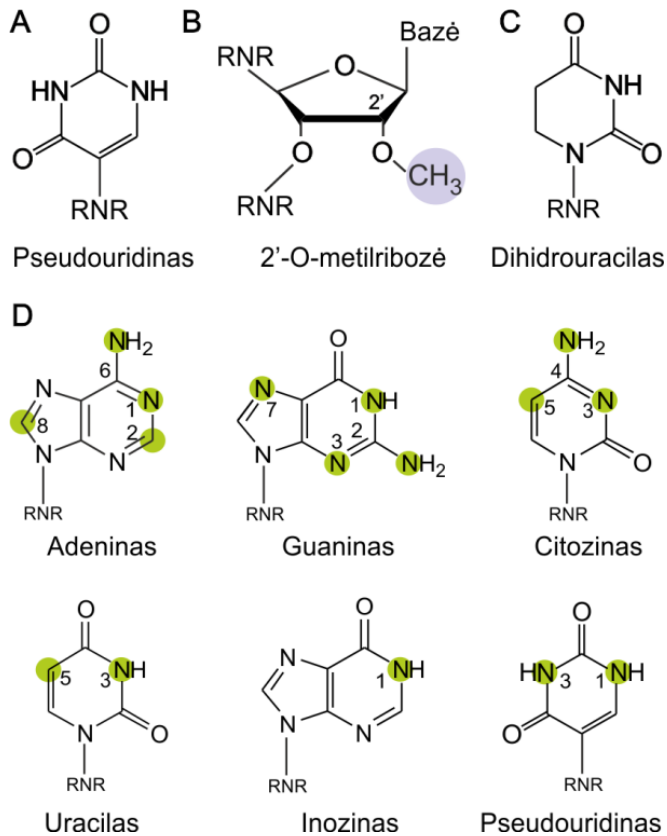
II-V klasių MTazės retesnės (bent kol kas mokslinėje spaudoje). Joms būdingas kitoks nei Rosmano α - β -struktūrų išsidėstymas, kitoks AdoMet surišimas – skiriasi netgi jo konformacija aktyviajame fermento centre. II-III klasių atveju žinoma tik po keletą atstovų struktūrų. Tai fermentai, dalyvaujantys smulkių metabolitų biosintezėje. IV-ajai klasei priskiriamos SPOUT šeimos RNR MTazės. Jos katalizuoja metilgrupės prijungimą prie

ribozės 2'-O atomo. Šios klasės visi žinomi nariai yra homodimerai, o aktyvusis centras susidaro monomerų sąveikos paviršiuje. Nors biochemiškai ištirta tik keletas SPOUT klasės fermentų, genomų sekų bioinformatiniai tyrimai rodo, kad jie tikriausiai plačiai paplitę visuose gyvybės domenuose. V-ajai klasei priskiriamos kol kas tik eukariotuose aptinkamos SET domeną turinčios MTazės. Jos metilina baltymų, pvz. histonų, RuBisCO, lizino šoninę grandinę (apžvelgta Schubert ir kt., 2003). Šalia klasikinių penkių paminėtų klasių neseniai buvo atrastos nuo AdoMet priklausomos MTazės, naudojančios reakcijos mechanizmą, kurio metu susidaro AdoMet ir metilinos molekules radikalai. Dėl to šios MTazės geba metilinti nereaktyvius, nenukleofilinius molekulių atomus (apžvelgta Struck ir kt., 2012). Žinoma ir MTazių, naudojančių kitokius nei AdoMet kofaktorių, pvz. timidilatsintazė metilgrupę ant deoksiribouridinfosfato perneša nuo kofaktoriaus N⁵,N¹⁰-metilentetrahidrofoliato (Finer-Moore ir kt., 1998).

1.2 Gamtinis RNR modifikavimas

Įvairios cheminės kovalentinės RNR modifikacijos yra plačiai paplitusios gamtoje. Paprastai jos įterpiamos į RNR po transkripcijos. Dažniausiai įvairiose RNR sutinkamos modifikacijos – tai uridino pavertimas pseudouridinu (Ψ), ribozės metilinimas 2'-O padėtyje ir bazių metilinimas. tRNR molekulėse taip pat dažnas dihidouridinas (pav. 1.2). Tačiau iš viso subrendusiose RNR randama daugiau nei šimtas skirtingų modifikuotų nukleotidų. Ši modifikacijų gausa stipriai padidina cheminę RNR įvairovę ir yra naudinga bei neretai būtina RNR struktūros ir funkcijos palaikymui. Tokia pakeitimo ir papildymo strategija įvairiuose organizmuose labiausiai taikoma nekoduojančioms RNR. Modifikacijos ir jų telkiniai turi įtakos įvairioms RNR savybėms: susisukimo greičiui, tvarkai ir galutinei RNR erdvinei struktūrai, neleidžia susidaryti neaktyvioms alternatyvioms struktūroms, palaiko stabilumą bei biologinį aktyvumą. Modifikacijų svarbą ir naudą taip pat rodo skirtingų fermentų, skirtų toms pačioms modifikacijoms atlikti, lygiagreči evoliucija skirtinguose organizmuose. Tokių konvergencinės fermentų

evoliucijos pavyzdžių RNR modifikacijų srityje žinoma itin daug. RNR modifikavimui skiriama ir nemažai genetinių resursų – paskaičiuota, kad, priklausomai nuo organizmo, 1-2% koduojančių genomo sekų yra susiję su šiuo procesu (apžvelgta Motorin ir Helm, 2011; Decatur ir Fournier, 2002).



Pav. 1.2. Dažniausiai sutinkamos RNR modifikacijos. **(A)** Pseudouridinas (žymimas Ψ). **(B)** Ribozės 2' padėties deguonies atomo metilinimas (2'-O-m), nepriklauso nuo nukleotido bazės. **(C)** 5,6-dihidrouracilas (žymimas D). **(D)** Bazių metilinimas įvairiose padėtyse. Metilinimo vietos pažymėtos žaliai.

1.2.1 RNR metilinimas

Maždaug du trečdalius visų skirtingų RNR modifikacijų sudaro metilgrupės prijungimas. Metilgrupė gali būti pernešama ant daugumos RNR azoto atomų. Taip pat metilinami anglies atomai 5-oje pirimidinų ir 2-oje bei 8-oje adenino padėtyje (pav. 1.2C). Labai dažnas taikinyis yra ribozės 2' padėties deguonis (pav. 1.2B). Nors RNR metilinimas sutinkamas visuose gyvybės domenuose, skirtingų metilintų nukleozidų pasiskirstymas juose nėra vienodas. Pvz., 5-metilcitudinas, 2'-O-metilcitudinas, 6-dimetiladenozinas ir keletas kitų yra sutinkami visuose domenuose, 2'-O-metiladenozinas, 2-dimetilguanozinas ir pora kitų būdingi tik eukariotams ir archėjoms, o 2'-O,5-

dimetiluridinas ir 3-metilcitolinas kol kas nėra aptikti archėjose. Žinoma, tai nėra galutiniai duomenys. Tyrimai šioje srityje vyksta intensyviai ir rezultatyviai. Vis dėlto, nors duomenų apie RNR metilinimą surenkama daug, ne visada pavyksta tiksliai paaiškinti šių modifikacijų paskirtį. Mat RNR metilinimas gali turėti įvairių funkcijų, priklausomai nuo konteksto, ir neturi vienos apibrėžtos paskirties. Tikriausiai dėl to jis sutinkamas tokiose skirtingose RNR kaip tRNR, rRNR, iRNR, snRNR, miRNR ir virusinės RNR (apžvelgta Motorin ir Helm, 2011).

2'-O-m – antra pagal paplitimą gamtoje RNR modifikacija po pseudouridilino. Ji aptinkama visuose organizmuose. Iš 206 modifikuotų *Homo sapiens* rRNR nukleotidų, 105 modifikacijos – 2'-O-m (Decatur ir Fournier, 2002). Tai viena iš efektyviausių biologinių strategijų, skirtų RNR struktūrai stabilizuoti. Tam, kad metilgrupė ir heterociklinė bazė erdviškai nekliudytų viena kitai, modifikuotas nukleotidas įgauna 3'-endo konformaciją. O tai sustiprina bazių stekingo sąveiką. RNR spirale tampa standesnė ir padidėja RNR lydymosi temperatūra. Ši modifikacija gali paveikti RNR struktūrą ir dėl to, kad sumažina ribozės galimybes sudaryti vandenilines jungtis bei padidina hidrofobinį paviršių. Be to, ji apsaugo nuo fosforibozinio karkaso hidrolizės ties modifikuotu nukleotidu (Decatur ir Fournier, 2002; apžvelgta Davis, 1998; Gagnon ir kt., 2009). Taigi, priklausomai nuo vietos struktūroje, pavienės 2'-O-metilgrupės ar jų sankaupos gali paveikti platų RNR savybių spektrą. Dauguma RNR yra 2'-O-metilinamos: tRNR, rRNR, snRNR, miRNR, siRNR, piRNR. Manoma, kad aukštesniesiems eukariotams RNR modifikavimo, ypač 2'-O-metilinimo, pobūdžio skirtumai leidžia atpažinti svetimą RNR (apžvelgta Motorin ir Helm, 2011).

2'-O-metilinimas svarbus RNR struktūrų stabilizavimui esant aukštai temperatūrai. Auginant archėją *Sulfolobus solfataricus* skirtingose temperatūrose buvo nustatyta, kad kylant temperatūrai, 2'-O-metilintų ribozių kiekis rRNR didėja (skirtumas buvo apie 20%, lyginant rRNR iš ląstelių, augintų 60°C ir 83°C temperatūroje). Tokia tendencija stebėta ir tiriant termofilinės bakterijos *Bacillus stearothermophilus* bei hipertermofilinės

archėjos *Pyrococcus furiosus* tRNR (Noon ir kt., 1998). Taip pat parodyta, kad C/D RNR (mažų nekoduojančių RNR, apsprendžiančių ribonukleoproteininių kompleksų katalizuojamo 2'-O-metilimo specifiškumą) genų kiekis archėjų genome tiesiogiai koreliuoja su optimalia šių organizmų augimo temperatūra (apžvelgta Dennis ir kt., 2001).

1.2.2 Biologinė RNR modifikavimo reikšmė: tRNR, rRNR ir snRNR pavyzdžiai

Didžiausia modifikacijų įvairovė ir dažniu visuose gyvybės domenuose pasižymi tRNR. Jos modifikavimo procesai intensyviai tyrinėjami ir dažnai tarnauja kaip modelis bendram RNR modifikavimo reiškinio supratimui. tRNR molekulės turi konservatyvią struktūrą ir yra ląstelėse gausiausios bei galbūt seniausios mažos nekoduojančios RNR. Gamtinė tRNR modifikavimo sistema, sudaryta iš daugybės įvairių fermentų, yra labai efektyvi ir išstobulinta. tRNR modifikacijas galima suskirstyti į dvi grupes: vienos svarbesnės iRNR kodo skaitymui, translacijos tikslumui, kitos – tRNR struktūros ir metabolinio stabilumo palaikymui. Atitinkamai skiriasi jų pasiskirstymas tRNR molekulėje – pirmosios išsidėsto antikodono kilpoje, antrosios – kitose tRNR vietose. Modifikacijų efektas yra kolektyvinis, jos veikia tarsi choras: bendras efektas labai svarbus, o pašalinus vieną-kitą narį pasekmės dažniausiai nėra kritiškos (apžvelgta Motorin ir Helm, 2011).

Modifikacijos formuoja tRNR struktūrą, lemia didesnę jos patvarumą kylant temperatūrai. Parodyta, kad *in vitro* transkribuotoms ir nemodifikuotoms RNR reikalinga didesnė nei fiziologinė Mg^{2+} koncentracija, kad susidarytų biologinėms artimos struktūros. Tik pasiekus 10 mM Mg^{2+} koncentraciją modifikuotų ir nemodifikuotų tRNR biocheminės ir biofizikinės savybės *in vitro* dažniausiai tampa labai panašios (apžvelgta Helm, 2006). Bazių metilinimas užblokuojant galimybes sudaryti vandenilines jungtis leidžia išvengti bazių poravimosi, kuris lemtų nepageidaujamas alternatyvias struktūras. Nepakankamai modifikuotos, o nepakankamai metilintos ypač,

tRNR ląstelėse yra suskaldomos. Nukleotidai antikodono kilpoje, būtent 34-ojoje („klibančioje“) pozicijoje ir 37-ojoje (šalia antikodono), yra ypatingai svarbūs teisingam ir efektyviam iRNR kodonų atpažinimui ribosomoje. Tad modifikavimo pakitimai šioje tRNR srityje pasireiškia iRNR iškodavimo sutrikimais. 34-osios pozicijos nukleozidas yra gausiai modifikuojamas, taip pat ir metilinamas. Manoma, kad tai stabilizuoja antikodono kilpą ir pritaiko šios bazės galimybes sudaryti porą su trečiąja, „klibančia“, kodono baze. 37-osios pozicijos bazės metilinimas, ir kartais didesnės hipermodifikacijos, neleidžia šiai bazei sudaryti porų su iRNR bazėmis - taip palaikomas teisingas skaitymo rėmelis. Tiek 34-os, tiek 37-os pozicijos modifikacijos apsaugo nuo rėmelio „praslydimo“ +1 kryptimi (Urbonavičius ir kt., 2001). Taip pat tRNR modifikacijos gali lemti galimybes translacijai nesustoti ties stop kodonu, įjungti selenocisteiną (apžvelgta Motorin ir Helm, 2011).

Ribosominių RNR funkcijai taip pat reikšmingas modifikacijų „choras“. Nors rRNR modifikacijų išsidėstymas nėra griežtai konservatyvus, tačiau visuose organizmuose jos telkiasi tuose pačiuose funkciškai svarbiuose rRNR regionuose: peptidil-transferaziniame ir dekodavimo centruose, ribosomos subvienetų sąveikos srityje (Decatur ir Fournier, 2002). rRNR modifikavimas svarbus struktūrai ir iRNR skaitymo tikslumui, panašiai kaip ir aptartos tRNR modifikacijos. Prokariotų ribosomas surinkus *in vitro* iš nepilnai modifikuotos rRNR buvo stebimas mažesnis translacijos efektyvumas. 2'-O-metilimo aktyvumo neturinčios mielės labai prastai auga. Daugiau nei dviejų pozicijų modifikacijų užblokavimas subvienetų sąveikos srityje mielėse *in vivo* pasireiškė sumažėjusiu aminorūgščių įjungimo greičiu, padažnėjusiu stop kodono „prašokimu“, padidėjusiu jautrumu antibiotikams, veikiantiems ribosomas, sumažėjusiu rRNR kiekiu ląstelėje ir pakitusia rRNR struktūra ribosomoje (Liang ir kt., 2007). Bakterijų rRNR metilinimas tiesiogiai siejasi su atsparumu antibiotikams, sąveikaujantiems su ribosoma. Pakitęs metilimo pobūdis (atsiradusi metilgrupė naujose vietose ar išnykusi ankstesnėse) pakeičia antibiotiko molekulės ir ribosomos sąveikos stiprumą, o tai lemia atsirandantį atsparumą (apžvelgta Motorin ir Helm, 2011).

Eukariotuose svarbus iRNR ir snRNR „kepurės“ metilinimas. Pseudouridinas ir 2'-O-metilribozė snRNR molekulėse gausiai aptinkami ir toliau sekoje. Jie išsidėsto funkciškai svarbiose snRNR srityse, atsakingose už splaiseosominio RNP susirinkimą ir sąveiką su pre-iRNR. U2 snRNR pavyzdžiu eksperimentiškai įrodyta, kad šios modifikacijos yra svarbios, o kai kurios netgi būtinos pre-iRNR splaisingui (apžvelgta Karijolic ir Yu, 2010).

1.2.3 RNR metiltransferazės

Žinomą RNR MTazių įvairovę šiuo metu sudaro apie 60 fermentų, turinčių šimtus homologų. Jie išskirstyti į keturias superšeimas. Kaip jau minėta, didžioji RNR MTazių dalis, pirmoji superšeima, priklauso Rosmano sanklodos MTazių klasei. Šie fermentai dažniausiai yra monomeriniai, nors žinoma ir di-, tri- ar net tetramerinių struktūrų atvejų. Šios ir visos kitos, išskyrus vieną, žinomos RNR MTazės kaip metilgrupės donorą naudoja AdoMet. Antroji pagal dydį grupė - tai tik 2'-O-ribozė metilinančios homodimerinės SPOUT MTazės. Trečiajai superšeimai priklauso nuo AdoMet priklausomos radikalinių reakcijos mechanizmą naudojančios RNR MTazės (apžvelgta Motorin ir Helm, 2011). Ketvirtojoje grupėje yra kol kas tik viena žinoma RNR MTazė (5-uracilo), metilinimo reakcijai kaip kofaktorių naudojanti ne AdoMet, o N5,N10-metilentetrahidrofoliatą ir FADH₂ (Urbonavičius ir kt., 2005).

Katalizinis mechanizmas priklauso nuo taikinio atomo. Ribonukleotidų azoto ir 2'-O atomai yra natūraliai nukleofiliniai. Todėl juos gali modifikuoti ir alkilinantys cheminiai reagentai, taip pat ir laisvas AdoMet. Tad šių taikinių atvejais MTazės tiesiog stipriai pagreitina reakciją reikiamu kampu priartindamos AdoMet prie metilinamo atomo. Taip pat jos gali padidinti nukleofiliškumą deprotonuodamos taikinio atomą. Taip veikia SPOUT superšeimos atstovės ir dalis Rosmano sanklodos MTazių, įskaitant C/D RNP (apžvelgta Motorin ir Helm, 2011). Čia galima sutikti ryškių konvergencinės evoliucijos pavyzdžių. Pvz., visose archėjose 2'-O-metilinamas tRNR C56 nukleotidas. Didžiojoje daugumoje rūšių tai atlieka SPOUT superšeimos

fermentas aTrm56. Tačiau *Pyrobaculum aerophilum* šio fermento neturi, o tą pačią modifikaciją atlieka C/D ribonukleoproteininis kompleksas, kurio sudėtyje esanti MTazė fibrilarinas priklauso Rosmano sanklodos klasei (apžvelgta Clouet-d'Orval ir kt., 2005).

5-metilgrupės susidarymui pirimidinuose reikalinga atitinkamo anglies atomo aktyvacija. Šiuo atveju katalizė neapsiriboja vien reaguojančių medžiagų priartinimu erdvėje. MTazė sudaro kovalentinį ryšį su pirimidino C6 atomu ir protonuoja susidariusį tarpinį junginį, kad jį stabilizuotų. Tokiu būdu C5 atomas tampa nukleofilinis ir prie jo gali prisijungti kofaktoriaus atiduodama metilgrupė. Po metilgrupės pernašos MTazės jungtis su C6 atomu nutraukiama ir metilintas pirimidinas išlaisvinamas (apžvelgta Motorin ir Helm, 2011). Tokį katalizės mechanizmą naudoja ir DNR citozino 5ą padėtį metilinančios MTazės, pvz. M.HhaI (Klimašauskas ir kt., 1994).

Metilinant adenozino C2 ir C8 atomus, o taip pat formuojant stambias hipermodifikacijų grupes dalyvauja radikalinės AdoMet MTazės. Reakcija pradedama nuo AdoMet atskeliant adenozilo radikalą, kuris po to atskelia vandenilio atomą nuo anglies atomo, kurį siekiama metilinti. Susidaręs bazės radikalas prisijungia elektroną ir metilgrupę, taip sunaudodamas dar vieną AdoMet molekulę (apžvelgta Motorin ir Helm, 2011).

RNR modifikavimas pagal taikinio atpažinimo mechanizmą gali būti skirstomas į nuo RNR priklausomą ir nepriklausomą. Nuo RNR nepriklausomas modifikacijas atlieka pavieniui veikiantys baltymai ar jų kompleksai, kurie atpažįsta tam tikras substratinių RNR sekas ir/arba struktūras. Pavyzdžiui, MTazė Hen1 atpažįsta savo substratus miRNR ir siRNR dupleksus pagal jiems būdingą ilgį (apie 21-24 nt) ir metilina 3' galinių nukleotidų 2'-O-ribozę (Huang ir kt., 2009). Nuo kreipiančiųjų RNR priklausomas modifikacijas vykdo RNR ir baltymų (ribonukleoproteininiai, RNP) kompleksai: kreipiančioji RNR komplementariomis bazių poromis atpažįsta substratinės RNR seką, o komplekso sudėtyje esantis fermentas katalizuoja modifikavimo reakciją. Dauguma RNR modifikacijų, įskaitant bazių metilinimą, yra atliekamos nuo RNR nepriklausomu būdu. Tačiau

pseudouridilinimą ir ribozės 2'-O-metilinimą atlieka tiek pavieniui veikiantys baltymai, tiek RNP, priklausomai nuo taikinio tipo ir organizmo (apžvelgta Motorin ir Helm, 2011; Clouet-d'Orval ir kt., 2005; Reichow ir kt., 2007). RNR-RNR komplementarumo pritaikymas modifikavimo taikiniui atpažinti ir iš to sekanti galimybė lengvai praplėsti taikinių spektrą buvo evoliucijos plačiai išnaudoti. Bakterijos turi tik nuo RNR nepriklausomus RNR modifikuojančius fermentus, tad subrendusioje *E.coli* rRNR aptinkama tik 4 2'-O-m ir 10 Ψ modifikacijų. Tuo tarpu RNP mechanizmą naudojančių organizmų *S.cerevisiae* rRNR turi 54 2'-O-m ir 44 Ψ, o *H.sapiens* - net 105 2'-O-m ir 91 Ψ (Decatour ir Fournier, 2002).

1.2.4 RNR modifikuojantys ribonukleoproteininiai kompleksai

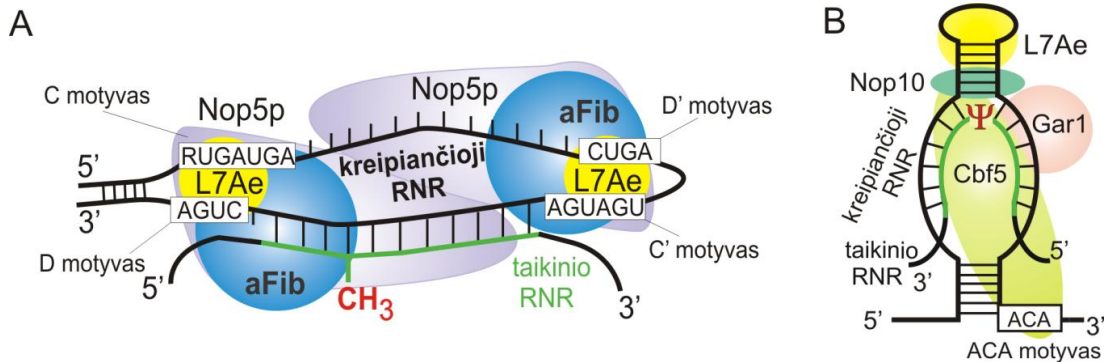
Pirmoji užuomina, kaip uridino izomerizacija į pseudouridiną ir 2'-O-metilinimas vyksta modifikuojant rRNR eukariotų ląstelėse, buvo gauta aptikus didelį kiekį mažų RNR branduolėlyje, kur vyksta ribosomų biogenezė. Pasirodė, kad didelis kiekis šių mažosiomis branduolėlio RNR (angl. *small nucleolar RNA*, snoRNR) pavadintų RNR turi sekų, komplementarių rRNR. Pagal konservatyvius sekų motyvus šios RNR buvo suskirstytos į dvi grupes: C/D sekų RNR ir H/ACA RNR. Kaip pasirodė vėliau, šios RNR jungiasi su specifiniais baltymais ir sudaro RNP kompleksus (snoRNP), modifikuojančius RNR: dauguma C/D RNP vykdo ribozės 2'-O-metilinimą, o dauguma H/ACA RNP uridiną verčia pseudouridinu. Kaip jau minėta, šie kompleksai modifikuoja RNR naudodami panašų mechanizmą – substratinę RNR komplementarumo principu atpažįsta kompleksų sudėtyje esanti kreipiančioji RNR, o specifinį katalizinį aktyvumą turintis kompleksas katalizuoja modifikavimo reakciją. Kompleksui susidaryti reikalinga ir po keletą pagalbinių, struktūrinių baltymų (pav. 1.3). Šie baltymai eukariotuose ir archėjose homologiški (apžvelgta Dennis ir kt., 2001; Reichow ir kt., 2007).

Archėjų rRNR buvo aptikta nemažai 2'-O-metilintų nukleotidų ir genomuose rastos homologinės eukariotų C/D RNP baltymams sekos – tai

paskatino ieškoti atitinkamų RNP ir šiuose organizmuose. Rastos kreipiančiosios RNR turėjo panašias charakteristikas kaip eukariotų snoRNR. Kadangi archėjos neturi branduolio ir branduolėlio, čia šios RNR vadinamos tiesiog mažosiomis (angl. *small*) – sRNR, o RNP - sRNP. Šiuo metu jau žinoma, kad C/D ir H/ACA RNP archėjose yra aktyvūs ir, kaip ir eukariotuose, pasižymi atitinkamai 2'-O-metilinimo bei pseudouridilino aktyvumu. Nemažai tokių archėjinių RNP buvo surinkti ir pasirodė esantys aktyvūs *in vitro*. Tai leido jiems pritaikyti nuodugnius enzimologinius ir struktūrinius tyrimus (Appel ir Maxwell, 2007; Lin ir kt., 2011; Xue ir kt., 2010 ir eilė kitų publikacijų). Kadangi dar nėra pavykę *in vitro* surinkti eukariotinių snoRNP, šie rezultatai svarbūs ne tik archėjų tyrimų sričiai, bet ir tarnauja kaip modelis sudėtingesnių eukariotinių RNP veiklos supratimui.

RNR modifikuojantys RNP yra paplitę eukariotuose ir archėjose, tačiau nerandami bakterijose. Tad labiausiai tikėtina, kad nuo RNR priklausomas RNR modifikavimo mechanizmas atsirado prieš atsiskiriant eukariotų ir archėjų linijoms, tačiau jau po jų bendro protėvio atsiskyrimo nuo bakterijų. Taigi – daugiau nei prieš 3 mlrd. metų (Forterre ir kt., 2007). Žinoma, neatmesta ir tikimybė, kad tokie RNP susiformavo visų organizmų bendrame protėvyje, o bakterijos vėliau juos prarado. Archėjų C/D ir H/ACA kompleksai turi bendrų struktūrinių elementų: RNR struktūrinį motyvą K-posūkį ir baltymą L7Ae (plačiau apie juos – 1.3.1 skyriuje). Tai rodo šių kompleksų bendrą kilmę. Kadangi RNR K-posūkiams ir baltymas L7Ae bei jo homologai aptinkami ir ribosomose, iškelta hipotezė, kad s(no)RNP pirmtakai kilo iš primityvaus transliacijos aparato. Tikriausiai pradžioje prie K-posūkių besijungiantys baltymai sudarė *in cis* veikiantį RNP, stabilizuojantį ir galbūt modifikuojantį primityvaus transliacinio aparato RNR. Vėliau jie atsiskyrė ir tapo *in trans* veikiančiais savarankiškais RNP. Jų specifiškumas sparčiai plėtėsi evoliucijos eigoje atrenkant kreipiančiųjų RNR sekų pakitimus, lemiančius galimybes RNP nukreipti į naujas vietas, kurių modifikavimas pasirodė esąs naudingas (Tran ir kt., 2004). Galbūt RNP virsmo, iš *cis* į *trans* būdu veikiančius, tarpinę stadiją galime stebėti ir šiandien: archėjų pre-tRNR-Trp turi introną su

kreipiančiaja C/D RNR, lemiančia dviejų pre-tRNR-Trp nukleotidų, esančių egzonuose, metilinimą (Clouet d’Orval ir kt., 2001). Teoriškai šioje sistemoje modifikavimas galėtų vykti *in cis* būdu, tačiau parodyta, kad vyksta *in trans* (Singh ir kt., 2004).



Pav. 1.3. Archėjų sRNP kompleksų, jų sąveikos su substratine RNR ir katalizuojamų modifikacijų schemas (pagal Watkins ir Bohnsack, 2011). RNR pažymėta juoda spalva, o substratinės RNR dalis, kurią atpažįsta kreipiančioji RNR - žalia. Katalizuojama modifikacija – raudona, struktūrinis baltymas L7Ae - geltona. **(A)** C/D RNP. Metiltransferazė aFib pažymėta mėlyna spalva, struktūrinis baltymas Nop5p – alyvine. Parodyti konservatyvūs C/D ir C'/D' motyvai. **(B)** H/ACA RNP. Pseudouridinsintazė Cbf5 pažymėta žalsva spalva. Struktūriniai baltymai Nop10 ir Gar1 – atitinkamai mėtų ir rausva spalvomis. Parodytas konservatyvus ACA motyvas.

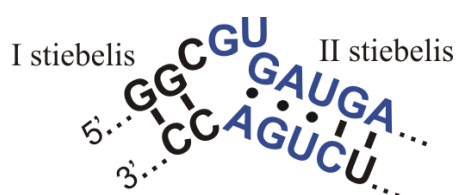
1.3 C/D ribonukleoproteininių kompleksų sandara ir funkcijos

1.3.1 C/D RNP komplekso nariai

Archėjų C/D RNP sudaryti iš kreipiančiosios C/D RNR, atsakingos už taikinio atpažinimą, ir baltymų: struktūrinių L7Ae ir Nop5p, bei metiltransferazės fibrilarino (aFib), naudojančio kofaktorių AdoMet (pav. 1.3A).

C/D RNR yra vienos iš geriausiai ištirtų nekoduojančių RNR. Jų ilgis archėjose siekia 50-70 nt, eukariotuose - dažniausiai daugiau nei 75 nt. Skiriamasis C/D RNR požymis, pagal kurį suteiktas ir šių RNR pavadinimas, yra konservatyvūs sekų motyvai: RUGAUGA (R - purinas) motyvas, vadinamas „C“, ir CUGA motyvas, vadinamas „D“. Jie išsidėsto šiose RNR atitinkamai netoli 5' ir 3' galų. Archėjų sRNR yra aptinkami ir vidiniai gana konservatyvūs, o dažnai ir identiški C ir D sekoms, atitinkamai C' bei D'

motyvai. Eukariotų snoRNR C' ir D' motyvai nėra konservatyvūs, šias sekas čia išskirti sunku. Sąveikaujant C ir D (taip pat ir C' bei D') sekos motyvams susidaro RNR tretinės struktūros elementas, vadinamas K-posūkiu (angl. *kink-turn*, *K-turn*) (Klein ir kt., 2001) (pav. 1.4). Jam būdinga asimetrinė trijų nukleotidų kilpa, iš abiejų pusių apsupta stiebeliais. Svarbus kilpos elementas – į išorę išsukta U bazė, kuri išsisuka dėl RNR struktūros ypatybių. Pirmasis stiebelis (kanoninis) susidaro bazėms poruojantis komplementariai. Jo nei sekos, nei ilgis nėra konservatyvūs. Antrasis – konservatyvus – stiebelis turi dvi ne Watsono-Kriko tipo G·A poras ir dar vieną nekanoninę porą. RNR tarp stiebelių stipriai susilenkia: susiformuoja maždaug 60° linkis (posūkis). Struktūrą stabilizuoja vandenilinės jungtys tarp bazių ir ribozijų pirmame stiebelyje ir vidinės kilpos, ir sąveikos tarp pirmojo ir antrojo stiebelių. Archėjų vidiniai C'/D' motyvai dažniausiai formuoja šiek tiek kitokį K-posūkio variantą – K-kilpą (angl. *K-loop*). Joje kanoninis stiebelis pakeistas trijų nukleotidų kilpa tarp C' ir D' sekų. Nepaisant to, struktūra išlaiko K-posūkiui būdingas erdvines ypatybes ir yra atpažįstama to paties C/D RNP baltymo L7Ae (Nolivos ir kt., 2005). K-posūkis yra dažnas ir svarbus elementas visų gyvybės domėnų įvairiose RNR. Sudarytas iš skirtingų sekos motyvų, bet pasižymintis būdinga tretine struktūra jis aptinkamas rRNR, iRNR, C/D RNR ir archėjų H/ACA RNR molekulėse, bei įvairiuose ribojungikliuose (K-posūkių duomenų bazė: <http://www.dundee.ac.uk/biocentre/nasg/kturn/index.php>, Schroeder ir kt., 2010). K-posūkis dažniausiai tarnauja kaip specifinių baltymų atpažįstama struktūra, taip pat stabilizuoja tretinę RNR ir RNP struktūrą (Klein ir kt., 2001; Schroeder ir kt., 2010).



Pav. 1.4. K-posūkio, esančio C/D RNR, antrinė struktūra. Konservatyvūs C ir D motyvai užrašyti mėlyna spalva. Watsono-Kriko tipo bazių poros pažymėtos brūkšneliais, ne Watsono-Kriko – rutuliukais (pagal Moore ir kt., 2004).

Į 5' pusę nuo D ir D' motyvų kiekvienoje C/D RNR yra išsidėsčiusios unikalios sekos, vadinamos antiprasminėmis arba kreipiančiosiomis (angl. *antisense, guide*). Šalia D motyvo esanti kreipiančioji seka vadinama D kreipiančiąja (angl. *D-guide*), šalia D' - atitinkamai D' kreipiančiąją seka. Šių sekų būdingas ilgis archėjose yra 12 nt, bet rasta ir 10-21 nt ilgio variantų (Nolivos ir kt., 2005; Tran ir kt., 2005). Eukariotų sekos šalia D ir D' motyvų gali būti ir kelių dešimčių nukleotidų ilgio, o tai lemia papildomas jų struktūras ir funkcijas, papildomą bazių poravimąsi šalia taikinių (apžvelgta Gagnon ir kt., 2009; Watkins ir Bohnsack, 2011; van Nues ir kt., 2011). Kreipiančiosios sekos komplementarumo principu atpažįsta substratinės RNR. Susidarius RNR dupleksui labai specifiskai metilinamas substratinės RNR nukleotidas, komplementarus penktam kreipiančiosios sekos nukleotidui, skaičiuojant nuo D (ar D') konservatyvaus motyvo (Appel ir Maxwell, 2007, pav. 1.3). Archėjų C/D RNR metilinimui nukreipti gali naudoti abi (D ir D') kreipiančiąsias sekas. Jų atpažįstamos sekos gali būti tiek vienoje molekulėje, pvz. dvi skirtingos vietos rRNR, tiek dviejose skirtingose RNR, pvz. rRNR ir tRNR. Tačiau kai kurioms archėjų C/D RNR nustatytas tik vienos iš kreipiančiųjų sekų pakankamas komplementarumas kokiam nors ląsteliniam RNR substratui (C/D RNR duomenų bazė, <http://lowelab.ucsc.edu/snoRNAdb/>, Omer ir kt., 2000). Archėjų C/D RNR kreipiančiosiose sekose taip pat pasitaiko nukrypimų nuo konservatyvaus 12 nt ilgio, tačiau dažnai tokių sRNR kita kreipiančioji seka būna būdingo 12 nt ilgo. Toks ilgis yra svarbus efektyviam metilinimui. Vienoje C/D RNR molekulėje pakeitus abiejų 12-os nt kreipiančiųjų sekų ilgį, RNP metilinimo funkcija buvo prarasta. Pakeitus tik vienos kreipiančiosios sekos ilgį, smarkiai krito tik jos atpažįstamo substrato metilinimo efektyvumas. Tačiau galbūt 12 nt kreipiančiosios sekos ilgis nėra svarbus visoms archėjų C/D RNR ir/arba ilgesnė kreipiančioji seka galėtų, kaip ir eukariotuose, atlikti papildomas funkcijas arba sudaryti papildomas struktūras atstumo tarp C/D motyvų suvienodinimui (Tran ir kt., 2005). Tiriant C/D RNR iš termofilinės archėjos *Pyrococcus furiosus* buvo aptikta, kad dauguma jų yra žiedinės. Tyrimo

autoriai mano, kad C/D RNR galų sujungimas svarbus antrinės šių RNR struktūros palaikymui aukštoje temperatūroje ir kad tai yra pagrindinė C/D RNR forma termofilinių archėjų ląstelėse (Starostina ir kt., 2004).

Susidarant archėjų C/D RNP kompleksui, prie sRNR, atpažindamas K-posūkį ir K-kilpą, rišasi baltymas **L7Ae**. Jis stabilizuoja C/D RNR konformaciją, inicijuoja C/D RNP komplekso susirinkimą ir atlieka jame struktūrinę funkciją. K-posūkio ir L7Ae sąveika archėjose būdinga ne tik C/D RNP: ji randama ir didžiajame ribosomos subvienete bei H/ACA RNP kompleksuose. L7Ae baltymas priklauso L7Ae/L30 baltymų šeimai. Tai nedideli, apie 120 amr ilgio, α - β - α „sumuštinio“ struktūros baltymai, turintys konservatyvų RNR surišimo centrą. Nors archėjose L7Ae dalyvauja įvairiuose RNP, eukariotuose jo homologai specializuoti ir vienas kito nepakeičia. Tačiau jie taip pat dalyvauja įvairiuose K-posūkį turinčiuose RNP: C/D RNP ir U4 splaisosominiame RNP - homologas 15,5 kDa (Snu13 mielėse), kiti - didžiajame ribosomos subvienete, selenobaltymų iRNP (apžvelgta Dennis ir Omer, 2005) ir ribonukleazėje P (Cho ir kt., 2010). Eukariotų C/D RNP narys 15,5kD baltymas, skirtingai nei archėjų L7Ae, rišasi tik su K-posūkiu, bet nesiriša su K-kilpa. H/ACA RNP eukariotuose nebeturi K-posūkio, bet vis tiek turi L7Ae homologą Nhp2, kuris komplekse tikriausiai laikosi dėl baltymo-baltymo sąveikų (apžvelgta Watkins ir Bohnsack, 2011).

C/D RNR ir L7Ae kompleksą atpažįsta ir prie jo rišasi baltymas **Nop5p**. Jis komplekse atlieka struktūrinę funkciją, palaiko reikiamą kreipiančiosios RNR konformaciją, tarpininkauja aFib prisijungimui ir turi įtakos AdoMet surišimui aFib kofaktoriaus surišimo kišenėje. Šis baltymas sudarytas iš N-galinio domeno, susisukusių spiralių (angl. *coiled coil*) domeno ir C-galinio domeno. N-galinis domenas formuoja paviršių, komplementarų aFib ir tai lemia stiprią šių baltymų sąveiką. Nustatyta, kad jie sąveikauja tarpusavyje nepriklausomai nuo kitų komplekso narių ir prie komplekso jungiasi jau kaip heterodimeras. Viena Nop5p Arg aminorūgšties liekana sąveikauja su aFib AdoMet surišimo kišene ir taip palaiko ją kofaktoriui surišti tinkamos konformacijos, o tai svarbu aFib kataliziniam aktyvumui (Aittaleb ir kt., 2004).

Susisukusių spiralių domenas, susidedantis iš dviejų lygiagrečių α -spiralių, lemia Nop5p homodimerizaciją, kuri svarbi palaikant C/D RNP funkciją (Zhang ir kt., 2006). Konservatyvus C-galinis domenas sąveikauja su L7Ae ir C/D RNR kompleksu, sudarydamas ryšius tiek su RNR, tiek su L7Ae. Tačiau nei Nop5p, nei aFib–Nop5p dimeras neturi stipraus giminingumo sRNR ar L7Ae atskirai. Vis dėlto, esant pakankamai aukštoms Nop5p koncentracijoms ($\geq 1 \mu\text{M}$), jis geba surišti sRNR ir nesant L7Ae (Bortolin ir kt., 2003). Atskirtas nuo pilno baltymo, C-galinis domenas gali jungtis su L7Ae-C/D RNR kompleksu beveik kaip ir pilnas baltymas (Hardin ir kt., 2009). Šiame domene esanti α -spirale ir gretima kilpa įsiterpia tarp D ir D' kreipiančiųjų sekų, palaiko jas atskirtas ir taip tikriausiai apsaugo nuo tarpusavio sąveikos, kuri trukdytų sąveikai su substratinėmis RNR (Lin ir kt., 2011; Ghalei ir kt., 2010; Ye ir kt., 2009). Didžiąją C-galinio domeno dalį sudaro konservatyvus vadinamasis Nop domenas, būdingas Nop baltymų superšeimai. Tokį domeną turi ir eukariotų baltymas Prp31, dalyvaujantis splaisosominiuose snRNP ir ten besirišantis prie snRNR-15,5kDa komplekso. Eukariotų C/D RNP kompleksuose baltymą Nop5p atitinka du jo homologai - Nop58 ir Nop56, kurie jungiasi atitinkamai tik prie C/D ir C'/D' vietų. Manoma, kad šie baltymai su šiek tiek skirtingomis jungimosi prie RNP savybėmis susidarė po geno duplikacijos. Eukariotų C'/D' vieta nėra surišama 15,5kD baltymo, tad Nop56 evoliucijos eigoje įgavo galimybę rištis su RNR nepriklausomai nuo jo (apžvelgta Reichow ir kt., 2007; Gagnon ir kt., 2009).

aFib (archėjų fibrilarinas) yra C/D RNP katalizinis baltymas – metiltransferazė, katalizuojanti metilgrupės perkėlimą nuo AdoMet ant substratinės RNR 2'-O atomo. Šio baltymo prisijungimas prie archėjų C/D RNP vyksta per sąveiką su Nop5p. Būdamas RNP sudėtyje jis sąveikauja su kreipiančiosios-substratinės RNR dupleksu ties pirmu-šeštu nukleotidais, skaičiuojant nuo D^(c) sekos (Lin ir kt., 2011). Labai konservatyvus aFib C-galinis domenas pasižymi Rosmano tipo sankloda ir turi nuo AdoMet priklausomoms MTazėms būdingą struktūrinį AdoMet surišimo motyvą. Archėjų fibrilarinas yra homologiškas pavieniui veikiančioms RNR 2'-O-

ribozės MTazėms, tokioms kaip *E.coli* RrmJ, kuri metilina rRNR, tRNR ir iRNR. O taip pat - eukariotų C/D snoRNP kompleksų fibrilarinui. Visos šios MTazės substrato jungimosi kišenėje turi panašiai erdvėje išsidėsčiusias keturias konservatyvias aminorūgštis, kurių trys (Lys-Asp-Lys) būtinos, o ketvirtoji (His arba Glu) svarbi aktyvumui (Aittaleb ir kt., 2004; Hager ir kt., 2002). O štai N-galiniai archėjų ir eukariotų fibrilarinių domenai nėra homologiški. Archėjose jie yra daug trumpesni ir pasižymi sekos įvairove tarp skirtingų rūšių, nors struktūriškai išlieka panašūs. Eukariotų fibrilarinams yra būdingas N-galinis glicino-arginino gausus (angl. *glycine-arginine-rich*, GAR) domenas, reikalingas laikinoms sąveikoms su papildomais baltymais. Tai svarbu eukariotų C/D snoRNP susirinkimui ir lokalizacijai branduolėlyje (apžvelgta Gagnon ir kt., 2009).

1.3.2 C/D RNP struktūra ir katalizės mechanizmas

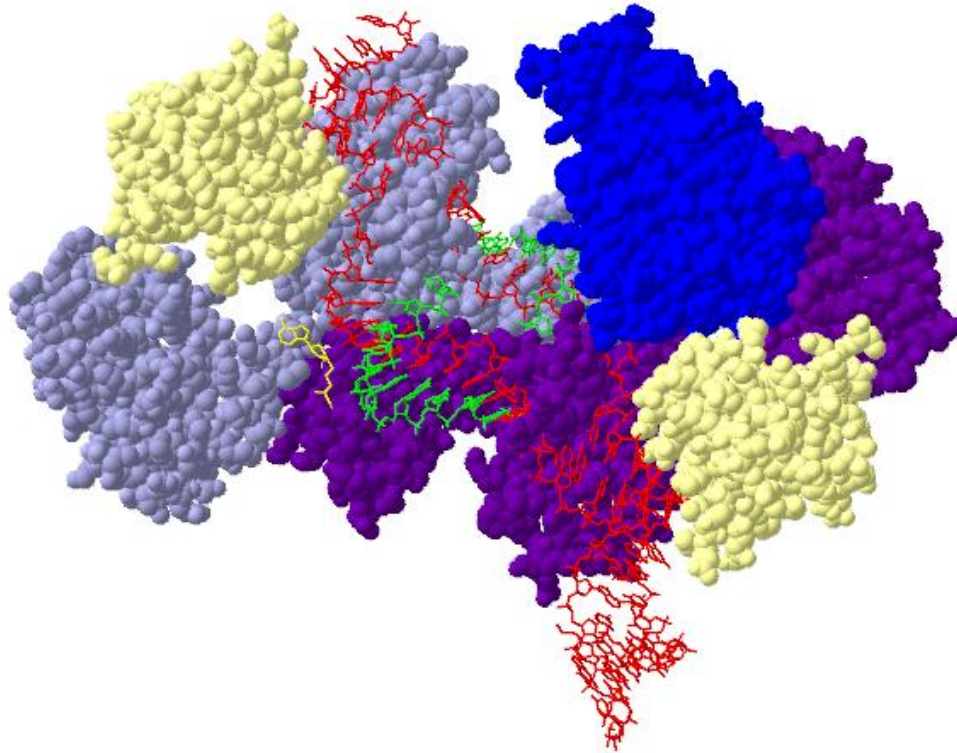
Archėjų C/D RNR turi dvi kreipiančiąsias sekas ir dvi K-struktūras, prie kurių prisijungia po vieną kiekvieno C/D RNP baltymo kopiją. Taip susidaro D ir D^c pusių hemi-RNP kompleksai, kurie gali metilinti kiekvienas savo atpažįstamą substratinę RNR. C/D RNP komplekso susirinkimas vyksta paeiliui. Pirmiausia, prie C/D RNR K-struktūrų rišasi ir jas stabilizuoja L7Ae. Tada prie jų rišasi Nop5p-aFib dimeras. Ir, galiausiai, - substratinė RNR. Susiformavus tokiam kompleksui sąlygojamas tikslus metilinimo aktyvumo nukreipimas į taikinio nukleotidą (pav. 1.3). Pašalinus Nop5p dimerizaciją lemiantį susuktą spiralių domeną arba sumažinus C/D RNP iki asimetrinio hemi-komplekso, paliekant tik vieną sRNR C/D motyvą, fermentinis aktyvumas stipriai krito. Įvedus sRNR trūkį ties C seka, buvo prarastas griežtas specifiškumas taikinio nukleotidui (Zhang ir kt., 2006; Hardin ir Batey, 2006). Visa tai rodo, kad C/D RNP aktyvumui ir specifiškumui užtikrinti svarbi narių tarpusavio sąveika ir išsidėstymas vienas kito atžvilgiu, bei suformuojama stabili komplekso erdvinė struktūra.

Nop5p N-galinis domenas su prisijungusiu aFib formuoja komplekso katalizinę dalį. Skirtingose žinomose C/D RNP kristalinėse struktūrose ji

užima skirtingas padėtis kitų Nop5p domenų atžvilgiu. Pastebėta, kad esant substratinei RNR, įvyksta žymus Nop5p konformacijos pokytis, kuris pakeičia aFib padėtį komplekse, priartindamas jį prie taikinio nukleotido. Tad tikriausiai jungtis, jungianti Nop5p N-galinį ir susisukusių spiralių domenus yra itin lanksti, o katalizinės dalies judesys nuo „atidarytos“ iki „uždarytos“ formos, ir atvirkščiai, gali būti fermentinio mechanizmo dalis (Ye ir kt., 2009; Xue ir kt., 2010; Lin ir kt., 2011; Oruganti ir kt., 2007).

Pilniausia nustatyta kristalinė C/D RNP struktūra sudaryta iš sRNR, turinčios du K-posūkius, ties kuriais prisirišę po visą trejetą archėjos *Sulfolobus solfataricus* baltymų, ir prie abiejų kreipiančiųjų sekų prisijungę 10 nt ilgio substratiniai RNR oligonukleotidai (Lin ir kt., 2011, pav. 1.5). Kreipiančiosios-substrato dupleksai yra RNR jungimosi kanale, kuri suformuoja dimerinio Nop5p susisukusių spiralių domenai iš apačios ir C-galiniai domenai galuose, bei du aFib šonuose. Šioje struktūroje abu aFib išsidėstę ties substrato-sRNR dupleksu iki šeštojo nukleotido, skaičiuojant nuo D sekos, taigi - apimant taikinio nukleotidą. Tad tokia struktūra galėtų atspindėti abipus aktyvią RNP konformaciją. Substrato-sRNR duplekso segmentas, su kuriuo sąveikauja aFib, yra A formos spiralė ir aFib jos niekaip neiškreipia. Būdamas RNP sudėtyje, aFib RNR spiralę atpažįsta nemažu kiekiu vandenilinių jungčių, nukreiptų į fosfatus ir ribozių 2'-OH grupes, taip pat van der Valso sąveikomis ir struktūriniu formos atitikimu. aFib iš vienos pusės atsiremia į L7Ae, o iš kitos pusės - į Nop5p. Šie kontaktai tikriausiai fiziškai trukdo aFib slysti į kurią nors pusę ir taip tikriausiai yra apsprendžiamas tikslus taikinio metilinimas būtent ties penktuoju kreipiančiosios sekos nukleotidu. Be to, aFib yra stabilizuojamas stiprios sąveikos su Nop5p. Galiausiai, fiksuota substrato-kreipiančiosios RNR duplekso padėtis taip pat svarbi modifikavimo vietos specifiškumui (Lin ir kt., 2011). Kaip minėta, įvedus trūkį tarp substratą atpažįstančio regiono ir C ar C' sekos, prarandamas stiprus specifiškumas taikinio nukleotidui. Matyt, tuomet dupleksas įgyja daugiau padėties laisvių, o tai leidžia aFib pasiekti skirtingas substrato vietas (Hardin ir Batey, 2006). Taigi, modifikavimo

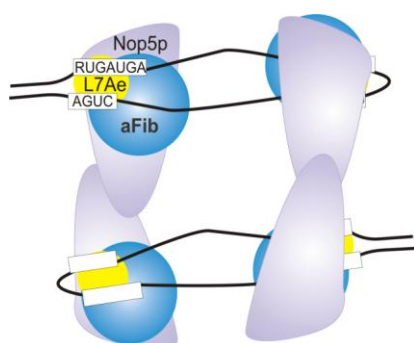
specifiškumą apsprendžia aFib dvigrandininės RNR struktūros atpažinimas, apribotas katalizinio centro nepaslankumo surišus substratą, ir tinkamas substrato išdėstymas (Lin ir kt., 2011).



Pav. 1.5. Archėjų C/D RNP kristalinė struktūra, kartu su AdoHcy ir substratiniais oligonukleotidais, pagal Lin ir kt., 2011. Vienas aFib neparodytas, kad matytųsi AdoHcy ir surištas substratas. aFib pažymėtas mėlyna, L7Ae – geltona, Nop5p – vienas violetine, kitas alyvine, kreipiančioji RNR – raudona, substratiniai RNR oligonukleotidai – žalia, AdoHcy – tamsiai geltona spalva. PDB kodas 3PLA. Paveikslėlis padarytas programa *Swiss-PdbViewer*.

Nors aprašytoji archėjų C/D RNP struktūra (mono-RNP) susideda iš vienos kreipiančiosios RNR ir dviejų kiekvieno baltymo molekulių, tačiau elektroninės mikroskopijos būdu parodyta, kad archėjų C/D RNP *in vitro* gali sudaryti ir dar didesnę struktūrą - di-RNP (pav. 1.6) (Bleichert ir kt., 2009). Šiuo atveju vieną kompleksą sudaro dvi kreipiančiosios RNR ir po keturias molekules kiekvieno iš baltymų. Tokiame komplekse sRNR išsidėsto ne išilgai vieno Nop5p dimero, o tarp dviejų tokių dimerų, susiformuojant tarsi kvadratu, kurio dvi priešpriešines kraštines sudaro Nop5p dimerizacijos sąveiką palaikantys susuktų spiralių domenai, o kitas dvi – sRNR kreipiančiosios sekos. Nors nėra aišku, ar tokia struktūra formuojasi *in vivo*,

biocheminiais tyrimais *in vitro* parodyta, kad di-RNP yra kataliziškai aktyvūs. Di-RNP eksperimentiškai nustatyti dirbant su C/D RNP komponentais iš įvairių archėjų: *Methanocaldococcus jannaschii* (Bleichert ir kt., 2009), *Pyrococcus furiosus* (Ghalei ir kt., 2010), *P.abysyi*, *Archaeoglobus fulgidus* (Bower-Phillips ir kt., 2012), priklausančių archėjų tipui *Euryarchaeota* ir *Sulfolobus solfataricus* (Lin ir kt., 2011), priklausančios kitam tipui - *Crenarchaeota*. Tad tokia struktūra gali būti plačiai paplitusi visame archėjų domene. Eksperimentuose su *S.solfataricus* C/D RNP, tie patys komponentai viename mišinyje formavo ir mono-, ir di-RNP. Abu variantai sąveikavo su substratiniais RNR oligonukleotidais ir buvo kataliziškai aktyvūs (Lin ir kt., 2011). Tai rodo Nop5p ir aFib įvairių sąveikų su kreipiančiąja ir substratine RNR lankstumą.



Pav. 1.6. C/D di-RNP modelis. L7Ae pažymėtas geltona spalva, aFib - mėlyna, Nop5p - alyvine, kreipiančioji RNR – juoda. Konservatyvios sekos pažymėtos baltais stačiakampiais (pagal Bleichert ir kt., 2009).

Įkomponuojant dvi kristalines mono-RNP struktūras į di-RNP elektroninės mikroskopijos modelį, aFib atsiduria per toli nuo substrato. Todėl buvo iškelta kryžminės katalizės hipotezė, teigianti, kad di-RNP sudėtyje esantis aFib kalalizuoja substratinės RNR nukleotido, esančio arčiau kito C/D motyvo, metilinimą. Tokiai aFib sąveikai su kreipiančiosios-substratinės RNR dupleksu erdviškai trukdytų komplekse esantis L7Ae, todėl pasiūlyta mintis, kad nuo aktyvios RNP dalies pastarasis disocijuoja (Xue ir kt., 2010). Taigi, sąveikos su substratu modelis gerokai skiriasi mono- ir di-RNP atveju. Būtų labai neįprasta jei C/D RNP galėtų vykdyti metilinimą dviem skirtingais būdais.

Šiuo metu vykdomi C/D RNP tyrimai, siekiant nustatyti komplekso struktūrą tirpale, pasitelkiant branduolio magnetinį rezonansą ir smailaus kampo rentgeno bei neutronų spindulių išbarstymą (angl. *small angle X-ray/neutron scattering*, SAXS ir SANS). Pirminiai duomenys patvirtina di-RNP egzistavimą tirpale, tačiau rodo kitokį sRNR ir baltymų išsidėstymą komplekse, nei aprašyta Xue ir kt., 2010. Šis naujausias modelis, tikimasi, galutinai paaiškins, kaip parenkamas taikinyš ir kaip komplekso struktūra kinta viso katalizės ciklo metu (Audronė Lapinaitė, asmeninio pokalbio informacija).

Katalizės cheminis mechanizmas nėra tiesiogiai išaiškintas fibrilarino tipo MTazėms. Tačiau yra nustatyta, kad jos sudaro monofiletinę grupę su RrmJ tipo RNR 2'-O-MTazėmis ir turi aktyviajame centre taip pat erdvėje išsidėčiusias konservatyvaus motyvo aminorūgštis (K-D-K-E RrmJ MTazėse ir K-D-K-H fibrilarinuose) (Feder ir kt., 2003). Todėl manoma, kad šios MTazės naudoja tokį patį katalizės mechanizmą, kuris buvo pasiūlytas ištyrus *E.coli* RrmJ MTazę pakeičiant aktyvaus centro aminorūgštis (Hager ir kt., 2002). Manoma, kad vienas iš konservatyviųjų Lys tiesiogiai deprotonuoja taikinio nukleotido 2'-OH grupę. Tam reikia, kad pats Lys būtų deprotonuotas, o tai tikriausiai lemia teigiamai įkrautas AdoMet sieros atomas ir kito konservatyvaus Lys aminogrupė. Tai paaiškina, kodėl bet kurio iš šių konservatyvių Lys pakeitimai praktiškai panaikina metiltransfrazinį aktyvumą. Deprotonuota 2'-O grupė atakuoja AdoMet metilgrupę ir įvyksta S_N2 tipo pernaša. Asp ir Glu (His), manoma, stabilizuoja aktyviojo centro narių krūvį ir bendrą architektūrą. Beje, kad konservatyvusis Asp yra būtinas AdoMet surišimui ir fermentiniam aktyvumui, parodyta ir tiesiogiai fibrilarino mutageneze (Aittaleb ir kt., 2004).

Tad C/D RNP tyrimai, norint galutinai paaiškinti visą katalizės mechanizmą ir ryšį tarp mono- bei di-RNP, dar nebaigti. Šioje srityje sulauksime dar bent keleto įdomių ir galbūt dabartinį požiūrį pakeisiančių publikacijų.

1.3.3 C/D RNP funkcijos

Pagrindinė archėjų ir eukariotų C/D RNP funkcija yra įvairių ląstelės RNR 2'-O-metilinimas. Greta pavieniui veikiančių MTazių jie yra atsakingi už rRNR ir tRNR metilinimą archėjose ir rRNR bei snRNR metilinimą eukariotuose. RNR 2'-O-metilinimo reikšmė buvo aptarta 1.2.1 ir 1.2.2 skyriuose. 2'-O-metilinimas eukariotų ir archėjų rRNR, taip pat archėjų tRNR yra katalizuojamas beveik vien C/D RNP. Pavyzdžiui, mielėse parodyta, kad jie atsakingi už 51-ą iš 55-ių rRNR 2'-O-m (apžvelgta Yu ir kt., 2005). Tad nenuostabu, kad fibrilarino taškinės mutacijos gali būti letalios, kaip parodyta mielėse (Tollervey ir kt., 1993). O žmonėms autoimuninis atsakas prieš fibrilariną sukelia ligą sisteminę sklerodermą, pasireiškiančią odos ir kai kurių vidaus organų pažeidimais. Iš čia ir baltymo pavadinimas, nes skleroderma sergančio paciento autoimuninis serumas reagavo su įvairių ląstelių branduolėlio fibrilinais dariniais (Ochs ir kt., 1985).

Parodyta, kad, be metilinimo, C/D RNP kompleksai turi ir kitų funkcijų RNR metabolizme. Eukariotuose C/D RNP dalyvauja specifiškai endonukleolitiškai karpant pre-rRNR. Taip pat, panašiai kaip šaperonai baltymams, padeda (pre-)rRNR teisingai susilankstyti. Pastaroji funkcija tikriausiai būdinga ir archėjų C/D RNP. Mielėse parodyta, kad pre-rRNR 2'-O-metilinimas prasideda jau transkripcijos metu. Taigi, tiek metilinimo, tiek "rRNR šaperono" funkcija gali būti atliekama to paties C/D RNP (apžvelgta Watkins ir Bohnsack, 2011). Hipertermofilinėms archėjoms ypatingai reikalingas rRNR stabilizavimas ribosomų biogenezės eigoje, tad dviguba C/D RNP metilinimo ir šaperoninė funkcija turėtų būti joms taip pat labai svarbi. Nenuostabu, kad, kaip jau minėta, pastebėtas ryšys tarp archėjų rūšių optimalios augimo temperatūros ir C/D RNP genų skaičiaus. C/D RNP „rRNR šaperonų“ funkcijai įvertinti buvo atliktas 16S rRNR susilankstymo kelių kompiuterinis modeliavimas nesant ir esant sRNR. Nustatyta, kad sRNR, turinčių dvi kreipiančiąsias sekas, prisijungimas gali žymiai palengvinti

tinkamą 16S rRNR susilankstymą esant temperatūrai, artimai tirtų (hiper)termofilų augimo optimumui (Schoemaker ir Gulyaev, 2006).

Kai kurios snoRNR eukariotuose biogenezės metu yra sukarposos iki į miRNR panašių fragmentų ir gali dalyvauti iRNR nutildyme (Brameier ir kt., 2011; Ono ir kt., 2011). Smegenims būdinga C/D RNR MBII-52 komplementari serotonino receptoriaus iRNR. Biogenezės metu ji sukarposoma iki į miRNR panašios RNR ir įtakoja serotonino pre-iRNR redagavimą bei šios ir keleto kitų iRNR alternatyvų splaisingą (Kishore ir kt., 2010; Vitali ir kt., 2005). Pasikartojančius MBII-52 ir panašių snoRNR genus turintis genomo regionas pasižymi imprintingu ir yra susijęs su Prader-Willi sindromu (Bortolin-Cavaillé ir Cavaillé, 2012). Pakitusi snoRNR raiška parodyta kaip galimas vėžinių susirgimų žymuo (Teittinen ir kt., 2013). Kelios konservatyvios C/D RNR žinduolių ląstelėse yra svarbios apoptotiniams atsakui į oksidacinį stresą (Michel ir kt., 2011).

1.3.4 C/D RNP taikinio atpažinimo ypatumų tyrimai ir panaudojimas

Kadangi C/D RNP baltymų prisirišimui reikalingos tik C/D RNR konservatyviosios sekos, kreipiančiąsias sekas galima keisti. Kartu atitinkamai pasikeičia ir atpažįstamas bei modifikuojamas taikiny. Parodyta, kad taip nukreipti 2'-O-metilinimą į naujai parinktas rRNR vietas galima netgi žinduolių ląstelėse *in vivo*. Be to, ląstelėse vykdant raišką joms nebūdingos kreipiančiosios RNR ir atitinkamos ląstelei nebūdingos neribosominės RNR, metilinama ir ši egzogeninė RNR (Cavaillé ir kt., 1996).

Kadangi aktyvų archėjų C/D RNP galima surinkti *in vitro*, šių kompleksų taikinio atpažinimo ir modifikavimo ypatumai buvo ištirti itin nuodugniai. Pirmiausiai parodyta, kad net ir vienos RNP pusės nukreipiamam metilinimui reikalingas pilnas, t.y. iš dviejų hemi-RNP sudarytas, kompleksas (Tran ir kt., 2003). Taip pat - kad efektyviam metilinimui reikia išlaikyti optimalų 12 nt kreipiančiosios sekos ilgį (Tran ir kt., 2005). RNR grandinių sąveika Watsono-Kriko bazių poromis yra būtina ne tik ties metilinu nukleotidu, bet ir aplink jį. Netgi G:U pora, kuri sudaro tarpusavio

vandenilines jungtis, nėra atpažįstama kaip tinkama. Vis dėlto, pirmojo nukleotido, skaičiuojant nuo D sekos, bazių pora nėra svarbi (Appel ir Maxwell, 2007). Tai patvirtina ir C/D RNP bei substrato kristalinė struktūra – šis nukleotidas nedalyvauja RNR duplekso susidaryme (Lin ir kt., 2011). Tad iš 12 kreipiančiosios sekos nukleotidų, bazių poras su substratu gali sudaryti 11. Tolesnių nei pirmos pozicijų bazių porų nesutapimai gali būti pradėti toleruoti reakcijos tirpale esant 50 mM MgCl₂ koncentracijai. Tai didelė, nefiziologinė ir *in vitro* eksperimentuose taip pat paprastai nenaudojama MgCl₂ koncentracija. Mg²⁺ jonai veikia RNR struktūrą, tad tokia priklausomybė rodo sąveikaujant kreipiančiajai ir substratinei RNR susidarančios struktūros svarbą fermentiniam C/D RNP aktyvumui. Esant 12 nukleotidų tarpui tarp C ir D sekų, minimalus metilinamo substrato ilgis – 9 nt (komplementarumui prasidedant nuo D sekos). Tačiau tokio trumpo substrato metilinimas yra labai neefektyvus. 14 nt ilgio substratai, turintys pilną 12 nt komplementarumą kreipiančiajai sekai, Appel eksperimentuose buvo metilinami mažiau nei vienos fermentinės apšukos per 30 min greičiu. O štai prailginus substratinį RNR oligonukleotidą 5-iais nt į kurią nors pusę nuo komplementarumo kreipiančiajai RNR ribos, stebėtas apie 6 kartus padidėjęs metilinimo efektyvumas. Papildomi nukleotidai greičiausiai sąveikauja su sRNP baltymais, stabilizuoja substratinės RNR sąveiką su sRNP ir/arba yra reikalingi sRNP ir modifikuoto substrato komplekso išardymui. Taip paspartinamos fermentinės apšukos. C/D RNP gali metilinti ilgas struktūruotas RNR (pavyzdžiui, plaukų smeigtuko pavidalo), o tai rodo, kad kompleksas sugeba palengvinti substratinės RNR išsisukimą. Vis dėlto, taikiniai substratinės RNR kilpose metilinami efektyviau nei stiebeliuose, tad reakcijos efektyvumas priklauso ir nuo taikinio padėties substratinės RNR struktūroje. Pavieniai deoksiribonukleotidai taikinio sekoje, išskyrus, žinoma, 5-ąją padėtį, didelės įtakos komplekso aktyvumui neturi. Tačiau ilgesni jų intarpai (5-ių ir daugiau nt) stipriai sumažina ar netgi visai panaikina metilinimo aktyvumą. Tai vėlgi rodo, kad metilinimo aktyvumui labai svarbi kreipiančiosios RNR ir substrato duplekso struktūra, kuri, tikriausiai, šiuo

atveju nėra vienoda sąveikaujant RNR-RNR ir RNR-DNR sekoms (Appel ir Maxwell, 2007).

Pastebėta, kad metilinimo efektyvumas gali skirtis priklausomai nuo kiekvienos kreipiančiosios RNR ir netgi skirtis tarp D ir D' kreipiančiųjų sekų toje pačioje sRNR (Singh ir kt., 2004; Appel ir Maxwell, 2007). Skirtingos skirtingų sRNR UV sukeltos sąsuvos su Nop5p rodo, kad jis sudaro šiek tiek skirtingas sąveikas su kiekviena RNR (Ghalei ir kt., 2010). Taip pat, skirtingos kreipiančiosios sekos pasižymi skirtinga metilinimo efektyvumo priklausomybe nuo NaCl koncentracijos, skirtinga tolerancija, priklausančia nuo MgCl₂ koncentracijos, bazių porų nesutapimams bei skirtinga tolerancija deoksiribonukleotidams taikinio sekoje (Appel ir Maxwell, 2007). Tai tikriausiai priklauso nuo kiekvienos sRNR sekos ir, atitinkamai, struktūros. Parodyta, kad skirtingos kreipiančiosios sekos lemia skirtingą sRNR susilankstymą, sąveiką su substratu ir šiek tiek skirtingus RNP susirinkimo kelius (Gagnon ir kt., 2006).

Galimybė keisti kreipiančiąją seką leidžia ne tik nuodugniai tirti C/D RNP taikinio atpažinimo ypatumus, bet ir panaudoti šį kompleksą negamtiniams RNR taikiniams metilinti. Ribozės 2'-OH grupė, kaip potencialus vandenilinės jungties donoras, gali būti svarbi RNR susisukimui, sąveikai su baltymais ir funkcijai, dalyvauti cheminėse reakcijose. Jos praradimas dėl metilinimo gali turėti atitinkamą poveikį ir suteikti žinių apie konkrečių RNR nukleotidų 2'-OH grupės biologinę svarbą. Pavyzdžiui, mielėse, pasitelkiant C/D RNR kreipiančiosios sekos pakeitimą, metilinimas buvo nutaikytas į keletą ribosominių RNR nukleotidų, kurie, kaip buvo žinoma, svarbūs *E.coli* ribosomų veiklai. Taip buvo patvirtinta, kad šių nukleotidų 2'-OH grupės svarbios ir eukariotuose. Vėliau buvo sukurta visa C/D RNR biblioteka, skirta metilinimą nukreipti į kiekvieną nukleotidą pasirinktame 810-ies nt ilgio regione 25S rRNR molekulėje. Taip rRNR sekoje buvo nustatyta dar keletas nukleotidų, kurių 2'-OH grupės užblokavimas metiliniu pasireiškė stipriais mielių augimo sutrikimais (Liu ir kt., 2001). Panašiai, sukonstravus specifines kreipiančiąsias C/D RNR,

mielėse *in vivo* tirta ir telomerazės RNR (Huang ir Yu, 2010). Sintetinė C/D RNR, išvirkšta į *Xenopus* oocitus ir metilinią nukreipianti į pre-iRNR šakojimosi tašką, panaudota užkirsti kelią splaisingui (Ge ir kt., 2010). Panašaus į miRNR veikimo C/D RNR, pakeitus jose į 3' pusę nuo D' sekos (skirtingai nei įprastos kreipiančiosios sekos) esančią kreipiančiąją seką, panaudotos selektyviam pasirinktų genų nutildymui (Ono ir kt., 2010).

1.4 Specifinio RNR žymėjimo būdai

Tiriant įvairių ląstelinių ir sintetinių RNR savybes, struktūrą ir funkcijas dažnai svarbu RNR pažymėti radioaktyvia, fluorescencine, giminingumo ar kitokia žyme. Tokios žymės leidžia tirti RNR sąveiką su baltymais, lokalizaciją ląstelėje; prikabinti RNR prie kieto paviršiaus; tirti RNR judesius fluorescencijos rezonansinės energijos pernašos (angl. *fluorescence resonant energy transfer*, FRET) metodu ir pan. Gerai žinomi būdai kaip prijungti žymes 5' ir 3' RNR galuose: pasitelkiant atitinkamus fermentus (T4 polinukleotidkinazę, T7 RNR polimerazę, poli(A)polimerazę, T4 RNR ligazę) ir radioaktyvių izotopų turinčius arba modifikuotus, cheminiam žymės prijungimui tinkamus, nukleotidus (pvz., Dojahn ir kt., 2013; Paredes ir Das, 2011). Taip pat laukinio tipo T7 RNR polimerazė gali įjungti radioaktyvių izotopų turinčius, o genų inžinerijos būdu patobulinta – ir įvairiai modifikuotus nukleotidus per visą sintetinės RNR ilgį (Padilla ir Sousa, 2002). Parodyta, kad ląstelėse transkripcijos metu į RNR gali būti įjungiamas 5-etiniluridinas (maždaug kas 35-as uridinas sekoje), prie kurio vėliau galima prijungti žymę „click“ chemijos būdu (Jao ir Salic, 2008), ir pan. Tačiau yra daug eksperimentų, kuriems žymes į RNR reikia įvesti tik tam tikrose vietose sekos viduje. Taip prijungus žymes prie RNR, vienos molekulės eksperimentuose gali būti stebimas splaisingas (Crawford ir kt., 2008), telomerazės veikla (Stone ir kt., 2007), transliacijos procesas (Uemura ir kt., 2010) ir pan. – tai tik keletas pavyzdžių. Modifikuotus nukleotidus norimoje vietoje galima įjungti cheminės RNR sintezės metu, tačiau taip galima gauti tik iki maždaug 40 nt

ilgio RNR. O gamtinės, tiriamos RNR dažnai yra daug ilgesnės. Tad pilno ilgio norimos RNR dažnai konstruojamos ligaze susiuvant cheminės sintezės ir/arba fermentų pagalba pažymėtas dalis (Crawford ir kt., 2008; Dojahn ir kt., 2013; apžvelgta Chow ir kt., 2008). Deja, toks pasirinkimas reikalauja daug darbo ir ne visada apdovanoja geromis galutinio produkto išeiomis. Todėl vis dar siūlomi įvairūs kiti sprendimai. Galima pasitelkti nenatūralias bazių poras. Tuomet RNR transkripcijos nuo specialiai sukonstruotos DNR matricos metu į RNR modifikuotas nukleotidas bus įjungtas tik ten, kur DNR bus jam komplementari modifikuota bazė. Tačiau šis metodas taip pat nėra paprastas dėl modifikuotos DNR matricos poreikio (apžvelgta Chow ir kt., 2008). Sukurti DNR oligonukleotidai, kurie sekai specifiskai hibridizuojasi su RNR ir specifinė funkcinė grupė, dėl bazių artumo, persikelia nuo modifikuoto G, esančio DNR, ant komplementaraus C, esančio RNR. Šiuo atveju labai parankus yra modifikavimo reakcijos nukreipimas į jau susintetintą RNR hibridizacijos principu, tačiau gali būti modifikuojama tik C bazė ir kol kas parodytas tik modelinės grupės perkėlimas be praktinio žymėjimo (Onizuka ir kt., 2009). Dviem (modifikuotoms) RNR dalims sujungti gali būti naudojamas deoksiribozimas. Tačiau ne su visomis RNR sekomis jis sėkmingai veikia (Baum ir Silverman, 2007). Ribosomų tyrimams buvo pasitelkta ribosominės RNR inžinerija: į ribosomos paviršiuje esančias kilpas buvo įterptos papildomos sekos ir atrinkti gyvybingi mutantų variantai. Prie išgrynintų tokių ribosomų hibridizuoti žymėti DNR oligonukleotidai, komplementarūs įterptosioms sekoms. Taip spektroskopiniams vienos molekulės eksperimentams paruoštos *E.coli* (Dorywalska ir kt., 2005) ir *S.cerevisiae* (Petrov ir Puglisi, 2010) ribosomos. Vis dėlto, šis metodas tinkamas ne visoms RNR - dėl įterpiamų ilgų papildomų sekų ir susidarančio RNR-DNR duplexo. Be to, nekovalentinis žymėjimas mažiau stabilus. Specifiniam RNR žymėjimui galima pasitelkti ir MTazes, apie tai - kitame skyrelyje.

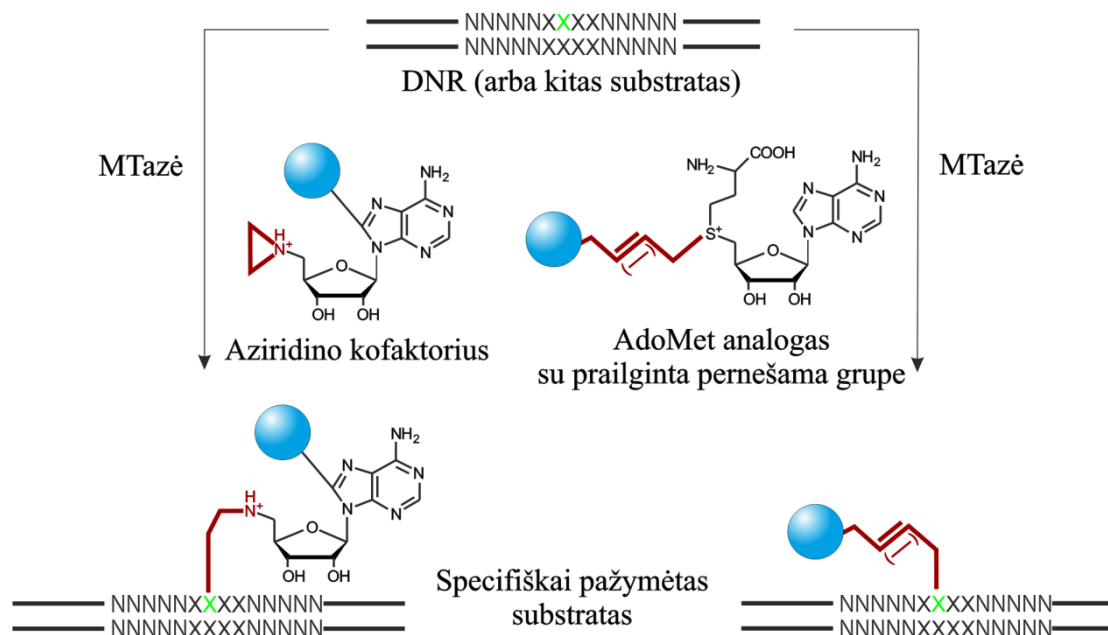
1.5 Metiltransferazių aktyvumu ir sintetiniais kofaktoriais pagrįstas specifinis biomolekulių žymėjimas

Nors ląstelėse metilgrupė yra plačiai naudojama keisti biomolekulių savybėms ir valdyti procesus, tyrimų metu ją stebėti nėra paprasta. Metilgrupė nėra reaktyvi, todėl fiziologinėse sąlygose nėra galimybių ją modifikuoti. Tačiau pasitelkiant įvairius sintetinius AdoMet analogus, nuo MTazių priklausomu keliu, tik jų atpažįstamosiose specifinėse vietose, galima prie biomolekulių prijungti įvairius žymenis. O tai suteikia naujų galimybių tirti tiek MTazių, tiek modifikuojamų molekulių savybes, bei panaudoti žymenis specifiniam mėginių praturtinimui.

Vienas iš tokių kofaktorių variantų, išbandytų su DNR MTazėmis, – kofaktoriai, kuriuose aminorūgštis pakeista aziridinu (pav. 1.7, kairėje). Dėl šios grupės, MTazės katalizuojamos reakcijos metu, prie DNR kovalentiškai prijungiama visa kofaktoriaus molekulė. Šis DNR žymėjimo metodas pavadintas sekai-specifiniu metiltransferazių indukuojamu žymėjimu (angl. *sequence-specific methyltransferase-induced labeling, SMILing*). Žymuo, pavyzdžiui, fluoroforas, gali jau iš karto būti prijungtas prie kofaktoriaus adenino dalies. Tad žymėjimui užtenka vieno žingsnio. Tiesa, kartu su kofaktoriumi lieka prisirišusi ir MTazė, tačiau ją galima pašalinti veikiant proteaze (Pljevaljic ir kt., 2004). Toks DNR modifikavimo būdas panaudotas nanodarinių konstravimui (Braun ir kt., 2008) ir transfekuotos DNR sekimui ląstelėse (Schmidt ir kt., 2008).

Kita grupė – kofaktoriai, kuriuose pernešama metilgrupė pakeista įvairiomis ilgesnėmis grandinėmis (pav. 1.7, dešinėje). Šiuo atveju, kaip ir AdoMet, prie taikinio molekulės prijungiama tik ši pernešama grandinė. Efektyviam pernešimui grandinės turi būti aktyvuotos – turėti dvigubą arba trigubą jungtį β pozicijoje nuo sulfonio centro (Dalhoff ir kt., 2006). Tad metodas pavadintas metiltransferazių katalizuojama aktyvuotų grupių pernaša (angl. *methyltransferase-directed transfer of activated groups, mTAG*) (Lukinavičius ir kt., 2007). Žymėjimui skirtos pernešamos grandinės gale turi

reaktyvią grupę (amino-, azido-, trigubą jungtį ar pan.), tinkamą cheminiam žymės (atitinkamų fluoroforo, biotino ar kt. darinių) prijungimui. Taigi, biomolekulės žymėjimas vyksta dviem žingsniais: pirmojo metu metiltransferazė katalizuoja grandinės pernašą ant specifiskai atpažįstamo taikinio, antrojo metu modifikuotas taikiny per perneštos grandinės reaktyvią grupę cheminės reakcijos metu sujungiamas su norima žyme. Po pirmojo žingsnio iš kofaktoriaus lieka AdoHcy, o MTazė dažniausiai atsipalaiduoja nuo substrato. Šiam metodui kurti ir taikyti ištirta visa eilė įvairių MTazių ir sintetinių kofaktorių.



Pav. 1.7. Metiltransferazių katalizuojamas specifinis biomolekulių žymėjimas panaudojant sintetinius AdoMet analogus. Pateikiamas DNR žymėjimo pavyzdys. N ir X – nukleotidai, XXXX – specifinė DNR MTazės atpažįstama seka, taikinio nukleotidas (antrasis X) parodytas žaliai. Kairėje – aziridino kofaktoriaus, turinčio žymenį arba funkcinę grupę (mėlynas rutuliukas) kovalentinis prijungimas prie MTazės substrato. Dešinėje: prailgintos grupės, turinčios žymenį arba funkcinę grupę (mėlynas rutuliukas), pernešimas nuo kofaktoriaus ant MTazės substrato. Pagal Klimašauskas ir Weinhold, 2007.

DNR MTazių atveju pirmiausiai parodyta, kad jos, išlaikydamos savo specifiskumą, gali katalizuoti ilgesnių nei metil- grupių, tokių kaip etil-, propen- ir butin-, pernašą. Aktyvumas parodytas su visų trijų klasių DNR MTazėmis, t.y. adenino-N6 MTaze TaqI, citozino-5 MTaze HhaI ir citozino-

N4 MTaze BcnIB (Dalhoff ir kt., 2006). Vėliau parodyta, kad naudojant M.HhaI (Q82A/N304A mutantinį variantą) arba M.TaqI ir kofaktorių, pernešamos dešimties atomų ilgio grandinės gale turintį reaktyvią aminogrupę, bei antrajam žingsniui – su aminogrupę reaguojantį fluoroforo NHS-esterį, galima specifiskai pažymėti DNR. Be to, su tokiais kofaktoriais, skirtingai nei aziridino dariniais, MTazė nėra surišama ir/ar inhibuojama ir gali atlikti pakartotines katalizės apskakas (Lukinavičius ir kt., 2007).

DNR MTazių aktyvumui su sintetiniais kofaktoriais tirti plačiai naudota DNR MTazė HhaI, kuri jau anksčiau buvo nuodugnai charakterizuota fundamentiskai (Vilkaitis ir kt., 2001). Ji atpažįsta seką GCGC ir metilina vidinį citoziną (pabrauktas) 5-oje bazės padėtyje. Vis dėlto, mTAG pernaša reakcijose su laukinio tipo M.HhaI nebuvo efektyvi. Ši problema buvo išspręsta pasitelkus genų inžineriją. Trys M.HhaI aktyvaus centro aminorūgštys (Gln82, Tyr254 ir Asn304) pagal struktūrinį modelį buvo arti pernešamos grandinės ir galėjo erdviškai trukdyti kofaktoriaus surišimo kišenėje išsidėstyti ilgesniems jos variantams. Šios aminorūgštys buvo pakeistos mažesnėmis. Gln82 ir Asn304 pakeisti alaniniais. O Tyr254, dėl atviros jo padėties tirpiklio atžvilgiu ir artimos sąveikos su surišta DNR, buvo pakeistas į seriną. Šie pakeitimai poromis po du, esant N304A mutacijai, ir visi trys kartu leido MTazei HhaI nuo sintetinio kofaktoriaus pernešti netgi dvylikos atomų ilgio grandinę su galine aminogrupę. Laukinio tipo MTazė su tokiu kofaktoriumi buvo visiškai neaktyvi. Be to, naujasis mutantinis M.HhaI variantas su praplėsta kofaktoriaus surišimo kišene buvo aktyvesnis su ilgą pernešamą grandinę turinčiu kofaktoriumi nei su AdoMet. Taigi, fermentas iš metiltransferazės buvo paverstas alkiltransferaze ir mTAG metodas, naudojant šį fermentą, galėjo būti taikomas netgi tirpale esant AdoMet (Lukinavičius ir kt., 2012). Šis mTAG metodui specialiai pritaikytas fermentas vėliau buvo pavadintas eM.HhaI (nuo angl. *engineered*) (Lukinavičius ir kt., 2013). Taip pat parodyta, kad naudojant eM.HhaI ir galinę aminogrupę turintį kofaktorių, dviejų žingsnių žymėjimo būdu prie DNR sekai specifiskai galima prijungti fluoroforą (Lukinavičius ir kt., 2012). eM.HhaI, sintetinio kofaktoriaus ir

fluoroforo sistema buvo panaudota GCGC sekoms vizualizuoti viso λ bakteriofago genomo mastu vienos molekulės eksperimentams. Tokie eksperimentai galėtų pagelbėti, pavyzdžiui, surenkant genomų sekas iš dalių (Neely ir kt., 2010). Pasitelkus M.TaqI ir propinilgrupę turintį kofaktorių bei „click“ chemiją pristatytas naujas DNR gryninimo metodas (Artyukhin ir Woo, 2012).

Taip pat plačiai tiriamas baltymų MTazių aktyvumas su sintetiniais kofaktoriais. Kiekviena baltymų MTazė turi bent keletą substratinių baltymų, tačiau nėra lengva juos nustatyti. Sintetinių AdoMet analogų naudojimu pagrįstas specifinis metilinimo substratų žymėjimas suteikia puikias galimybes identifikuoti baltymų MTazių taikinius. Kofaktoriaus nešama reaktyvi aminogrupė šiuo atveju nėra tinkamas pasirinkimas, todėl pasirenkamos bioortogonalios „click“ chemijai tinkamos grupės. Kol kas dažniausiai naudota galinė triguba jungtis. Kai kurios laukinio tipo MTazės geba pernešti penkių atomų ilgio grandinę (Peters ir kt., 2010). Norint pristatyti sintetinį kofaktorių, kuris tiktų kuo platesniam MTazių ratui, pasirinkta pernešama propinilgrupė. Pasirodė, kad toks AdoMet analogas nėra pakankamai stabilus. Tačiau pakeitus sieros atomą selenu buvo gautas mTAG tinkamas kofaktorius (pavadintas SeAdoYn) (Willnow ir kt., 2012). Jis panaudotas netgi viso audinių baltymų metilimo tyrimams (Bothwell ir kt., 2012). Siekiant tirti atskirų MTazių veiklą, pritaikyta aktyvaus centro inžinerija (panašiai kaip jau minėtu DNR MTazės HhaI atveju) ir parinkti tik tokiems fermentams tinkami ilgesnes (6-8 atomų ilgio) pernešamas grandines turintys sintetiniai kofaktoriai. Ši strategija pritaikyta baltymų arginino (Wang ir kt., 2011) ir baltymų lizino (Islam ir kt., 2011) MTazėms. Pakeisti fermentai, taip pat kaip ir M.HhaI, buvo aktyvesni su parinktu sintetiniu kofaktoriumi nei su AdoMet. Tai leido sukurtas fermento-kofaktoriaus poras taikyti atitinkamų MTazių taikiniams nustatyti ląstelių ekstraktuose.

RNR tyrimų srityje iki šiol buvo patikrintas tik kelių tRNR MTazių aktyvumas su kofaktoriumi, turinčiu penkių atomų ilgio pernešamą grandinę ir galinę trigubą jungtį (pavadintas AdoEnYn, Peters ir kt., 2010). Parodyta, kad

Pyrococcus genties archėjų tRNR MTazės Trm1 ir Trm11, metilinančios atitinkamai tRNR(-Phe) G26 ir G10 bazės N2 padėtyje, yra aktyvios su AdoEnYn kofaktoriumi ir taip leidžia specifiškai pažymėti tRNR fluoroforu. Tačiau kitos išbandytos laukinio tipo RNR MTazės, *S.cerevisiae* tRNR:m⁵C_{34,40,48,49} MTazė Trm4 ir *P.abysyi* tRNR:m¹A₅₈ MTazė TrmI, su šiuo kofaktoriumi nebuvo aktyvios (Motorin ir kt., 2011). mTAG metodas pritaikytas ir mažų metabolitų MTazių tyrimams (Lee ir kt., 2010).

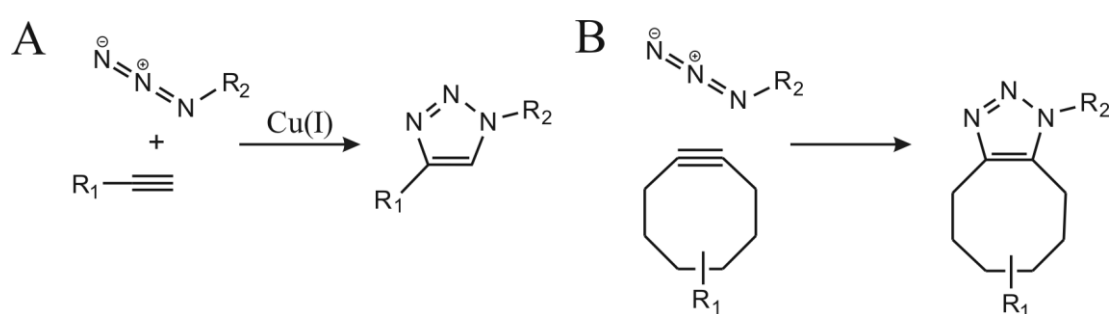
1.6 Azidų-alkinų cikloprijungimo reakcijos

Imdami pavyzdį iš gamtos, kuri santykinai paprastai sintetina įvairias savo molekules, chemikai ieškojo cheminių reakcijų, kurių metu galima būtų sujungti organines molekules taip pat paprastai ir efektyviai. Be to, labai patogiu, kai dvi funkcinės grupės gali jungtis tarpusavyje specifiškai, būdamos įvairių kitų funkcinių grupių apsuptyje. Buvo suformuluota idealių tokių reakcijų charakteristika: turi vykti švelniomis sąlygomis (nereikia aukštos temperatūros, slėgio, specifinių tirpiklių), būti našios (turėti geras išeigas) ir specifinės – reaguojančios grupės turi reaguoti tik tarpusavyje, nepriklausomai nuo įvairiausių kitų aplinkoje esančių medžiagų. Pradiniai reagentai turi būti lengvai prieinami. Susidarę produktai turi būti stabilūs fiziologinėse sąlygose, lengvai išgryninami ir netoksiški. Visas šias charakteristikas atitinkančių reakcijų grupė dėl efektyvaus ir paprasto kaip spragtelėjimas proceso pavadintos „click“ reakcijomis (Kolb ir kt., 2001).

Azidų ir galinių alkinų 1,3-dipolinis cikloprijungimas (AAC), (pav. 1.8A), atitinka visus vadinamųjų „click“ reakcijų požymius. Ši reakcija taip plačiai naudojama, kad tapo visos grupės sinonimu ir dažnai vadinama tiesiog „click“ chemija. Publikuota daugiau nei 1000 straipsnių, aprašančių šios reakcijos panaudojimą ne tik organinėje sintezėje, bet ir gyvybės moksluose. Pastarojoje srityje ypač patogus AAC reakcijos bioortogonalumas – nei azidai, nei alkinai nėra aptikti jokiose gamtinėse molekulėse. Be to, reakcija gali vykti fiziologinėse sąlygose. Susidarantis 1,2,3-triazolo žiedas yra stabilus, nedidelis

ir netoksiškas. Tad ši reakcija puikiai tinkama įvairių biomolekulių kovalentiniam žymėjimui netgi sudėtinguose jų mišiniuose.

Pirmiausiai buvo pristatyta AAC reakcija, katalizuojama vienvalečio vario jonų (angl., *Cu-catalysed azide-alkyne cycloaddition*, CuAAC) (Rostovsev ir kt., 2002; Tornøe ir kt., 2002). Vis dėlto, šiuo atveju reikalingos gan aukštos Cu(I) koncentracijos. Tai ardo nukleorūgštis ir yra toksiška ląstelėms. Nukleorūgštis žymėti CuAAC chemijos būdu tapo įmanoma pritaikius Cu(I) stabilizuojančius ir taip nukleorūgštis nuo degradacijos iš dalies apsaugančius ligandus: TBTA (tris(benziltriazolilmetil)aminas, naudojamas plačiai, tačiau prastai tirpus vandenyje) ir THPTA (3[tris(3-hidroksipropiltriazolilmetil)aminas, gerai tirpus vandenyje, tačiau tik neseniai tapęs prieinamas komerciškai). Tačiau azidų-alkinų cikloprijungimas tapo dar patrauklesniu pasirinkimu gyvybės mokslams, kai buvo rastas būdas išvengti Cu(I) katalizės. Trigubai jungčiai esant įtemptame ciklooktino žiede, ji yra pakankamai reaktyvi susijungimui su azidu (pav. 1.8B). Susintetinta eilė įvairiai papildomai aktyvuotų ciklooktino žiedų, skirtų nekatalizuojamai AAC chemijai. Tokių alkinų susijungimo su azidais reakcijos greitis praktiškai prilygsta vario katalizuojamam variantui (apžvelgta Gramlich ir kt., 2008; Sletten ir Bertozzi, 2009).



Pav. 1.8. Azidų-alkinų cikloprijungimo (AAC) reakcijų pavyzdžiai. R_1 ir R_2 gali būti įvairūs: biomolekulės, fluoroforai ir kt. (A) Katalizuojamos Cu(I) jonų reakcijos - CuAAC. (B) Nekatalizuojamos AAC reakcijos.

Parodyta, kad AAC chemijai reikiamas funkcinės grupės į norimas biomolekules galima įjungti įvairiais keliais. Cheminės nukleorūgščių sintezės metu galima įjungti alkinilgrupes turinčius nukleotidus. Tačiau azidogrupė

nėra suderinama su įprasta nukleorūgščių chemine sinteze. Kadangi azido- ir alkinil- grupės yra pakankamai mažos bei biologiškai neaktyvios, jas galima įjungti į biomolekules pasinaudojant atitinkamai modifikuotais pradiniais biomolekulių sintezės junginiais ir fermentine sinteze, *in vitro* bei *in vivo*. Pavyzdžiui, DNR sintezė ląstelėje gali vykti vietoj timino kartais įjungiant 5-etinil-2'-deoksiuridiną. Panašiai gali būti įjungiamos sintetinės aminorūgštys, monosacharidai ir pan. Kaip jau minėta MTazių panaudojimo pavyzdžiu, į biomolekules norimą funkcinę grupę galima įjungti ir po sintezės. Fermentams galima parinkti ir substratų analogus, kurie kovalentiškai jungiasi su aktyviais fermentais. Vėliau prie tinkamą grupę turinčios molekulės AAC chemijos būdu galima prijungti norimos žymės azidą ar alkiną. Parodyta, kad naudojant AAC chemiją galima pažymėti nukleorūgštis, baltymus, polisacharidus, lipidus ir netgi virusus bei gyvas ląsteles (apžvelgta Gramlich ir kt., 2008; Sletten ir Bertozzi, 2009), bei ląsteles gyvoje pelėse (Chang, ir kt., 2009).

Žinoma ir kitų bioortogonaliam biomolekulių žymėjimui tinkamų reakcijų. Pavyzdžiui, azidų ir triarilfosfinų (Staudingerio) reakcija, azidų ir alkenų reakcija, dalinai bioortogonalios – aldehydų/ketonų reakcija su nukleofiliniais aminais (apžvelgta Sletten ir Bertozzi, 2009). DNR žymėjimui *in vitro* naudojamos ir nebioortogonalios reakcijos: aminų ir NHS-esterių reakcija, įvairios tiolgrupės reakcijos ir kt. (apžvelgta Weisbrod ir Marx, 2008). Tačiau AAC pastaruoju metu naudojama plačiausiai: dėl efektyvumo, visiško bioortogonalumo, mažų, netoksiškų reikalingų funkcinų grupių ir susidarančio triazolo žiedo, dėl to, kad azido- ir alkinilgrupėmis papildyti metabolitai sėkmingai įtraukiami į metabolinius kelius ir pan.

Šioje disertacijoje aprašomais darbais buvo siekta 1) pritaikyti C/D RNP sekai specifiniam RNR žymėjimui panaudojant sintetinius AdoMet analogus ir 2) pritaikyti eM.HhaI sekai specifiniam DNR žymėjimui panaudojant sintetinius AdoMet analogus, tinkamus azidų-alkinų („click“) reakcija pagrįstam žymės prijungimui.

2 MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Reagentai

Standartiniai biocheminių tyrimų cheminiai reagentai, tokie kaip įvairios druskos, buferuojančios medžiagos, akrilamido-bisakrilamido tirpalai *Rotiphorese gel* 30% (37,5:1) ir *Rotiphorese gel* 40% (19:1), Bredfordo reagentas *Roti-Nanoquant*, chloroformas, fenolis, fenolio:chloroformo/izoamilo alkoholio mišinys, DEPC, etidžio bromidas, imidazolas, Kumasi briliantinis mėlis R250, PMSF, polietileniminas, scintiliacinis skystis *Rotiszint® Eco Plus*, tirpikliai HPLC-MS eksperimentams – iš *Roth*.

Molekulinės biologijos reagentai, tokie kaip agarozė, ATP, dNTP, IPTG, glikogenas (RNR darbams tinkamo švarumo), DEPC paveiktas vanduo, nukleotidų mišiniai sekoskaitai, 2× RNR mėginių dažas (*RNA Loading Dye*), 6× DNR mėginių dažas (*DNA Loading Dye*) ir pan. – iš *Fermento (Thermo Scientific)*.

Ampicilinas, chloramfenikolis, AdoMet, DMSO, CuBr, TBTA ir MegaStokes608 ciklooktinas – iš *Sigma-Aldrich*. AdoMet nuo AdoHcy papildomai išvalytas dr. Rūtos Gerasimaitės.

Alexa647 azidas – iš *Invitrogen*. Eterneono480/635 azidas – iš *Baseclick*.

2.1.2 Radioaktyvios medžiagos

[metil-³H]-AdoMet, 10 Ci/mmol, 55 μM - *PerkinElmer*.

[γ-³³P]-ATP, >2500 Ci/mmol, 3,3 μM - *Hartmann Analytic*.

2.1.3 Bakterijų padermės

E.coli ER2267: F' *proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 zzf::mini-Tn10 (Kan^r) / e14⁻(McrA⁻) endA1 supE44 thi-1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 Δ(argF-lac)U169 recA1 dam⁺ dcm⁺*.

E.coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIL: B⁻ *ompT hsdS*($\tau_B^- m_B^-$) *dcm*⁺ Tet^r
gal λ (DE3) *endA1 Hte* [*argU ileY leuW Cam*^r] – *Stratagene*.

2.1.4 DNR preparatai

Sintetiniai DNR oligonukleotidai, 5'..3' – *Metabion*, jei nenurodyta kitaip.

P.abysyi sR47 RNR kreipiančiosios sekos pakeitimui

Taikinio nukleotidas	Oligonukleotido pavadinimas	Oligonukleotido seka (D kreipiančioji dalis pabraukta) 5'...3'
Taikiniai <i>P.abysyi</i> tRNR-Leu(CAA)		
U17a	U18a	GATCCAGTAAGGTGAATCAGAGCCTGGTCAAATCATCACTCC
A31	U18b	TGAGGAGTGATGATTTGACCAGGCTCTGATTCACCTTACTG
	A34a	GATCCAGTAAGGTGAATCAGGGGGACTCAAGATCATCACTCC
	A34b	TGAGGAGTGATGATCTTGAGTCCCCCTGATTCACCTTACTG
Ae3	A53a	GATCCAGTAAGGTGAATCAGCCGTAGGGGTTCTCATCACTCC
	A53b	TGAGGAGTGATGAGAACCCTACGGCTGATTCACCTTACTG
C56	C68a	GATCCAGTAAGGTGAATCAGGGTTCAAATCCCTCATCACTCC
	C68b	TGAGGAGTGATGAGGGATTTGAACCCTGATTCACCTTACTG
Taikiniai triušio β-globino modelinėje pre-iRNR		
A102	RabGl_102a	GATCCAGTAAGGTGAATCAGAGTGAGGAGAAGTCATCACTCC
	RabGl_102b	TGAGGAGTGATGACTTCTCCTCACTCTGATTCACCTTACTG
U168	RabGl_168a	GATCCAGTAAGGTGAATCAGGCCCTGGGCAGGTCATCACTCC
	RabGl_168b	TGAGGAGTGATGACCTGCCAGGGCCTGATTCACCTTACTG
C234	RabGl_234a	GATCCAGTAAGGTGAATCAGGAAACAGAGTAGTCATCACTCC
	RabGl_234b	TGAGGAGTGATGACTACTCTGTTTCCTGATTCACCTTACTG
G308	RabGl_308a	GATCCAGTAAGGTGAATCAGGGTTGTCTACCCTCATCACTCC
	RabGl_308b	TGAGGAGTGATGAGGGTAGACAACCCTGATTCACCTTACTG

Substratinių RNR genų sintezei PGR būdu

Oligonukleotido pavadinimas	Oligonukleotido seka (T7 RNR polimerazės promotorius pabrauktas) 5'...3'
<i>P.abysyi</i> tRNR-Leu(CAA) – iš dr. B.Clouet-d'Orval	
P25'	CCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGCGGGGGTTGCCGAGCCTGGT
P23'	CGCGGATCCTGGTGCGGGGGCGGGGATT
Triušio β-globino modelinei pre-iRNR - iš dr. A.Kanopkos	
T7 β -globin	ATTAATACGACTCACTATAGAATACAAGCTTGGGGCTG
β -globin(ex2)	GAGGACAGGTCCCCAAAG

“Tiltas” substratinės 24 nt ilgio RNR sintezei susiuvant RNR oligonukleotidus

SplD_24 GGAGGGGATCTTGAGTGCCGCCGC

Atvirkštinės transkripcijos sustojimo eksperimentams

RT_tLeu CGGGGGCGGGGATTTGAACC, RT_tLeu2 ACCCCTACGGGAGGGGA,
 RT_tLeu3 TCTTGAGTCCCCGCCTT, RT_tLeu4 CGGGGATTTGAACCCCGGA,
 RT_tLeu5 CGGGGATTTGAACCCCGGAAC

P.abysyi aFib mutagenezei ir sekoskaitai

T7TP GGGTTATGCTAGTTATTGC, A152G GAAGACGTAGGCCAGCCAACC,
NF1 CAAATTCTATACTCCTCGC, NF2 GTTGAGGGAGTGGTAAAC,
T7PP TAATACGACTCACTATAGGG

M.smithii C/D RNP darbams – surašyti Igno Černiausko bakalauriniame darbe.

eM.HhaI mTAG aktyvumui tirti (HhaI atpažinimo seka pabraukta)

Dvigrandininis pATTGCGC, suhibridizuotas iš

ATTATTATTATTAGCGCATTATTA ir TAATAATGCGCTAATAATAATAAT.

Genominė DNR

Pyrococcus abyssi – gauta iš dr. Beatrice Clouet-d'Orval.

Methanobrevibacter smithii – DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*).

Plazmidės

P.abysyi C/D RNP gamybai: pET15b-L7Ae, pET15b-Nop5p-aFib (Bortolin ir kt., 2003) ir pUC18-sR47 (Nolivos ir kt., 2005); bei pUC18-Hv *Haloferax volcanii* pre-tRNR-Trp gamybai (Bortolin ir kt., 2003) gautos iš dr. Beatrice Clouet-d'Orval.

C/D RNP aktyvumo tyrimams: triušio β -globino geną turinti plazmidė (Kanopka ir kt., 1996) gauta iš dr. Arvydo Kanopkos.

M.smithii C/D RNP komponentų klonavimui: pET15b ir pET43a(+) – *Novagen*.

DNR žymėjimo eksperimentams: p Δ GH₆E119H. Plazmidėje p Δ GH₆ (Gerasimaitė ir kt., 2011) kryptingos mutagenezės būdu aktyvaus centro aminorūgšties Glu119 kodonas pakeistas į His. Turintis pastarąją mutaciją M.HhaI fermentas yra visiškai neaktyvus (Tomkuvienė, nepublikuoti duomenys).

DNR ilgio standartai

Ultra Low Range DNA Ladder GeneRuler, 1kb DNA Ladder GeneRuler, DNA Ladder Mix GeneRuler – Fermentas (Thermo Scientific).

2.1.5 RNR preparatai

Sintetiniai RNR oligonukleotidai, C/D RNP aktyvumo tyrimams, 5'...3' -
Metabion

S22 CCACAGACUCAAGAUCUUCCUCC, D11 GCGGCGGCACU,
D13 CAAGAUCUUCCUCC

E.coli tRNR mišinys *Ribonucleic acid, transfer, from E.coli strain W* – *Sigma-Aldrich*,

RNR ilgio standartas *Low Range RNA Ladder RiboRuler* – *Fermentas (Thermo Scientific)*

2.1.6 Baltymų preparatai

Restrikcijos endonukleazės, RNazių A/T1 mišinys, T4 polinukleotidkinazė, T4 DNR ligazė, DNazėI, nukleazė BAL31, aukšto tikslumo PGR fermentų mišinys (*High Fidelity PCR Enzyme Mix*), fosfatazės CIAP, SAP ir FastAP, atvirkštinė transkriptazė *RevertAid premium mix* ir jų buferiniai tirpalai; baltymų dydžio standartas *PageRuler Unstained Protein Ladder* – *Fermentas (Thermo Scientific)*. Trombinas - *GE Healthcare*. Jaučio serumo albuminas (BSA) – *Pierce*. Nukleazė P1 ir lizocimas – *Sigma-Aldrich*. eM.HhaI išgryninta Giedrės Urbanavičiūtės pagal aprašytą metodiką (Daujotytė ir kt., 2003). Endonukleazė McrBC gauta iš dr. Giedriaus Sasnausko (Sukackaitė ir kt., 2012).

2.1.7 Sintetiniai kofaktoriai

SeAdoYn (Willnow ir kt., 2012), AdoEnYn (Peters ir kt., 2010), SeAdoEt (nepub.), AdoButen (nepub.) – gauti iš prof. Elmar Weinhold, susintetino dr. Michael Martin ir kt. AdoEt, AdoPropen, AdoButin (visi trys – Dalhoff ir kt., 2006), Ado-6-amine, Ado-6-alkyne, Ado-11-amine (visi trys – Lukinavičius ir kt., 2013) - susintetino dr. Gražvydas Lukinavičius. Ado-6-SCOCH₃ (nepub.) ir Ado-6-azide (Lukinavičius ir kt., 2013) - susintetino dr. Viktoras Masevičius. Ado-6-azide turėtas grynas S-stereoizomeras, kitų – S- ir

R-stereoizomerų mišiniai. Reakcijose su MTazėmis nurodyta tik S izomero koncentracija. Visų sintetinių kofaktorių grynumas buvo >60%.

2.1.8 Molekulinės biologijos rinkiniai

Plazmidžių skyrimo rinkinys *GeneJET Plazmid Miniprep Kit*, didelės išeigos transkripcijos *in vitro* rinkinys *TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit*, DNR gryninimo iš gelio rinkinys *GeneJET Gel Extraction Kit – Fermentas (Thermo Scientific)*. Nukleotidų pašalinimo rinkinys *QIAquick Nucleotide removal Kit – Qiagen*. RNR gryninimo rinkiniai *ZR RNA MicroPrep* ir *MidiPrep - Zymo Research*.

2.1.9 Standartiniai tirpalai

C/D RNP buferis metilinimo ir modifikavimo reakcijoms *in vitro* (1×): 50 mM HEPES·NaOH pH=7,9, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂.

M.HhaI buferis metilinimo ir modifikavimo reakcijoms *in vitro* (1×): 10 mM Tris·HCl pH=7,4, 50 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA.

Mitybinė terpė LB: 10 g/l peptono, 5 g/l mielių ekstrakto, 10 g/l NaCl. Nutitruojama NaOH iki pH=7,5.

TBE (5×): 0,45 M Tris, 0,45 M H₃BO₃, 0,01 M EDTA, pH=8,3.

DNR elektroforezės buferis (1×): 0,1 M H₃BO₃, 1,95 mM di-Na-EDTA, 0,086% CH₃COOH, pH=8,2.

Baltymų mėginio buferis elektroforezei (2,5×): 0,1565 M Tris·HCl pH=6,8, 5% NDS, 0,025% bromfenolio mėlio, 25% glicerolio, 12,5% β-merkaptioetanolio.

Baltymų dažymo gelyje po elektroforezės tirpalas: 10% CH₃COOH, 48% etanolio, 605 μM Kumasi briliantinis mėlis R250.

2.2 Metodai

PGR, DNR karpymas restrikcijos endonukleazėmis, susiuvimas T4 DNR ligaze, defosforilinimas CIAP, SAP ir FatAP fosfatazėmis, fosforilinimas T4 polinukleotidkinaze buvo atliekami vadovaujantis fermentų gamintojo

rekomendacijomis; taip pat ir naudojant molekulinės biologijos rinkinius. DNR sekos nuskaitytos VU Biotechnologijos instituto sekoskaitos centre.

DNR ir baltymų gelio elektroforezė atlikta pagal standartinę metodiką (Sambrook ir Russell, 2001). DNR ir RNR geliai dažyti etidžio bromidu ir jo fluorescencija, taip pat ir specifiskai įjungtų fluorofortų fluorescencija, stebėta naudojant FLA-5100 skaitytuvą (*Fujifilm*). Etidžio bromido fluorescencijai sužadinti naudotas 473 nm bangos ilgio lazeris. Gauti vaizdai analizuoti *MultiGauge* programa (*Fujifilm*). Taip pat šiuo skaitytuvu ir šia programa vizualizuoti rezultatai, nuskaityti nuo radioaktyvumui jautrių ekranų (*Fujifilm*).

2.2.1 Darbai *in silico*

Archėjų C/D RNP genai *in silico* analizuoti svetainėje *Archaeal Genome Browser* (<http://archaea.ucsc.edu/#citation>, Schneider ir kt., 2006). DNR sekos analizuotos programomis *Vector NTI* (*Life Technologies*) ir *FinchTV* (*Geospiza*). PGR pradmenų prilydymo temperatūra (T_m) apskaičiuota programa *IDT SciTools Oligo Analyser* (<http://biotools.idtdna.com/analyzer/>). Įvairūs baltymų parametrai (molekulinė masė, pI ir kt.) apskaičiuoti ExpASy serveryje (Gasteiger ir kt., 2003) (www.expasy.org). PDB duomenų bazėje (www.pdb.org) esančios eksperimentiškai nustatytos baltymų ir RNR tretinės struktūros nagrinėtos ir jų paveikslai daryti naudojant programą *DeepView – Swiss-PdbViewer* (Guex ir Peitsch, 1997). Nežinomos RNR antrinės struktūros *in silico* sumodeliuotos *Gensilico RNA* metaserveryje (<http://genesilico.pl/rnametaserwer/>, Puton, pateikta spaudai).

2.2.2 Baltymų raiška ir gryninimas

Pyrococcus abyssi C/D RNP baltyminius komponentus koduojančius genus turinčiomis rekombinantinėmis pET15b plazmidėmis buvo transformuotos *Esherichia coli* BL21(DE3)RIL padermės ląstelės. Tai padermė, pritaikyta eukariotų ir archėjų baltymų raiškai. L7Ae genas klonuotas

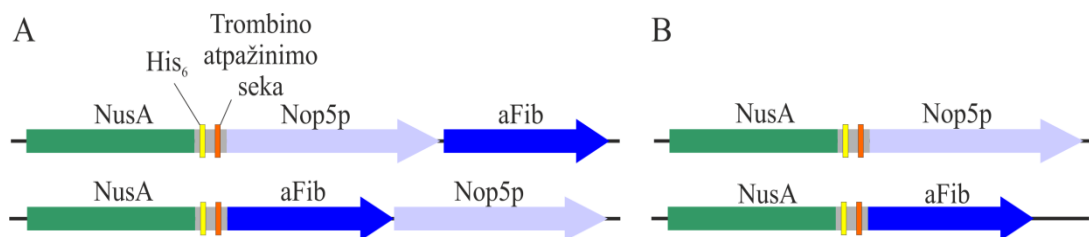
ir grynintas atskirai. Nop5p ir aFib genai rekombinantinėje plazmidėje, kaip ir *P.abysyi* genome, yra viename operone. Vektorius koduoja *lac* promotorių ir rekombinantiniams baltymams prideda N-galinį šešių His fragmentą bei trombino atpažinimo seką, leidžiančią šį giminingumo fragmentą nukirpti. Vykiant baltymų raišką nuo Nop5p ir aFib koduojančios plazmidės, N-galinį šešių His fragmentą turi tik Nop5p, tačiau dėl stiprios tarpusavio sąveikos šie baltymai išsigrūnina kartu.

Rekombinantinėmis plazmidėmis transformuotos ląstelės išsėtos ant agarizuotos mitybinės LB terpės su 0,1 mg/ml ampicilino ir 0,025 mg/ml chloramfenikolio. Po to producentai auginti 40 ml skystos LB terpės per naktį 37°C, ryte po 20 ml naktinės kultūros persėta į 500 ml LB (į 2 l talpos kolbą) su 0,1 mg/ml ampicilino ir toliau auginta 37°C. Biomasei pasiekus optinį tankį $OD_{600}=0,5-0,6$, tikslinių baltymų raiška sukelta 1mM IPTG ir vykdyta 3-4 val 37°C. Biomase surinkta centrifuguojant $4400\times g$ 4°C 20-40 min ir resuspenduota gryninimo buferyje A (20 mM Na-PO₄, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazolas, pH=7,4). Jo imama po 40 ml pusės litro kultūros biomasei. Pridėta proteazių inhibitoriaus PMSF iki 0,5 mM koncentracijos. Suspenduota biomase ardyta ultragarsu 20 min vienos sekundės trukmės impulsais su 1 sekundės pertraukomis (amplitudė 80V, *Sonics Vibra Cell* aparatu). Termolabilūs *E.coli* baltymai denatūruoti pakaitinant lizatą 15 min 65°C temperatūroje ir kartu su stambiomis ląstelių nuolaužomis pašalinti centrifuguojant $27216\times g$ greičiu (15000 aps/min) 1 val 20°C temperatūroje. RNR iš L7Ae preparato pašalinta atvėsinus tirpalus iki maždaug 4°C, į supernatantą pridėdant polietilenimino iki 0,15% ir nucentrifuguojant susidarančias nuosėdas. Galutinis supernatantas filtruotas per 0,45 μm filtrą (*Roth*) ir iš jo baltymai gryninti Ni²⁺ giminingumo chromatografijos būdu naudojant kolonėlę HiTrap IMAC HP (*GE Healthcare*), pagal kolonėlės gamintojo rekomendacijas. Gryninimo buferis B: 20 mM Na-PO₄, 0,5 M NaCl, 300 mM imidazolas, pH=7,4. Frakcijos su tiksliniais baltymais apjungtos, sukonzentruotos tam skirtuose mėgintuvėliuose (*Millipore*), dializuotos prieš baltymų laikymo buferį (20 mM Na-PO₄, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10% glicerolio, pH=7,9). N-galinis His₆ fragmentas

nukirptas trombinu, trombinas pašalintas baltymo tirpalą pakaitinant 65°C temperatūroje. L7Ae toliau grynintas jonų mainų chromatografija, naudojant SP-sefarozės kolonėlę HiTrap SP FF (*GE Healthcare*), pagal kolonėlės gamintojo rekomendacijas. Naudotas gryninimo buferis: 50 mM HEPES·NaOH, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH=7,0.

Methanobrevibacter smithii C/D RNP baltymų klonavimas ir gryninimas išsamiai aprašyti Igno Černiausko bakalauriniame darbe (2011), todėl čia pateikiama tik trumpa santrauka. *M.smithii* C/D RNP baltymai, tiek su His₆ fragmentu, tiek papildomai sulieti su NusA baltymu, gryninti Ni²⁺ giminingumo chromatografijos būdu taip pat kaip *P.abysyi* baltymai. Išskyrus: suardyta biomasė ir baltymų preparatai nekaitinti termolabilių baltymų pašalinimui, nešalinta endogeninė RNR (nes jos nebuvo), nenaudota papildoma jonų mainų chromatografija. Susidūrus su Nop5p ir aFib netirpumo problema, varijuota buferio joninė jėga, pH, ląstelių auginimo, indukcijos sąlygos.

M.smithii Nop5p ir aFib baltymų suliejimui su NusA naudota pET43a(+) plazmidė. Išbandyti skirtingi konstrukcijų variantai: kai abu baltymai yra viename operone ir NusA yra prijungtas prie vieno iš jų, arba kiekvienas baltymas su prijungtu NusA grynintas atskirai (pav. 2.1).



Pav. 2.1. *M.smithii* C/D RNP baltymų Nop5p ir aFib suliejimas su NusA. **(A)** Variantai, kai Nop5p ir aFib yra viename operone. **(B)** Nop5p ir aFib su NusA sulieti ir gryninami atskirai.

Išgryninus tokius baltymus, nevyko fermentinė NusA-Nop5p hidrolizė trombinu, tikriausiai dėl specifinės sulieto baltymo sanklodos, paslėpusios trombino atpažinimo seką. NusA-Nop5p hibridas nesąveikavo su aFib. Tai nėra netikėta, nes ši sąveika iš Nop5p pusės vyksta būtent per N-galinį

domeną. Nukirpus NusA, sulietą su aFib ir nesant Nop5p, aFib krito į nuosėdas. Tik operone esant kartu NusA-aFib ir Nop5p, pavyko išgryninti šiuos baltymus kartu, ir nukirpus NusA, aFib liko tirpus - tikriausiai abu baltymus stabilizavo tarpusavio sąveika. O gryninimo sąlygos, lyginant su pirminėmis, buvo pakoreguotos. NusA-aFib hibrido gryninimų metu buvo pastebėta jo degradacija esant Ni²⁺ jonų. Tai žinomas reiškinys (Krezel ir kt., 2010). Siekiant to išvengti, buvo atitinkamai optimizuotos gryninimo sąlygos - pakoreguotas gryninimui naudojamų buferių pH, joninė jėga bei papildomai pridėta reduktoriaus ditioneitolio (DTT) (Buferis A: 20 mM Na-PO₄ pH=7,0, 1 M NaCl, 100 mM imidazolas, 5 mM DTT; Buferis B: 20 mM Na-PO₄ pH=7,0, 1 M NaCl, 500 mM imidazolas, 5 mM DTT). Taip pat, baltymų tirpumui palaikyti į dializės buferius pridėjome aminorūgščių L-Glu ir L-Lys (Golovanov ir kt., 2004). Apjungtos frakcijos nudializuotos prieš buferį: 20 mM Na-PO₄ pH=7,0, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM L-Glu, 50 mM L-Lys, 0,1% β-merkaptoetanolio, 10% glicerolio.

Baltymų koncentracijos nustatytos Bredfordo kolorimetriniu metodu ir pagal 280 nm bangos ilgio šviesos absorbciją.

2.2.3 Preparatų užterštumo ribonukleazėmis tikrinimas

Išgrynintų baltymų preparatai buvo tikrinami, ar neturi ribonukleazių. Taip pat tikrinti bet kurie kiti naudoti preparatai, kilus įtarimui dėl galimo jų užterštumo ribonukleazėmis. Buvo sumaišomi 2 μl tiriamo tirpalo, 2 μl 2 μg/μl *E. coli* tRNR mišinio ir 1 μl vandens, inkubuojama 30 min 37°C temperatūroje. Vykdyta RNR elektroforezė 6% PAA gelyje denatūruojančiomis sąlygomis, gelis dažytas etidžio bromidu. Jei kontroliniame mėginyje RNR yra, o mėginyje su tiriamuoju tirpalu – ne arba jos daug mažiau, ji pažeista, vadinasi, tiriamajame mėginyje ribonukleazių yra. Baltymų preparatų užterštumas endogenine RNR tikrintas vykdant tiriamo mėginio elektroforezę RNR tinkamomis sąlygomis ir nudažant etidžio bromidu.

2.2.4 Kreipiančiųjų ir ilgų substratinių RNR paruošimas transkripcijos *in vitro* būdu

Kreipiančiosios RNR sR47 genas yra klonuotas į pUC18 plazmidę, kartu su T7 RNR polimerazės promotoriumi ir R.BamHI atpažinimo seka geno gale. Rekombinantinė plazmidė dauginama *E.coli* ER2267 padermės ląstelėse ir išskirta naudojant plazmidžių skyrimo rinkinį *GeneJET Plazmid Miniprep Kit*. Plazmidė linearizuota restrikcijos endonukleaze BamHI, kuri po kirpimo pašalinta fenolio-chloroformo ekstrakcija.

Substratinės tRNR-Leu(CAA) genas padauginamas PGR būdu nuo *P.abysssi* genomines DNR, o modelinės triušio β-globino pre-iRNR - nuo atitinkamos rekombinantinės plazmidės. Abiem atvejais pradžiai pagalba prieš geną įvestas T7 RNR polimerazės promotorius. PGR produktai išvalyti *Nucleotide removal kit* rinkiniu.

Nuo perkirptų plazmidžių ir PGR produktų vykdyta transkripcija *in vitro* naudojant rinkinį *T7 High Yield Transcription Kit*. Gauta RNR gryninta po elektroforezės išpjaunant iš PAA gelio (2.2.5). Koncentracija ir švarumas nustatyti atitinkamai pagal 260 nm bangos ilgio šviesos sugertį ir 260 nm bei 280 nm ilgio šviesos sugerties santykį. RNR ilgio vientisumas galutiniame preparate tikrintas elektroforeze PAA gelyje.

2.2.5 RNR elektroforezė gelyje ir gryninimas

RNR elektroforezė vykdyta 4-15% PAA gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (gelyje 8 M urėja). Gelis kaskart (10 ml) ruoštas iš sausos urėjos (4,7 g), akrilamido-bisakrilamido 19:1 (40% tirpalo kiekis pagal pageidaujamą galutinį procentingumą), 1×TBE buferio (2 ml 5× tirpalo), APS (100 μl 10%) ir TEMED (8 μl). Mėginiai papildyti lygiu tūriu RNR mėginio dažo (*RNA Loading Dye*). Elektroforezė vykdyta 1×TBE buferyje, *Mini Protean (Bio-Rad)* aparate, esant 400V įtampai. Po elektroforezės gelis būdavo trumpam pamerkiamas į etidžio bromido tirpalą ir praplaunamas distiliuotu vandeniu. Rezultatai stebėti po UV lempa arba fluorescencinių vaizdų skaitytuvu.

RNR gryninimui naudotas 4-6% PAA gelis. Po mėginių elektroforezės jis buvo vyniojamas į plėvelę ir dedamas ant nuo UV priklausomai fluorescuojančios plokštelės (TLC-PET celiuliozės plokštelė su 254 nm bangos ilgio šviesos indikatoriumi, *Sigma-Aldrich*). Apšvietus 254 nm UV lempa, pažymėtos reikalingos juostelės. Išpjauti gelio gabalėliai dėti kiekvienas į 500 μl eliucijos buferio (0,5 M CH₃COONH₄, 0,1 mM EDTA, 0,1% NDS) ir buvo paliekami vartytuve per naktį kambario temperatūroje (ilgesnėms RNR) arba 37°C 1-2 val (trumpesnėms RNR). RNR išsodinta nusiurbtą tirpalą sumaišant su 1 ml 96% etanolio (esant mažiems RNR kiekiams taip pat dėta RNR lygio švarumo glikogeno) ir palaikant -20°C 1 val ar ilgiau. Centrifuguota 4°C 15 min 20800×g (14000 aps/min). Nuosėdos buvo praplaunamos 4°C 75% etanoliumi, centrifuguojama 3 min. Pašalinus supernatantą, RNR tirpinta vandenyje.

2.2.6 Baltymų ir RNR sąveikos tyrimas elektroforetinio poslinkio metodu

Naudojant T4 polinukleotidkinazę ir [γ -³³P]-ATP, kreipiančioji RNR sR47 5' gale buvo pažymėta radioaktyviu ³³P izotopu. Po žymėjimo RNR išgryninta naudojant G-25 sefadekso kolonėles (*GE Healthcare*). Tokia RNR reakcijos buferyje (20mM HEPES·NaOH pH=7,9, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10% glicerolio, 0,2 mg/ml BSA ir 0,5 mg/ml *E.coli* tRNR) inkubuota be baltymų, su 1-3 μM L7Ae, arba 2 μM L7Ae ir 1-4 μM Nop5p-aFib 70°C 15 min. Mėginių elektroforezė vykdyta nedematūruojančiame 8% PAA gelyje, 0,5× TBE buferyje su 5% glicerolio, *Bio-Rad Protean* aparate, esant 200V įtampai, 1-2 val. Gelis išdžiovintas ant *Whatman 3MM* popieriaus. Kompleksai vizualizuoti naudojant radioaktyvumui jautrius ekranus.

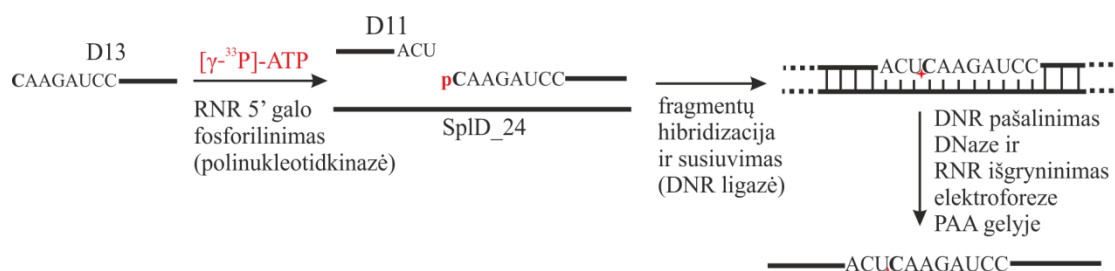
2.2.7 Metilinimo aktyvumo įvertinimas naudojant tričiu žymėtą AdoMet

Metilinimo buferyje su 50 μM [³H-metil]-AdoMet (1,6 Ci/mmol, gautas sumaišius [³H-metil]-AdoMet (10 Ci/mmol) su neradioaktyviu AdoMet) pirmiausiai buvo surenkamas 1 μM C/D RNP kompleksas be substrato: 1 μM kreipiančiąją RNR, 2 μM Nop5p-aFib ir 3 μM L7Ae inkubuojant 7 min 68°C.

Po to buvo pridedama substratinės RNR iki 1 μM ar kitos pasirinktos koncentracijos. Neigiamos kontrolinės reakcijos – be C/D RNP, be Nop5p-aFib arba be substratinės RNR. Iš bendro reakcijos mišinio (22 μl), inkubuojamo 68°C temperatūroje, buvo išimama po 5 μl pasirinktais laiko taškais, reakcijos stabdytos užšaldant -20°C temperatūroje. Surinkti mėginiai užnešti ant 2,3 cm skersmens DE-81 filtriukų. Nesureagavęs AdoMet nuplautas filtriukus skalaujant 3 kartus po 3 min 50 mM Na-PO₄ pH=7,4, 0,01% DEPC buferiu (100 ml penkiolikai filtriukų). RNR lieka prikibusi prie filtriukų. Jie džiovinti po kaitinimo lempa ir merkti į 2 ml *Rotiszint Eco Plus* scintiliacinio skysčio scintiliacinėse kiuvetėse. Mėginių radioaktyvumas nustatytas *Beckman LS 1801* scintiliaciniu spektrometru. Visos reakcijos pakartotos po 2-3 kartus, apskaičiuoti rezultatų vidurkiai ir standartinis nuokrypis, kuris pateiktas kaip paklaidos.

2.2.8 RNR modifikavimo naudojant sintetinius kofaktorius analogus tyrimas

Šiems eksperimentams naudotas laukinio tipo C/D RNP atpažįstamas substratinis RNR oligonukleotidas, kuriame taikinio nukleotidas pažymėtas ³³P izotopu. Tokiam substratui paruošti (pav. 2.2) RNR oligonukleotidas D13 buvo fosforilinamas 5' gale, naudojant T4 polinukleotidkinazę ir [γ -³³P]-ATP. Po to reakcijos mišinio sudėtis buvo papildoma taip, kad tiktų susiuvimo reakcijai, ir pažymėtas D13 kartu su RNR oligonukleotidu D11 buvo hibridizuojami su DNR „tiltu“ SplD-24 bei susiuvami T4 DNR ligaze. Mišinys buvo paveikiamas DNazeI ir gautoji 24 nt ilgio RNR gryninta elektroforeze 6% PAA gelyje (2.2.5).



Pav. 2.2. Substratinio RNR oligonukleotido su ³³P izotopu pažymėtu C/D RNP taikinio nukleotidu paruošimas. Raidėmis parodyta C/D RNP atpažįstama seka.

Modifikavimo reakcijoms C/D RNP buvo surenkamas iš 1 μM sR47, 2 μM L7Ae ir 2 μM Nop5p-aFib metilinimo buferyje inkubuojant 65°C 10 min. Po to buvo pridedama AdoMet (52 μM) arba sintetinio kofaktoriaus analogo (200–600 μM) ir substratinio RNR oligonukleotido su ^{33}P žymėtu taikinio nukleotidu (0,01 μM), sumaišyto su S22 substratiniu oligonukleotidu (0,5-1 μM). Reakcijos mišinys inkubuotas 68°C 30 min. Ieškant optimalių reakcijos sąlygų, dauguma šių parametrų buvo varijuoti. Po modifikavimo RNR buvo pasirinktinai išsodinama etanoliu arba ne, po to sukarpoma nukleaze Bal31 iki nukleozidų 5'-monofosfatų. Jie išskirstyti vienos krypties plonasluoksne chromatografija (TLC) (Grosjean ir kt., 2007) ir vizualizuoti naudojant radioaktyvumui jautrius ekranus.

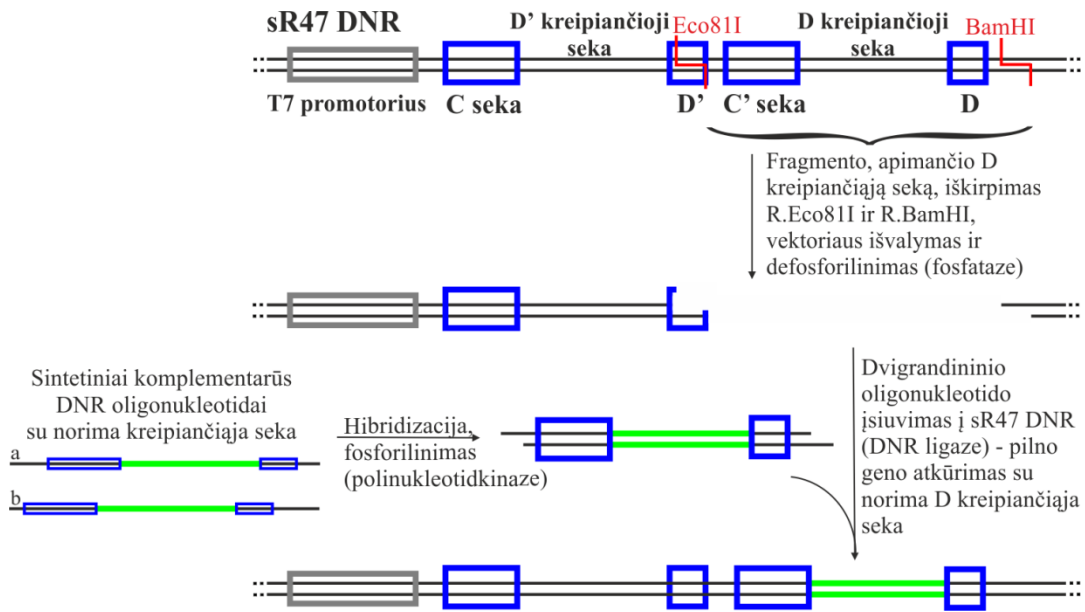
2.2.9 *Pyrococcus abyssi* aFib aktyvaus centro mutagenezė

P.abyssi metiltransferazės aFib aktyvaus centro aminorūgšties Ala152 pakeitimas į Gly buvo atliktas patobulintu PGR megapradmenų metodu (Sambrook ir Russell, 2001), pET15b-Nop5p-aFib plazmidėje, naudojant pradmenis T7TP, A152G2008 (įvedantis mutaciją) ir NF2, bei aukšto tikslumo PGR fermentų mišinį (*High Fidelity PCR Enzyme Mix*). Gautas galutinis PGR produktas išgrynintas po elektroforezės agarozės gelyje, sukarpytas R.BamHI ir R.XmaJI ir per tą pačių REazių taikinius įklonuotas į pET15b-Nop5p-aFib plazmidę, pakeičiant laukinio tipo aFib seką mutantine. Sėkminga mutagenezė patvirtinta nuskaičius viso Nop5p-aFib genų regiono seką.

2.2.10 Kreipiančiosios RNR perprogramavimas

Plazmidė pUC18-sR47 buvo sukirpta R.BamHI ir R.Eco81I endonukleazėmis. Taip iškirptas 38 bp fragmentas, apimantis D kreipiančiąją seką, paliekant lipnius galus kito fragmento įkėlimui. Vektorius defosforilintas ir išgrynintas elektroforeze agarozės gelyje. Sintetiniai oligonukleotidai (atitinkama lentelė skyriuje 2.1.4) buvo sudaryti taip, kad suformuotų dvigrandininius fragmentus su lipniais galais ir įsiūti į vektorių atkurtų pilną sR47 geną su pakeista D kreipiančiąja seka (pav. 2.3). Suhybridizuotos

atitinkamos oligonukleotidų poros fosforilintos T4 polinukleotidkinaze ir įsiūtos į vektorių T4 DNR ligaze, inkubuojant 17°C per naktį. Susiuvimo mišiniu transformuotos *E.coli* ER2267 ląstelės ir kreipiančiosios sekos pakeitimas patvirtintas sekoskaita. Nuo gautų plazmidžių kreipiančiosios RNR sintetintos transkripcija *in vitro* ir grynintos gelio elektroforezės būdu kaip aprašyta skyriuose 2.2.4 ir 2.2.5.



Pav. 2.3. Kreipiančiosios RNR (sR47) perprogramavimas DNR lygmenyje, iškerpant seną kreipiančiąją seką ir įkeliant DNR fragmentą, sudarytą iš dviejų sintetinių oligonukleotidų (a ir b) ir atkuriantį pilną geną su norima kreipiančiąja seka.

2.2.11 Aukšto slėgio skysčių chromatografija ir masių spektrometrija (HPLC-MS)

RNR modifikavimo reakcijoms C/D RNP (1 μ M) buvo surinktas metilinimo buferyje iš 1 μ M kreipiančiosios RNR, 3 μ M L7Ae ir 2,5 μ M Nop5p-aFib inkubuojant 68°C 7 min. Po to pridėta 1 μ M tRNR-Leu ir 50 μ M AdoMet arba 400 μ M SeAdoYn (jeigu dėta) ir inkubuota 68°C 30 min. Po inkubacijos RNR (gaunamame mišinyje buvo vienodi moliniai kiekiai substratinės ir kreipiančiosios RNR) išgryninta naudojant *ZR RNA MidiPrep* rinkinį ir sukurpyta iki nukleozidų inkubuojant su nukleaze P1 (0,5 u) 2 val

55°C P1 buferyje (10 mM Na-OAc pH=5,2, 1 mM Zn-OAc₂) ir po to pridėjus FastAP fosfatazės (0,5 u) bei dar P1 (0,25 u) ir inkubuojant 37°C per naktį.

DNR modifikavimo reakcijose M.HhaI metilinimo buferyje 0,5 μM eM.HhaI, 33 μM dvigrandininis 24 bp ilgio oligonukleotidas pATTGCGC ir 300 μM kofaktorius AdoMet, Ado-6-alkyne arba Ado-6-azide inkubuoti 37°C 4 val. Po to MTazė išaktyvinta pakaitinant 80°C 20 min. DNR išsodinta etanoliu ir sukarpyta iki nukleozidų inkubuojant nukleazės P1 buferyje su nukleaze P1 (0,05 u) ir SAP fosfataze (0,1 u) 37°C 4 val.

Po sukarpymo iki nukleozidų visi mėginiai fermentams išaktyvinti pakaitinti 10 min 80°C ir nucentrifuguoti 30 min 10600×g. Nukleozidų kiekis, atitinkantis 40 pmol nesuardytos RNR arba 130 pmol DNR, užneštas į chromatografijos sistemą (*Agilent 1200*) su daugiakanaliu absorbcijos detektoriumi. Nukleozidai atskirti naudojant *Discovery C18* kolonėlę (75×2,1 mm, *Supelco*), buferiu A (20 mM amonio formiatas, pH=3,5) plaunant 0,3 ml/min greičiu ir palaikant 30°C temperatūrą bei linijiniu gradientu didinant buferio B (80% metanolis) koncentraciją (20 min, 0–20% B; 20–22 min, 20–100% B). Masių spektrai nustatyti naudojant tiesiogiai prijungtą Q-TOF 6250 masių spektrometrą (*Agilent*) su elektrinio įpurškimo (angl. *ESI*) sistema, teigiamos jonizacijos režime. RNR atveju metilinimo ir propinilinio aktyvumo palyginimui atsitiktiniai mėginių dydžio skirtumai buvo panaikinti normalizuojant pagal nemodifikuotų nukleozidų smailes, ir po to kiekvieno taikinio propinilinto ir metilinto nukleozido smaيليų plotų santykis įvertintas procentais.

2.2.12 RNR mTAG žymėjimas

Propinilgrupės prijungimas. C/D RNP (1 μM) surinktas metilinimo buferyje kaip 2.2.11. Po to pridėta SeAdoYn (400 μM) ir 1 μM substratinės RNR (bei 10 μM S22 oligonukleotido, jeigu dėta) ir toliau inkubuota 68°C 30 min. Reakcija sustabdyta pridėdant lygų tūrį RNR mėginių dažo (*RNA Loading Dye*). Gautas mišinys prireikus saugotas -20°C temperatūroje.

Žymės prijungimas. Reakcijos sąlygos pritaikytos remiantis Gramlich ir kt. (2008) ir žymės azido gamintojo rekomendacijomis (www.baseclick.eu). Propinilgrupės prijungimo reakcijos mišinys (40 µl; 20–220 pmol substratinės RNR) buvo praskiedžiamas 0,8 tūrio (32 µl) DMSO/t-BuOH 3:1 mišiniu. 0,03 M CuBr kiekvieno eksperimento metu buvo šviežiai ištirpinamas 0,1 M tris(benziltriazolilmetil)amino (TBTA) (DMSO/t-BuOH tirpiklyje) tirpale ir 12 µl tokio Cu-TBTA mišinio dedama į reakciją. Galiausiai buvo pridedama 8 µl 2,5 mM (20 nmol; DMSO/t-BuOH tirpiklyje) Eterneono-480/635 azido. Reakcijos mišiniai inkubuoti 1 val 37°C, pamaišant. Po to RNR išvalyta naudojant *ZR RNA MicroPrep* rinkinį ir išanalizuota 15% PAA denatūruojančiame gelyje. Po elektroforezės Eterneono fluorescencija išmatuota sužadinant 473 nm bangos ilgio lazeriu. Po to visa RNR nudažyta etidžio bromidu.

2.2.13 Atvirkštinės transkripcijos užlaikymo metodas

RNR modifikavimo vietos nustatymas buvo atliktas kaip aprašyta Motorin ir kt., 2007. Pradmuo RT_tLeu2 naudotas A31 pozicijai tikrinti, RT_tLeu3 - U17a. 1,4 µM ³³P izotopu 5'-gale pažymėtas pradmuo buvo hibridizuojamas prie 0,4 µM nemodifikuotos arba nuo C/D RNP priklausomu būdu Eterneonu pažymėtos (2.2.12) tRNR-Leu. Pradmuo pratęstas pridėjus mišinio, kuriame 400 µM arba 4 µM dNTP ir 1/14 bendro reakcijos mišinio *RevertAid Premium Enzyme Mix*, bei inkubuojant 55°C 30 min. Reakcija sustabdyta pakaitinus 85°C 5 min. Lygiagrečiai atliktos sekoskaitos reakcijos buvo tokios pačios kaip modifikavimo vietos nustatymo reakcijos su 4 µM dNTP, tik hibridizacijos metu buvo 0,7 µM nemodifikuota tRNR-Leu ir po to pridėta iki 0,2 bendro reakcijos tūrio dNTP ir ddNTP mišinių, skirtų sekoskaitai *Termination Mix G/A/T/C* (iš rinkinio *CycleReader DNA Sequencing Kit*). Po išsodinimo etanoliu, atlikta mėginių elektroforezė 15% PAA denatūruojančiame gelyje ir DNR vizualizuota naudojant radioaktyvumui jautrius ekranus.

2.2.14 DNR modifikavimas *in vitro*, esant sintetinio kofaktoriaus ir AdoMet konkurencijai

HhaI metilinimo buferyje 0,125 μM eM.HhaI ir plazmidė p $\Delta\text{GH}_6\text{E119H}$ (0,25 μM GCGC taikinių) inkubuotos su kofaktorių AdoMet ir Ado-6-alkyne arba Ado-6-azide mišiniais, kuriuose bendra kofaktorių koncentracija buvo pastovi (50 μM), tačiau skyrėsi jų santykis: 0, 17, 33, 50, 67, 83 arba 100 % kiekvieno kofaktoriaus. Kontroliniuose mėginiuose nebuvo jokio kofaktoriaus. Reakcijos inkubuotos 37°C 1 val, po to MTazė išaktyvinta pakaitinus 80°C 20 min. Modifikavimo įsotinimas patvirtintas dalį reakcijos mišinio painkubavus su R.Hin6: mėginiuose, kuriuose buvo kofaktorių, DNR tapo visiškai atspari šiai endonukleazei, o kontroliniuose mėginiuose – ne. Toliau mėginiai analizuoti prijungiant fluorescencines žymes (2.2.15).

2.2.15 Modifikuotos DNR žymėjimas azidų-alkinų cikloprijungimo reakcijos būdu *in vitro*

Cu⁺ katalizuojamas azidų-alkinų cikloprijungimas. Taip žymėta DNR, modifikuota naudojant kofaktorių Ado-6-alkyne. 5 μl modifikavimo reakcijos mišinio sumaišyta su lygiu tūriu DMSO ir 1,5 μl šviežiai paruošto Cu-TBTA mišinio (kaip 2.2.12) ir 1 μl 2,5 mM Alexa647 azido (ištirpintas DMSO). Reakcijos mišinys inkubuotas 37°C 45 min ir DNR išsodinta etanoliu.

Nekatalizuojamas azidų-alkinų cikloprijungimas. Taip žymėta DNR, modifikuota naudojant kofaktorių Ado-6-azide. Į modifikavimo reakcijos mišinį pridėta MegaStokes608 ciklooktino iki 100 μM koncentracijos (jis ištirpintas DMSO, į 9 μl modifikavimo mišinio dėta 1 μl 1 mM tirpalo) ir inkubuota 37°C 1 val. Po to DNR išgryninta naudojant *Zymo Research* IIC kolonėles.

Žymėjimo specifiskumui patikrinti žymėta plazmidinė DNR inkubuota su R.HindII ir R.PscI 37°C 5 val ir taip sukarpyta į tris fragmentus: 1900 bp, kuriame yra 9 HhaI taikiniai, 1500 bp, kuriame 5 HhaI taikiniai, ir 970 bp,

kuriame nėra HhaI taikinių. Fragmentai atskirti elektroforeze 1% agarozės gelyje. Jei DNR žymėta Alexa647 dažu, ji iš karto nudažyta ir etidžio bromidu, o fluorescencija nustatyta sužadinant atitinkamai 635 nm ir 473 nm bangos ilgio lazeriais. Jei DNR žymėta MegaStokes608 dažu, pirmiausia 473 nm lazeriu nustatyta jo fluorescencija ir tik po to DNR nudažyta etidžio bromidu.

2.2.16 DNR mTAG žymėjimas ląstelių lizate

E.coli ER2267 padermės ląstelės, transformuotos pΔGH6E119H plazmide, per naktį augintos skystoje LB terpėje (200 ml), surinktos nusukant ir resuspenduotos 1 ml TE buferio (100 mM Tris·HCl pH=8,0, 100 mM EDTA). Pridėjus 2,5 mM proteazių inhibitoriaus PMSF, RNazių A/T1 mišinio ir 0,25 µg/µl lizocimo, suspensija inkubuota 37°C 1 val. Nucentrifugavus ląstelių nuolaužas ir nesulizuotas ląsteles, supernatantas padalintas į lygias dalis planuojamiems mėginiams. Pridėta eM.HhaI (galutinė koncentracija lizate 2 µM) ir Ado-6-azide (arba AdoMet) mišinio (galutinė koncentracija lizate 50 µM) TE buferyje. Inkubuota 37°C 3 val. PMSF buvo atnaujinamas kas pusvalandį.

Jei tikrintas tik modifikavimo (pirmojo žymėjimo žingsnio) našumas, plazmidės iš mišinio išskirtos *GeneJET Plasmid Miniprep* rinkiniu ir kirptos R.Hin6I bei R.McrBC 37°C 2,5 val. R.Hin6I kerpa DNR ties nemonifikuotais HhaI taikiniams, bet nekerpa ties metilintais. R.McrBC kerpa DNR šalia metilintų HhaI taikinių. Nei viena iš šių nukleazių nekerpa GCGC taikinių, modifikuotų prailgintomis grupėmis (Lukinavičius ir kt., 2012). Apsaugojimas nuo karpymo šiomis nukleazėmis patikrintas išskirsčius DNR elektroforeze agarozės gelyje ir nudažius etidžio bromidu.

Siekiant atlikti abu žymėjimo žingsnius, po modifikavimo į mišinį pridėta lygus tūris DMSO ir MegaStokes608 cikloktino iki 200 µM bei gautas mišinys inkubuotas 37°C 3 val. Galiausiai, plazmidės išgrynintos naudojant *Zymo Research* IIC kolonėles ir sukirptos R.HincII ir R.PscI bei toliau išanalizuotos kaip aprašyta 2.2.15.

3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

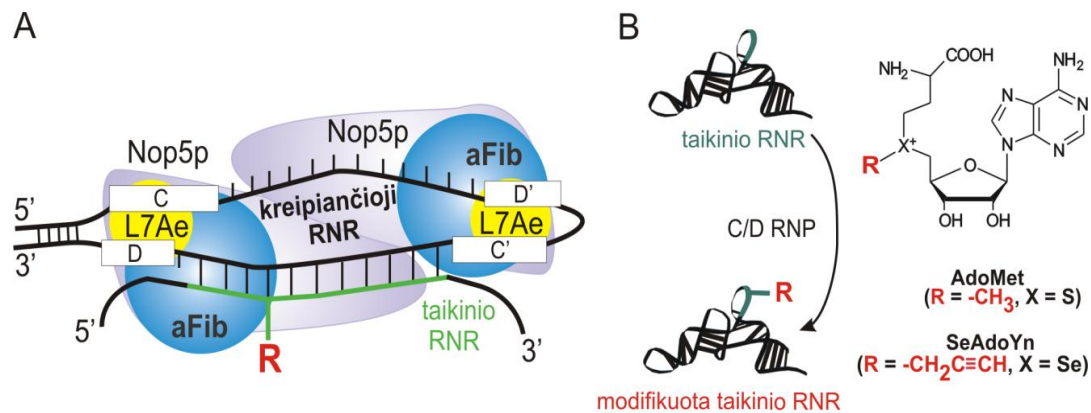
Pirmiausiai pristatomi RNR žymėjimo tyrimų rezultatai, nes tai buvo pagrindinis doktorantūros projektas.

3.1 Programuojamas sekai specifinis RNR žymėjimas panaudojant archėjų C/D RNP

mTAG metodas atvėrė galimybes specifiskai žymėti DNR (Lukinavičius ir kt., 2007, 2012; Artyukhin ir Woo, 2012), RNR (Motorin ir kt., 2011), baltymus (Peters ir kt., 2010; Islam ir kt., 2011; Wang ir kt., 2011; Willnow ir kt., 2012; Bothwell ir kt., 2012) ir mažas molekules (Lee ir kt., 2010). MTazių, kurių taikinio atpažinimas pagrįstas baltymo-substrato sąveika, specifiskumu manipuluoti yra sudėtinga. Turint omenyje unikalų C/D RNP MTazės naudojamą būdą taikiniui atpažinti (RNR-RNR sąveiką komplementarumo principu) ir iš to sekančią galimybę lengvai keisti taikinio specifiskumą, mTAG technologijos pritaikymas šiai MTazei (pav. 3.1) galėtų atverti galimybes laisvai pasirinkti taikinį bet kokioje RNR sekoje. Tereiktų užprogramuoti norimo taikinio atpažinimą atitinkamai pakeičiant kreipiančiosios RNR seką. Archėjų C/D RNP aktyvumu paremtam programuojamo sekai specifinio RNR žymėjimo metodui kurti pasirinkome literatūroje išsamiai aprašytą, *in vitro* iš rekombinantinių komponentų surenkamą C/D RNP sistemą iš hipertermofilinės archėjos *Pyrococcus abyssi* (Bortolin ir kt., 2003; Nolivos ir kt., 2005).

Kreipiančioji *P.abysii* RNR, pavadinimu sR47, yra 64 nt ilgio, turi visiškai konservatyvius C/D ir C'/D' motyvus bei dvi 12 nt ilgio kreipiančiąsias sekas. C/D pusėje susidaro K-posūkis, o C'/D' – K-kilpa. D kreipiančioji seka atpažįsta gamtinį substratą *P.abysii* tRNR-Leu(CAA) (toliau čia vadinama tRNR-Leu arba paprasčiausiai tRNR). 2'-O-metilavimo reakcija nukreipiama į šios molekulės 34-ąją sekos poziciją, t.y. pirmąjį antikodono nukleozidą citidiną (Nolivos ir kt., 2005). D' kreipiančiajai sekai kai kuriose duomenų bazėse priskirtas tRNR-Gly(UCC) substratas, tačiau seka nėra visiškai komplementari, o kito gamtinio substrato nenustatyta. *P.abysii* L7Ae

baltymas yra 128 aminorūgščių ilgio, ≈ 14 kDa molekulinės masės, Nop5p ir aFib, atitinkamai, 404 ir 227 amr. ilgio bei ≈ 47 ir ≈ 26 kDa molekulinės masės.



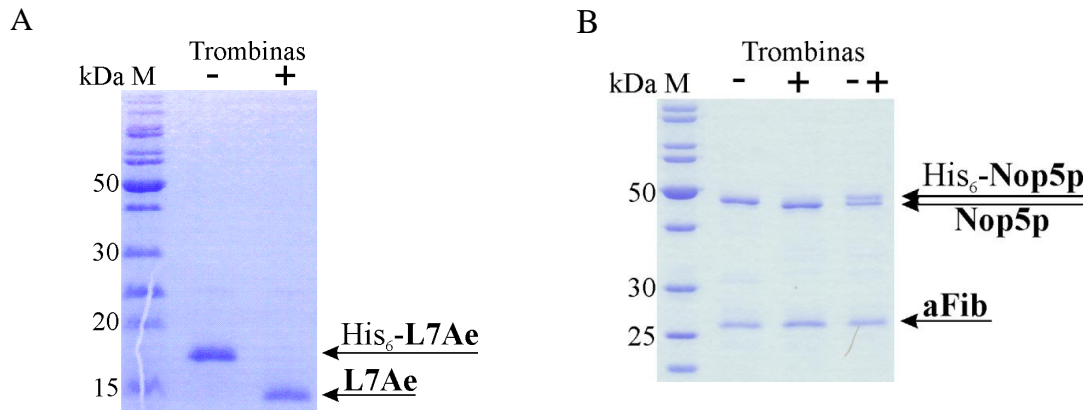
Pav. 3.1. Sekai specifinis RNR modifikavimas panaudojant archėjų C/D RNP kompleksus. (A) C/D RNP komplekso, sąveikaujančio su taikinio RNR, schema. Komplexo baltymai L7Ae, Nop5p ir aFib prisirišę prie kreipiančiosios RNR ties C/D ir C'/D' motyvais. Viena iš keičiamų kreipiančiųjų sekų komplementarumo principu sąveikauja su taikinio seka (žalia) substratinėje RNR. Modifikuojamas nukleotidas, komplementarus penktajam kreipiančiosios sekos nukleotidui, skaičiuojant nuo D motyvo. (B) C/D RNP nukreipiamas grupės (raudona) pernešimas nuo laukinio tipo kofaktoriaus S-adenozil-L-metionino (AdoMet, X=S ir R=metil-) arba sintetinio jo analogo SeAdoYn (X=Se ir R=prop-2-inil-) ant substratinės RNR.

3.1.1 C/D RNP komponentų gryninimas ir komplekso surinkimas *in vitro*

P.abysyi kreipiančioji RNR sR47 nuo rekombinantinės plazmidės su atitinkamu promotoriumi buvo transkribuota *in vitro* T7 RNR polimerazės pagalba ir išgryninta elektroforezės gelyje būdu.

P.abysyi C/D RNP baltymų raiška vykdyta archėjų baltymams sintetinti tinkamoje *E.coli* padermėje BL21(DE3)RIL. Baltymai sintetinami su pridėtinu N-galiniu His₆ fragmentu, leidžiančiu juos išgryninti Ni²⁺ giminingumo chromatografijos metodu, ir trombino atpažinimo seka, leidžiančia vėliau His₆ fragmentą nukirpti. L7Ae genas klonuotas ir grynintas atskirai. Nop5p ir aFib yra vieno operono sudėtyje ir buvo gryninti kartu. Originalią gryninimo metodiką papildėme lizato pakaitinimu 65°C – tai leidžia jau prieš chromatografiją denatūruoti ir atskirti daugumą *E.coli* baltymų.

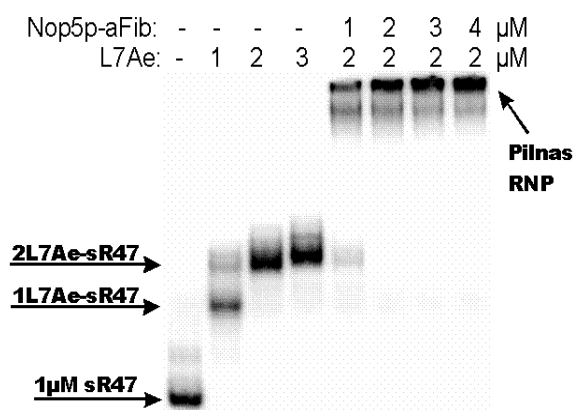
Pastebėjome, kad po Ni^{2+} giminingumo chromatografijos L7Ae preparate lieka endogeninės RNR, kuri trukdo susidaryti C/D RNP kompleksui. Tad šio baltymo gryninimo schemeje pridėjome nukleorūgščių išsodinimo polietileniminu žingsnį. O siekdami pašalinti baltymų priemaišas – jonų mainų chromatografijos žingsnį. Po gryninimo kerpant trombinu, nuo L7Ae nukirptas giminingumo His_6 fragmentas (pav. 3.2A).



Pav. 3.2. Rekombinantinių *P.abysyi* C/D RNP baltymų gryninimas. M – baltymų dydžio standartas *Unstained Protein Ladder*. **(A)** L7Ae preparatas po Ni^{2+} giminingumo chromatografijos: su His_6 fragmentu ir pastarąjį nukirpus trombinu. **(B)** Nop5p ir aFib preparatas po Ni^{2+} giminingumo chromatografijos: nekirpta trombinu (-), kirpta (+) ir nekirpto bei kirpto variantų mišinys (-+).

Žinoma, kad Nop5p ir aFib baltymus išgryninti iš rekombinantinės *E.coli* daug paprasčiau, kai jie sintetinami ir gryninami kartu, nes bendra raiška leidžia jiems sudaryti kompleksą, kuris yra daug tirpesnis nei pavieniai baltymai (Clouet-d'Orval, nepublikuoti duomenys). Užuominą apie glaudų šių baltymų ryšį jau genų raiškos metu galima rasti ir archėjų genomo sekoje: tiek *P.abysyi*, tiek kitų archėjų genome *nop5p* ir *aFib* genai yra viename operone. Todėl ir į rekombinantinę plazmidę jie buvo perkelti kartu. Tokiu atveju tik Nop5p įgauna vektoriaus koduojamą His_6 fragmentą, bet dėl stiprios Nop5p ir aFib sąveikos šie baltymai išsigrynina kartu. Kerpant trombinu visiškai nukirptas giminingumo fragmentas (pav. 3.2B). Gautas baltymo preparatas, pakankamai švarus tolesniems eksperimentams.

C/D RNP komplekso surinkimas *in vitro* iš rekombinantinių komponentų stebėtas pagal ^{33}P izotopu žymėtos sR47 elektroforetinio judrumo poslinkį. Kreipiančioji RNR turi dvi komplekso baltymų surišimo vietas – iš konservatyvių C/D ir C'/D' sekų sudarytas atitinkamai K-posūčio ir K-kilpos struktūras. Tad pilnai surinktame komplekse RNR ir baltymų molinis santykis yra 1:2. Funkcionalaus kompleksa susirinkimo metu prie sRNR K-struktūrų pirmiausiai prisijungia L7Ae, po to prie L7Ae-sRNR kompleksa jungiasi Nop5p-aFib heterodimeras (Omer ir kt., 2002). Mūsų rezultatuose (pav. 3.3) matyti, kad esant sR47 ir L7Ae santykiui 1:1 ir 1:2, susidarė du skirtingo judrumo kompleksai. Tai atitinka modelį, anot kurio, prie sR47 pirmiausiai prisijungia po vieną L7Ae molekulę (susidaro 1L7Ae-sR47 kompleksas), po to – po antrą (susidaro 2L7Ae-sR47 kompleksas). Visą 2L7Ae-sR47 kompleksa kiekį surišo tik dvigubas Nop5p-aFib heterodimero perteklius - tai taip pat atitinka teorinį molinį kompleksa narių santykį. Šiuo eksperimentu parodyta, kad iš turimų rekombinantinių komponentų *in vitro* pavyko surinkti RNP kompleksą, moliniu komponentų santykiu atitinkantį C/D RNP.



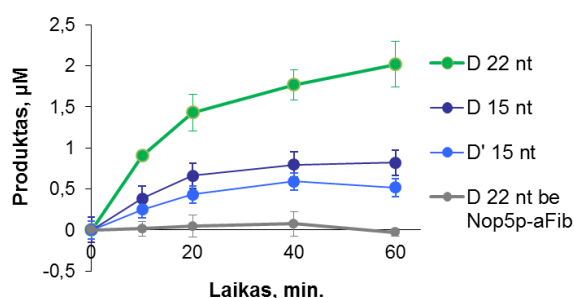
Pav. 3.3. C/D RNP surinkimo *in vitro* įvertinimas. 5' gale ^{33}P izotopu žymėta 1 μM sR47 inkubuota su L7Ae ir Nop5p-aFib heterodimeru (baltymų koncentracijos nurodytos paveikslėlyje) 70°C 15 min. Susidarę kompleksai atskirti elektroforeze nedenaatūruojančiame poliakrilamido gelyje ir vizualizuoti naudojant radioaktyvumui jautrius ekranus.

3.1.2 C/D RNP metilinimo aktyvumo įvertinimas naudojant tričiu žymėtą AdoMet

Esant pilnai surinktam C/D RNP kompleksui, tikrintas jo metilinimo aktyvumas, kuris stebėtas sekant tričiu žymėtos metilgrupės įjungimą į substratinę RNR. Naudoti du skirtingi 15 nt ilgio substratai: turintys komplementarią sritį sR47 D arba D' kreipiančiajai sekai. Nustatyta, kad C/D

RNP pusė (hemi-RNP) su D kreipiančiąja seka metilina efektyviau (pav. 3.5). Tai nėra netikėta – skirtingas hemi-RNP efektyvumas, tikriausiai atspindintis kiekvieno hemi-RNP sekos ir struktūrinius ypatumus, yra aprašytas literatūroje (Appel ir Maxwell, 2007). Dėl didesnio aktyvumo tolimesniems eksperimentams pasirinkta D kreipiančioji seka. Be to, jau anksčiau buvo parodytas *P.abysssi* C/D RNP aktyvumas su gamtiniu D kreipiančiosios sekos atpažįstamu substratu – *P.abysssi* tRNR-Leu (Clouet d’Orval, nepublikuoti duomenys).

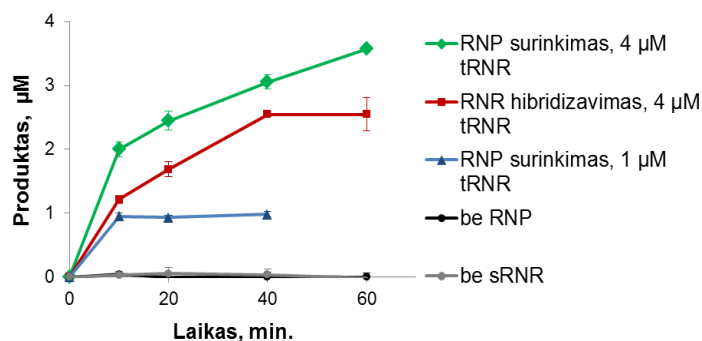
Naudojant 15 nt ilgio modelinius substratus, abiejų hemi-RNP aktyvumas nepasiekė netgi vienos katalizinės apsukos lygio, nors substrato buvo dešimtkartinis perteklius. Toks nedidelis aktyvumas su trumpais modeliniais substratais atitinka ir kitų tyrėjų duomenis, parodžiusius, kad metilinimo efektyvumas didėja papildant substratinio oligonukleotido grandinę nukleotidais už taikinio sekos, iki pasiekiant bendrą 18-21 nt ilgį. Nors komplementarumu pagrįstą sąveiką su kreipiančiąja seka sudaro 11 substrato nukleotidų, abipus šios srities esanti grandinė tikriausiai sąveikauja su kompleksu baltymais ir ši sąveika taip pat svarbi metilinimo aktyvumui (Appel ir Maxwell, 2007). D kreipiančiosios sekos substratą prailginome iki 22 nt ilgio. Metilinimo aktyvumas su tokiu substratu siekė vieną fermento apsuką per 10 min. ir dar vieną per likusį eksperimento laiką (pav. 3.4). Tad tokio ilgio modelinis substratas tinkamas C/D RNP aktyvumo su sintetiniais AdoMet analogais tyrimams, kur pageidautina bent viena apsuka.



Pav. 3.4. C/D RNP metilinimo aktyvumas su trumpais modeliniais substratais. 15 nt ilgio substratiniai RNR oligonukleotidai turėjo sekas, komplementarias sR47 D arba D' kreipiančiosioms sekoms; 22 nt substratas – D kreipiančiąjai sekai. Reakcijose 1 µM C/D RNP, 10 µM 15 nt arba 5 µM 22 nt substratas.

Pilno gamtinio sR47 D kreipiančiosios sekos substrato, *P.abysssi* tRNR-Leu(CAA), metilinimas taip pat vyko efektyviai. Optimizuojant reakcijos

sąlygas nustatyta, kad apie 30% didesnis aktyvumas pasiekiamas pirma surenkant C/D RNP ir po to pridodant substrato, o ne pirma hibridizuojant substratą su kreipiančiąja RNR ir tik po to pridodant komplekso baltymų (pav. 3.5). Tad visuose vėlesniuose eksperimentuose buvo pirma surenkamas RNP, po to pridodama substrato. Taip pat matyti, kad per 60 min įvyko 3,5 RNP vykdomos katalizės apskukų. Tai atitinka literatūros duomenis, nurodančius, kad archėjų C/D RNP su gamtiniais tRNR substratais panašiomis sąlygomis atlieka 0,8-12 metilgrupės pernašų per 45 min. (Bortolin ir kt., 2003; Singh ir kt., 2004; Ziesche ir kt., 2004). Kelių C/D RNP apskukų reakcijos sąlygos, manome, nėra palankios RNR žymėjimui dėl ilgo inkubacijos aukštoje temperatūroje laiko. Sintetiniai kofaktoriai yra mažiau stabilūs nei AdoMet, o taip pat - tokia inkubacija lemia substratinės RNR irimą. Vienos apskukos sąlygomis, esant 1 μM C/D RNP ir 1 μM tRNR, visas substratas užmetilinamas per 10 min. Tad vėlesniems eksperimentams pasirinkome šias - vienos apskukos - reakcijos sąlygas.



Pav. 3.5. C/D RNP metilinimo aktyvumas su gamtiniu D pusės substratu *P.abysssi* tRNR-Leu(CAA). Reakcijose 1 μM C/D RNP ir tRNR kaip nurodyta. Kontrolinėse reakcijose 1 μM tRNR. Tirta metilinimo aktyvumo priklausomybė nuo reakcijos

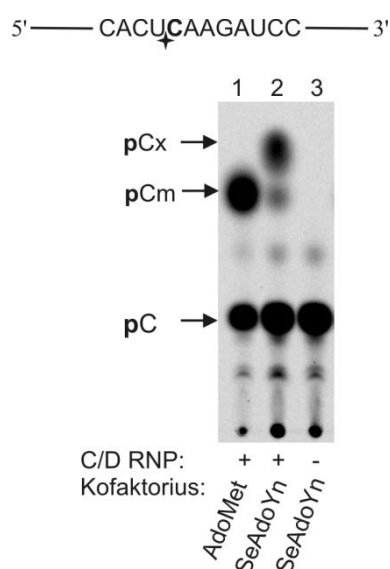
komponentų surinkimo tvarkos: pirma surinktas RNP, po to įdėtas substratas (RNP surinkimas) arba pirma substratas hibridizuotas su kreipiančiąja RNR ir po to įdėti komplekso baltymai (RNR hibridizavimas).

3.1.3 RNR modifikavimas naudojant sintetinius kofaktoriaus analogus

C/D RNP komplekso gebėjimas pernešti prailgintas grupes nuo sintetinių kofaktoriaus analogų ant taikinio nukleotido tirtas naudojant laukinio tipo kreipiančiąją RNR sR47 ir 24 nt ilgio modelinį substratą su sR47 D pusės atpažįstama seka bei 5'-³³P pažymėtu taikinio nukleotidu (citozinu). Po reakcijos RNR sukarpius iki mononukleotidų, susidarantis 2'-O-modifikuotas

citozino nukleotidas stebėtas plonasluoksnės chromatografijos (TLC) būdu (pav. 3.6). Reakcijos našumas vertintas nustatant to paties mėginio TLC dėmelių, atitinkančių modifikuotą ir nemonifikuotą citozino nukleotidą, intensyvumo santykį, o taip pat – metilintų ir su sintetiniais kofaktoriais modifikuotų produktų santykį. Metilinimo produkto pėdsakai matomi ir reakcijose su sintetiniais kofaktoriais, nes MTazės gryninimo metu preparate liko šiek tiek jos surišto AdoMet (~ 2% MTazės molinio kiekio).

Išbandyta eilė sintetinių kofaktoriaus analogų, tinkamų mTAG tipo reakcijoms: tiek modelinių, kurie neturi funkcinės grupės tolesniam žymės prijungimui, bet gali suteikti informacijos apie RNP polinkį naudoti tam tikro molekulinio dizaino kofaktorių, tiek, žinoma, tokių, kurie būtų tinkami žymės prijungimui (lentelė 3.1). Taip pat kai kuriuose iš jų kofaktoriaus sudėtyje esančio metionino sieros atomas buvo pakeistas į seleną (Willnow ir kt., 2012).

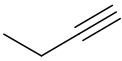
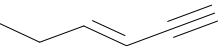
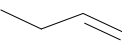
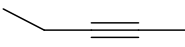


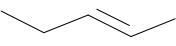
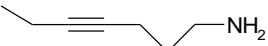
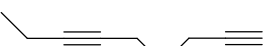
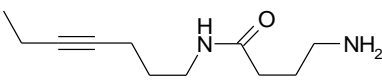
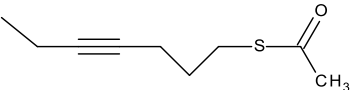


Pav. 3.6. Modifikuotų nukleotidų susidarymo 24 nt ilgio RNR substrate, inkubuotame su C/D RNP ir AdoMet arba sintetiniu kofaktoriu (šiuo atveju SeAdoYn) stebėjimas. Substratiniame oligonukleotide (parodyta viršuje) RNP atpažįstamoje sekoje taikinio citozinas (paryškintas) pažymėtas radioaktyviu ^{33}P (pažymėta žvaigždute). 1 μM RNP inkubuotas su 1 μM substratu ir 50 μM AdoMet arba 400 μM SeAdoYn 40 min, esant 65°C. Po to RNR sukarchyta nukleaze Bal31, ir nukleotidai analizuoti TLC metodu. Rodyklėmis parodyti taikinio nukleotido produktai, susidarantys esant kofaktoriams AdoMet (takelis 1, čia pCm sudaro 45% bendro taikinio nukleotido kiekio) arba SeAdoYn (takelis 2, pCx sudaro 5% nuo bendro nukleotido kiekio). Kontrolinėje reakcijoje su SeAdoYn nebuvo Nop5p-aFib baltymų, modifikacijos produktas nesudarė (takelis 3).

Siekiant pagerinti aktyvumą, optimizuoti įvairūs reakcijos sąlygų aspektai.

Reakcijos buferis ir papildomos medžiagos. Modifikavimo priklausomybė nuo buferio pH buvo patikrinta pH intervale 6,0-8,5. Produkto

Lentelė 3.1. Sintetiniai kofaktoriai, išbandyti su C/D RNP (čia parodytos tik pernešamos grandinės – R, o bendra kofaktorių struktūros schema parodyta pav. 3.1). Efektyvumas nustatytas su laukinio tipo RNP ir modeliniu substratu RNR oligonukleotidu, plonasluoksnės chromatografijos metodu.

S/Se centras	Pernešama grupė (R)	Galima prijungti žymę	% ^a	Kofaktoriaus pavadinimas	Šaltinis
S	-CH ₃	-	50-97	AdoMet	-
Se		+	5-10	SeAdoYn	Willnow ir kt., 2012
S		+	2-7	AdoEnYn	Peters ir kt., 2010
S		-	5-8	AdoPropen	Dalhoff ir kt., 2006
S		-	2-5	AdoButin	
S		-	1-3	AdoEt	Weinhold grupė, nepub.
Se		-	1-3	SeAdoEt	
S		-	3	AdoButen	Lukina-vičius ir kt., 2013
S		+	0	Ado-6-amine	
S		+	0	Ado-6-alkyne	
S		+	0	Ado-11-amine	
S		+	0	Ado-6-SCOCH ₃	Klimašausko grupė, nepub.

^a modifikuoto taikinio nukleotido dalis bendrame taikinio nukleotido kiekyje, procentais.

kiekis didėjo didėjant pH (pav. 3.7A ir D), tikriausiai dėl didėjančio kofaktorių reaktyvumo. Bet hidroksido jonai lemia RNR nestabilumą ardydami fosfodiesterinius ryšius. Todėl galiausiai palikome pH=7,9 – tokį, koks jau buvo parinktas kaip tinkamiausias metilinimui (Bortolin ir kt., 2003). Buferuojančia medžiaga pasirinktas Hepes, nes jis gerai palaiko pH kintant temperatūrai (Beynon ir Easterby, 1998). Yra žinoma, kad nuo Mg²⁺ jonų priklauso RNR struktūra, o tai gali įtakoti susijusias reakcijas (Draper, 2004), įskaitant ir C/D RNP veiklą (Appel ir Maxwell, 2007). Mg²⁺ koncentracijos didinimas (tirta nuo 1,5 mM iki 50 mM) taip pat lėmė didesnę modifikacijos produkto kiekį (Pav. 3.7B ir E). Bet vėlgi, yra žinoma, kad esant didesnėms

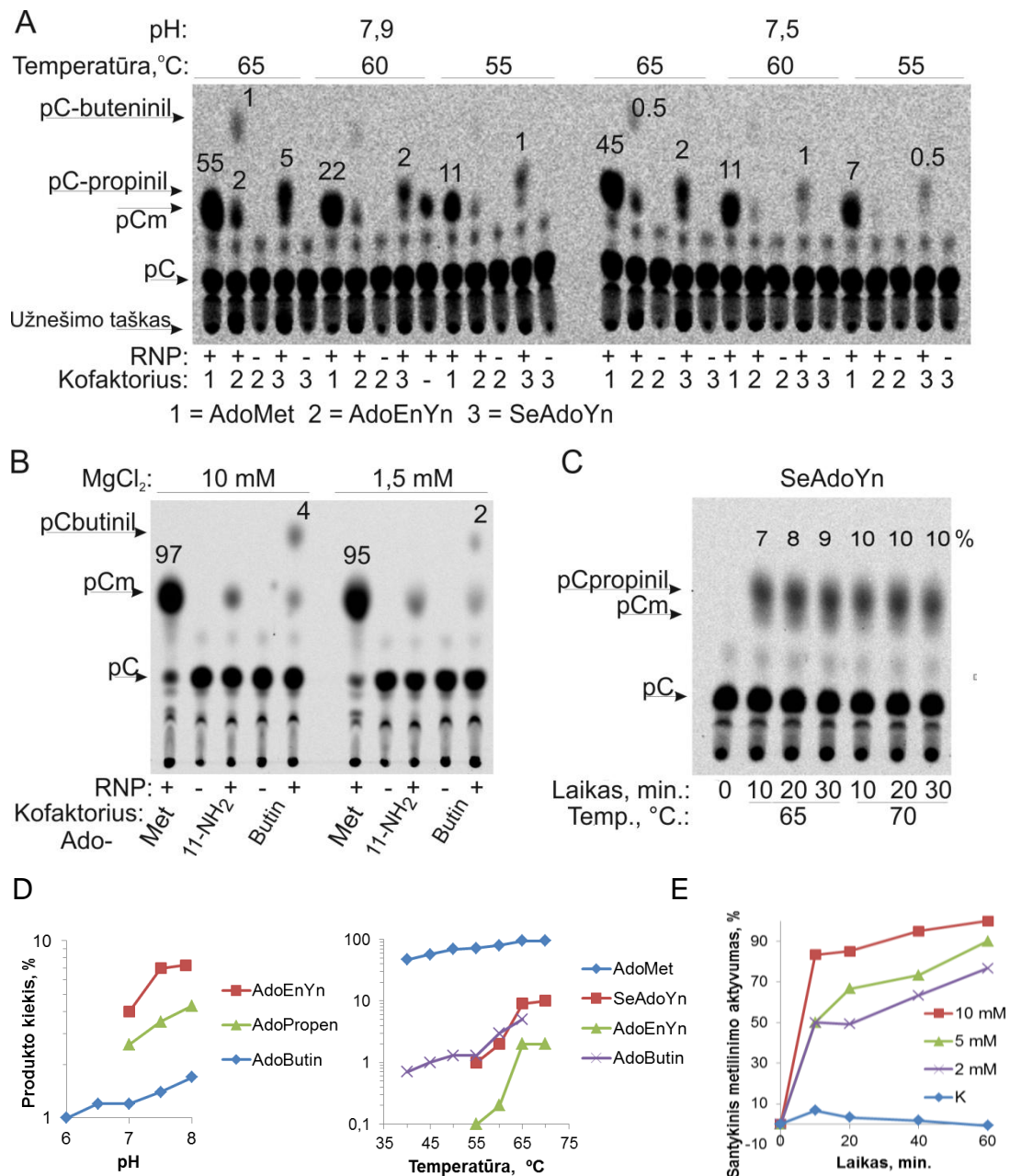
Mg²⁺ koncentracijoms, RNR mažiau stabili. Taigi, apsisistojome ties 10 mM Mg²⁺. NaCl arba KCl koncentracijų intervale 150 mM–2 M nebuvo pastebėta reikšmingų modifikavimo skirtumų, taip pat ir pridėjus 0,2 mg/ml BSA. Tirpalą papildžius nespecifinėmis nukleorūgštimis, tokiomis kaip *E.coli* tRNR mišinys ar *Clupea sp.* DNR iki 0,5 mg/ml, stebimoji produkto išeiga padidėjo 1-2%. Tačiau šių priedų vėliau teko atsisakyti, kad netrukdytų stebėti rezultatų elektroforezės gelyje ir HPLC-MS metodais.

Temperatūra. Yra žinoma, kad optimali temperatūra *in vitro* metilinimui *Pyrococcus* genties archėjų C/D RNP kompleksams yra apie 72°C (Bortolin ir kt., 2003; Hardin ir Batey, 2006, bei mūsų duomenys). Tai gerokai aukšta temperatūra vertinant iš kofaktorių ir substratinės RNR stabilumo perspektyvos. Taigi, norėjome ją kiek įmanoma sumažinti stipriai neprarandant aktyvumo. Nustatėme RNP aktyvumą su sintetiniais kofaktoriais 40-70°C intervale ir teko pripažinti, kad netgi metilinimo, o taip pat ir kitų modifikacijų, aktyvumas sparčiai silpsta žemėjant temperatūrai (Pav. 3.7A,C ir D). Vis dėlto, substratinė RNR mažiau yra esant 65°C nei esant 70°C. Taigi, kuriamam metodui tinkamiausia nusprendėme esant 65-68°C temperatūrą.

Inkubacijos trukmė. Vienos apskokos sąlygomis ($[E] \geq [S]$) metilinimas įvyksta per 10-15 min. Su sintetiniais kofaktoriais, pasirinkus 65°C temperatūrą, maksimaliai išeigai pasiekti prireikė mažiausiai 30 min. (Pav. 3.7C)

Kofaktoriaus koncentracija. Yra nustatyta, kad *Pyrococcus* genties archėjų C/D RNP ir kofaktoriaus AdoMet K_d yra ≈22 μM (Hardin ir Batey, 2006). Metilinimo reakcijose naudojom 52 μM AdoMet. Sintetinių kofaktorių atveju buvo naudojamos 150-400 μM koncentracijos. Be to, didesniai modifikavimo našumui pasiekti buvo bandyta papildomai pridėti kofaktoriaus tirpalo reakcijos eigoje, nes aukštoje temperatūroje jie skyla palyginti greitai. Tačiau tai stebimų išeigų nepadidino.

Pastebėtina, kad mūsų gaunami modifikavimo įvertinimai procentais galėjo būti šiek tiek mažesni nei tikrosios išeigos dėl to, kad 2'-O-modifikacijos gali trukdyti nukleazėms hidrolizuoti RNR. TLC rezultatuose,



Pav. 3.7. C/D RNP aktyvumo su AdoMet ir sintetiniais kofaktoriais priklausomybė nuo skirtingų reakcijos sąlygų. 1 μ M 24-nt ilgio modelinis RNR substratas inkubuotas su 1 μ M C/D RNP ir 52 μ M AdoMet arba 400-600 μ M sintetiniais kofaktoriais AdoEnYn, SeAdoYn, Ado-11-amine ir AdoButin, esant pH=7,9, 65°C, 10 mM MgCl₂, inkubacijai 30-40 min., jei nenurodyta kitaip. Po to RNR buvo sukurta nukleaze Bal31 ir ³³P-pažymėti nukleotidai analizuoti TLC metodu. Rodyklėmis parodyti taikinio nukleotido produktai. Prie dėmelių nurodytas jų santykinis ryškumas procentais, įvertinant visas citozino nukleotidų atitinkančias dėmeles. **(A)** Reakcijos su AdoMet, AdoEnYn arba SeAdoYn esant skirtingam pH ir temperatūrai. **(B)** Reakcijos su AdoMet, Ado-11-amine (11-NH₂) arba AdoButin esant MgCl₂ koncentracijoms 10 mM ir 1,5 mM. **(C)** Reakcijos su SeAdoYn esant skirtingai inkubacijos temperatūrai ir trukmei. **(D)** Modifikavimo priklausomybė nuo reakcijos tirpalo pH ir temperatūros, nustatyta šiuo metodu, su prie kreivių nurodytais kofaktoriais. **(E)** tRNR-Leu metilinimo efektyvumo priklausomybė nuo

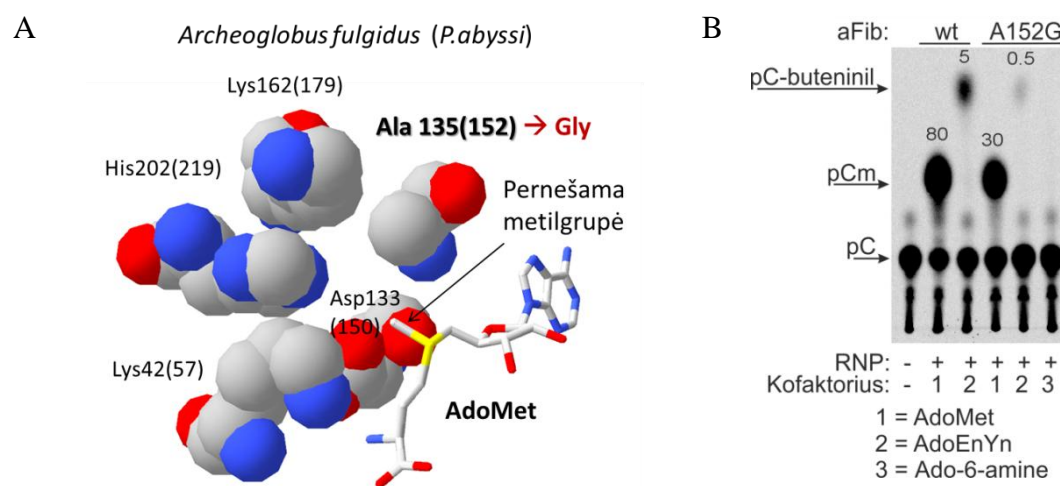
MgCl₂ koncentracijos reakcijos mišinyje (nurodyta prie kreivių), nustatyta tričio įjungimo metodu, kaip pav. 3.5; K – poliU vietoj tRNR substrato, esant 10 mM MgCl₂.

ties mėginių užnešimo taškais, buvo matyti, kad reakcijose su RNP ir sintetiniais kofaktoriais kartais lieka daugiau nesukarpytos RNR nei kontrolinėse reakcijose (pvz. pav. 3.7A). Tačiau dinukleotidų, kurie teoriškai galėtų likti dėl 2'-O-modifikacijos ir būtų lengvai įvertinami, nebuvo rasta, todėl nepilno modifikuotos RNR sukarpymo vertinimai į išėgų rezultatus neįtraukti. Kitas pastebėjimas – nepastovus metilinimo našumas, esant toms pačiomis sąlygomis svyruojantis kelių dešimčių procentų intervale. Spėjame, kad taip galėjo nutikti dėl ³³P žymėto substrato nestabilumo: reakcijose su šviežiai pagamintu substratu metilinimo našumas būdavo arti maksimalaus (97%) ir mažėdavo eksperimentus su tuo pačiu substrato preparatu atliekant vėlesnėmis dienomis. Bendroji substrato koncentracija reakcijose nekito, nes radioaktyviai žymėtas substratas sudarė tik apie 0,1% visų substrato molekulių. Tad vertindami modifikavimo sintetiniais kofaktoriais išėgas atsižvelgėme ne tik į produktų santykį su to paties mėginio kitais citozino nukleotidais, bet ir santykį su metilinimo reakcijos produktu.

Galiausiai, nepaisant visų pastangų rasti C/D RNP vykdomam mTAG optimalias sąlygas, nustatyta, kad esant sintetiniams kofaktoriams su pernešama grandine, ilgesne nei 5 anglies atomai, C/D RNP pernašos nevykdo. O daugumą trumpesnių grupių kompleksas pernešė nedideliu efektyvumu – modifikuota 3-10% substrato. Pažymėtina, kad šis modifikavimo aktyvumas buvo priklausomas nuo RNP, nes nesant Nop5p-aFib, modifikuoti nukleotidai nesusidarydavo (pav. 3.6, 3.7, 3.8B). Iš pastarąsias grupes turinčių kofaktorių žymėjimui tinkami du: AdoEnYn ir SeAdoYn. Abu turi galinę trigubą jungtį, todėl su žyme gali būti jungiami „click“ chemijos būdu. Dėl geriausio aktyvumo su C/D RNP tolimesniems RNR žymėjimo eksperimentams pasirinktas SeAdoYn.

3.1.4 *Pyrococcus abyssi* aFib aktyvaus centro mutagenezė

Yra parodyta, kad erdvinė DNR MTazių aktyvaus centro inžinerija leidžia padidinti katalizinės pernašos aktyvumą su sintetiniais kofaktoriais, turinčiais linijines pernešamas grupes (Klimašauskas ir Weinhold, 2007; Lukinavičius ir kt., 2007, 2012). Tokią praktiką siekėme pritaikyti ir C/D RNP MTazei. Mūsų naudojamo komplekso (ar jo dalių) kristalinė struktūra nėra nustatyta, todėl rėmėmės homologais. Giminingų archėjų rūšių C/D RNP kristalinėse (ir atskirų narių) struktūrose (Lin ir kt., 2011; Aittaleb ir kt., 2003) matyti, kad surišto kofaktoriaus pernešamą metilgrupę aFib aktyviajame centre supa Asp, His, Ala ir dvi Lys aminorūgštys (pav. 3.8A) iš vienos pusės ir surištas RNR substratas iš kitos. Visos šios aminorūgštys yra nekintamos fibrilarino sekoje nuo archėjų iki stuburinių (Deng ir kt., 2004). Katalizinis K-D-K-H ketvertas yra struktūriškai konservatyvus fibrilarino baltymų šeimoje ir erdviškai atitinka K-D-K-E ketvertą, esantį RrmJ (pavieniui veikiančių RNR 2'-O-MTazių) baltymų šeimoje (Feder ir kt., 2003). Eksperimentuose su pačiu archėjų aFib parodyta, kad katalizinis Asp yra būtinas metilinimo aktyvumui



Pav. 3.8. Metiltransferazės aFib aktyvaus centro praplėtimas. (A) Fibrilarino konservatyvios aminorūgštys aktyviajame centre ir jame išsidėstęs kofaktorių AdoMet, *Archeoglobus fulgidus* fibrilarino pavyzdžiu (Aittaleb ir kt., 2003, PDB kodas 1NT2). Atitinkamų *P.abyssi* aminorūgščių numeriai pateikti skliausteliuose. (B) C/D RNP su laukinio tipo (wt) ir A152G mutaciją turinčiu aFib aktyvumas su AdoMet ir sintetiniais kofaktoriais AdoEnYn bei Ado-6-amine. Visa kita kaip aprašyta pav. 3.7.

(Aittaleb ir kt., 2004). Visos katalizinio ketverto aminorūgštys buvo iširtos mutagenzės būdu *E.coli* rRNR 2'-O-MTazėje RrmJ ir pripažintos kritiškai svarbiomis ar svarbiomis metilinimo aktyvumui (Hager ir kt., 2002). *S.cerevisiae* ląstelėse temperatūrai jautrūs mutantai buvo gauti pakeitus Ala-245 į Val (atitinka *P.abysyi* fibrilarino Ala-152) (Tollervey ir kt., 1993). Tad tikintis praplėsti fibrilarino aktyvųjų centrą nepažeidžiant katalizinio aktyvumo, beliko pasirinkti Ala-152 pakeitimą į mažesnę aminorūgštį Gly. Atitinkamo kodono pakeitimą atlikome racionalios mutagenzės būdu, rekombinantinėje plazmidėje, kurią naudojome Nop5p bei aFib bendrai raiškai. Nop5p ir aFibA152G išgryninti taip pat kaip ir laukinio tipo baltymai. Tačiau įvesta mutacija sumažino RNP katalizinį aktyvumą tiek su AdoMet, tiek su sintetiniais kofaktoriais (pav. 3.8B).

3.1.5 Mezofilinės archėjos RNP baltymų klonavimas ir gryninimas

Kaip jau minėta anksčiau, *P.abysyi* C/D RNP optimali transferazinio aktyvumo temperatūra yra apie 70°C, o žemesnėje temperatūroje našumas sparčiai mažėja. Tačiau AdoMet analogai nėra stabilūs ir tokioje aukštoje temperatūroje reakcijos mišinyje greitai skyla. Substratinės RNR vientisumui išsaugoti taip pat palankesnė būtų žemesnė temperatūra. Tad buvo nuspręsta patikrinti, ar mezofilinių archėjų genomuose yra požymių, rodančių, kad jos turi aktyvius C/D RNP ir, jei taip, parinkti genus tokio RNP klonavimui. Galiausiai buvo pasirinkta žmogaus žarnyno archėja *Methanobrevibacter smithii*. Naudojantis internetine archėjų genomų svetaine *Archaeal Genome Browser* (Schneider ir kt., 2006) nustatyta, kad šiame organizme yra išsilaikę konservatyvūs visų C/D RNP komplekso baltymų genai. Nop5p ir aFib yra viename operone. Rastas būdingas archėjoms tRNR-Trp genas su introne esančia ir toje tRNR taikinį turinčia kreipiančiąja C/D RNR. Taip pat rasta kitų kreipiančiųjų C/D RNR genų. Visa tai leido daryti prielaidą, kad ši mezofilinė archėja turi aktyvią C/D RNP sistemą. Nuspręsta šią sistemą klonuoti ir bandyti pritaikyti RNR žymėjimo tikslams. RNP baltymų genai padauginėti PGR būdu nuo *M.smithii* genomines DNR ir klonuoti į *E.coli* raiškos sistemą,

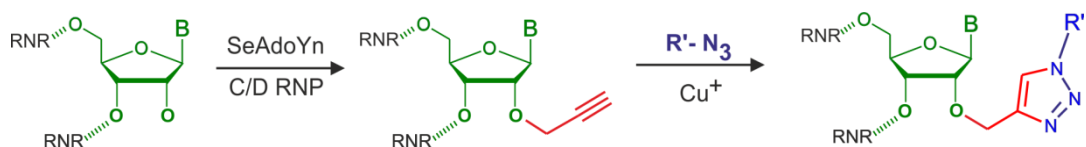
tokią pačią, kokia naudota *P.abysyi* baltymams. L7Ae baltymas atskirai, o Nop5p ir aFib – kartu viename operone.

L7Ae baltymas sėkmingai išgrynintas Ni^{2+} giminingumo chromatografijos būdu.

Nop5p ir aFib baltymai, nepaisant įvairiapusiško raiškos ir gryninimo sąlygų optimizavimo, buvo netirpūs. Tad jie buvo perkelti į kitą *E.coli* raiškos sistemą - tokia, kuri yra skirta tikslinių baltymų raiškai, peptidine grandine N-gale prijungiant NusA baltymą (475 amr., ≈ 58 kDa). NusA yra tirpiausias *E.coli* baltymas ir suliejimas su juo dažnai suteikia galimybę išgryninti mažu tirpumu pasižyminčius baltymus (Davis ir kt., 1999). Šios raiškos sistemos pagalba susintetintus baltymus galima išgryninti Ni^{2+} giminingumo chromatografijos būdu. Buvo išbandyti visi keturi suliejimo variantai: kai abu baltymai yra viename operone ir NusA yra prijungtas prie vieno iš jų, arba kiekvienas baltymas su prijungtu NusA grynintas atskirai (pav. 2.1). Tirpus Nop5p-aFib kompleksas, išgryninus baltymus ir proteolitiškai nuskėlus NusA, sėkmingai gautas tuo atveju, kai viename operone buvo NusA-aFib ir Nop5p. Tačiau C/D RNP kompleksas (su taip pat mezofilinės archėjos *Haloferax volcanii* RNR) buvo neaktyvus *in vitro*.

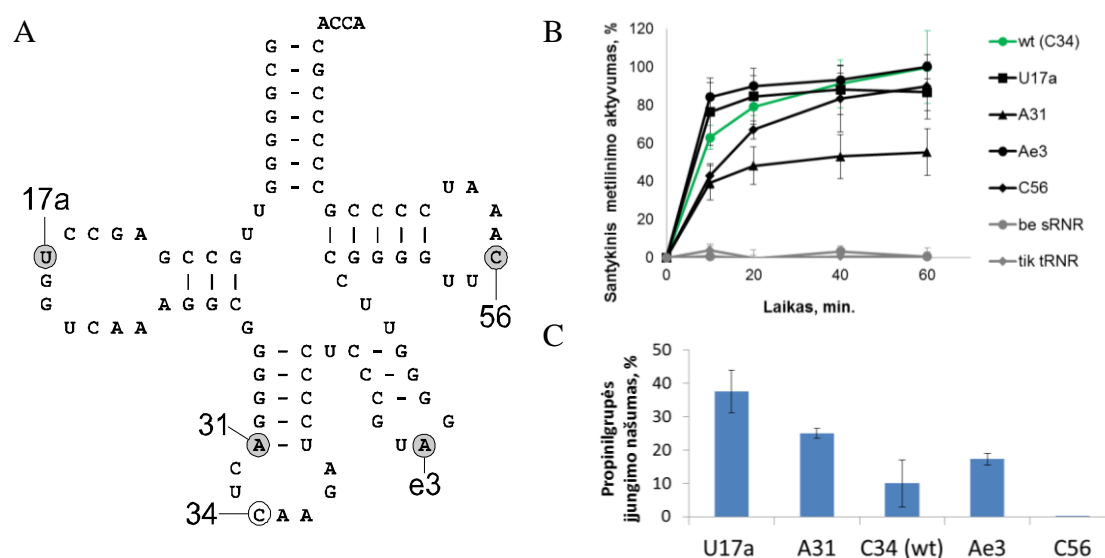
3.1.6 C/D RNP specifiškumo programavimas

RNR žymėjimo sistema toliau buvo kuriama laukinio tipo *P.abysyi* C/D RNP ir sintetinio kofaktoriaus SeAdoYn pagrindu. RNR žymėjimo, naudojant šį kofaktorių, schema pateikta pav. 3.9.



Pav. 3.9. Dviejų žingsnių RNR žymėjimas, pasitelkiant C/D RNP katalizuojamą specifinį prop-2-inilgrupės (raudona) pernešimą nuo sintetinio kofaktoriaus analogo SeAdoYn ir po to prie perneštos grupės prijungiant fluoroforo azidą (mėlynas) Cu^+ katalizuojamo azidų-alkinų 1,3-cikloprijungimo („click“ chemijos) būdu.

Tam, kad parodytumėm, jog sistemą galima perprogramuoti ir nukreipti į norimus RNR taikinius, buvo sukonstruota eilė kreipiančiųjų RNR, modifikavimą nukreipiančių į kitus pasirinktus tRNR-Leu sekos nukleotidus: U17a D kilpoje, A31 antikodono stiebelyje, Ae3 kintančiojoje kilpoje ir C56 Ψ kilpoje (pav. 3.10A). Tai buvo padaryta atitinkamai pakeičiant 12 nt ilgio D kreipiančiąją seką sR47 kreipiančiojoje RNR. Gautos kreipiančiosios RNR buvo pavadintos pridėdant atitinkamus taikinio nukleotidų pavadinimus, pvz. į tRNR-Leu A31 nukleotidą RNP nukreipianti RNR čia vadinama sR47-A31. Pirmiausiai ištyrėme C/D RNP kompleksų, turinčių naujus kreipiančiosios RNR variantus, metiltransferazinį aktyvumą su tRNR-Leu substratu, esant tričiu žymėtam kofaktoriui AdoMet. RNP kompleksų su naujomis kreipiančiosiomis RNR metilinimo aktyvumas buvo panašus kaip ir esant laukinio tipo sR47 (pav. 3.10B), išskyrus sR47-A31 kreipiančiąją, kurios atveju stebėtas gerokai mažesnis metilgrupės įjungimas į substratinę RNR. Tai

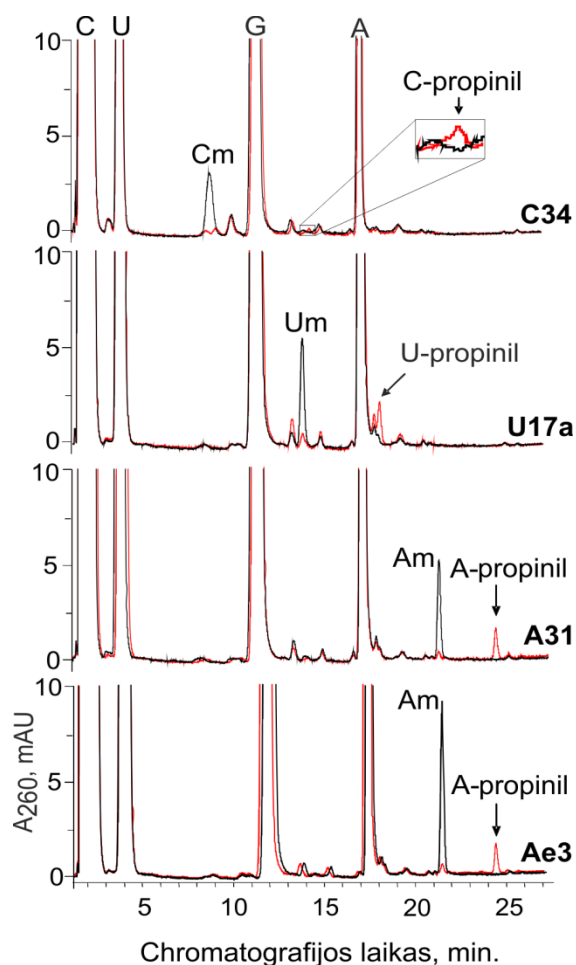


Pav. 3.10. C/D RNP nukreipimas į pasirinktas vietas modeliniame tRNR substrate: (A) *P. abyssi* tRNR-Leu(CAA) antrinė struktūra (pagal *Archaeal Genome Browser*). Laukinio tipo sR47 kreipiančiosios RNR taikiny (C34) pažymėtas baltu apskritimu, o naujai užprogramuoti taikiniai (U17a, A31, Ae3 ir C56) – pilkais apskritimais. (B) C/D RNP vykdomo tRNR metilinimo priklausomybė nuo pasirinkto taikinio. 1 μM C/D RNP inkubuoti su 1 μM modeliniu tRNR substratu ir 100 μM tritį metilgrupėje turinčiu AdoMet 68°C temperatūroje. (C) C/D RNP vykdomo propilgrupės įvedimo į tRNR priklausomybė nuo pasirinkto taikinio. 1 μM C/D RNP inkubuoti su 1 μM modeliniu tRNR substratu ir SeAdoYn (400 μM) 68°C temperatūroje 30 min.

gali būti paaiškinta tuo, kad jos taikinio nukleotidas yra antikodono stiebelyje – sunkiau išardomoje struktūroje, tuo tarpu kai visi kiti tiriami taikinio nukleotidai yra segtuko struktūrų kilpose. Tokia RNP metilinimo našumo priklausomybė nuo taikinio padėties RNR struktūrose – stiebeliuose ir kilpose – yra aprašyta literatūroje (Appel ir Maxwell, 2007). Reakcijų specifiškumas buvo patvirtintas HPLC-MS metodu tiriant nukleozidus, gautus sukarpius metilintą tRNR-Leu. Metilgrupė buvo rasta tik ant nukleozidų, atitinkančių esančius taikinio vietoje (pav. 3.11).

Siekiant nustatyti, ar C/D RNP gali būti panaudotas įjungti žymėms į RNR molekulę pasirinktose vietose, tikrinome perprogramuotų C/D RNP variantų aktyvumą su SeAdoYn kofaktoriumi. Modifikuotos tRNR nukleozidų tyrimas HPLC-MS metodu parodė esant naujų junginių su panašiais UV absorbcijos spektrais, bet ilgesniu chromatografinio užlaikymo laiku nei būdinga metilintiems nukleozidams (pav. 3.11). Tuo tarpu kontroliniame mėginyje, kuriame nebuvo funkcionalios MTazės (nepridėta Nop5 ir aFib baltymų), nerasta jokių modifikuotų nukleozidų. Nustatytos modifikuotų produktų m/z vertės patikimai atitiko teorines propinilintų atitinkamų taikinio nukleozidų mases (lentelė 3.2). Visais atvejais buvo aptinkamas tik vieno tipo, taikinį atitinkantis, propinilintas nukleozidas (atkreipkite dėmesį, kad taikiniai parinkti taip, kad gretimų 3' ir 5' pusėse esančių nukleotidų tipas skiriasi nuo taikinio nukleotido). Vadinasi, su sintetiniu kofaktoriumi C/D RNP kompleksas išlaikė jam būdingą labai tikslų reakcijos nukreipimą į taikinio nukleotidą. Propinilgrupės įjungimo našumas buvo nustatytas palyginant atitinkamų propinilintų ir metilintų nukleozidų smailių plotus UV chromatogramose. Propinilinimo, lyginant su metiliniu, našumas daugiausiai siekė apie 35%, t.y. 10% laukinio tipo taikinyje (C34), 38% U17a, 24% A31, 17% Ae3 taikiniuose, o C56 atveju modifikuoto produkto nebuvo aptikta (pav. 3.10C). C56 atvejis įdomus: šis taikinis C/D RNP komplekso buvo metilinamas taip pat gerai kaip ir kiti, ir netgi geriau nei A31, tačiau propinilinimo produktų neaptikta. To priežastis galėtų būti aukštas Ψ stieblio G+C lygis. Kadangi SeAdoYn fiziologiniame buferyje suskyla (Willnow ir kt.,

2012) daug greičiau nei AdoMet (Lukinavičius ir kt., 2013), nepamatuojamai mažą modifikavimo reakcijos našumą, lygiagrečiai esant to paties taikinio našiam metilinimui, galėtų sąlygoti lėtesnė hibridizacija. Vis dėlto, A31 taip pat yra stipriai bazių poromis sujungtame stiebelyje, tačiau jis buvo palyginti gerai modifikuojamas. Taip pat pažymėtina, kad stebimas propinilinio reakcijos našumas galėjo būti šiek tiek mažesnis nei tikrasis dėl to, kad 2'-O-propinil- modifikacija galbūt labiau nei metilgrupė apsunkina RNR hidrolizę P1 nukleaze. Vis dėlto, tai, kad reakcijos našumas su kofaktoriaus analogu buvo mažesnis nei su AdoMet, nestebina ir gali būti paaiškinta tikėtiniais erdviniais trukdžiais, susidaranciais dėl stambesnės pernešamos grupės. Galiausiai, visi šie rezultatai rodo, kad perprogramuojant kreipiančiąją RNR, nuo C/D RNP priklausomas 2'-O-propinilinimas gali būti nukreipiamas į naujas pasirinktas RNR vietas.



Pav. 3.11. C/D RNP katalizuojamos reakcijos, esant skirtingiems kreipiančiosios RNR variantams ir AdoMet arba SeAdoYn kofaktoriui, produktų tyrimas HPLC. Modifikavimas buvo nukreiptas į tRNR-Leu C34, U17a, A31 arba Ae3 pozicijas – pažymėta prie chromatogramų. Reakcija su AdoMet – juoda linija, su SeAdoYn – raudona linija. 1 μ M C/D RNP, turintys atitinkamas kreipiančiąsias RNR, inkubuoti su 1 μ M modeliniu tRNR substratu, AdoMet (50 μ M) arba SeAdoYn (400 μ M), 68°C temperatūroje 30 min. Išgryninta RNR fermentiškai suskaldyta iki nukleozidų ir tirta HPLC-MS metodu. HPLC chromatogramos užrašytos matuojant 260 nm bangos ilgio šviesos sugertį. Chromatogramos normalizuotos pagal nemodifikuotų nukleozidų smailes. Nurodytų modifikuotų nukleozidų tapatybė patvirtinta masių spektrometrija (lentelė 3.2).

Lentelė 3.2. Masių spektrometrijos tyrimas HPLC chromatografijos frakcijų, atitinkančių modifikuotus nukleozidus, susidarančius po substratinės RNR inkubacijos su C/D RNP variantais, turinčiais skirtingas kreipiančiąsias RNR.

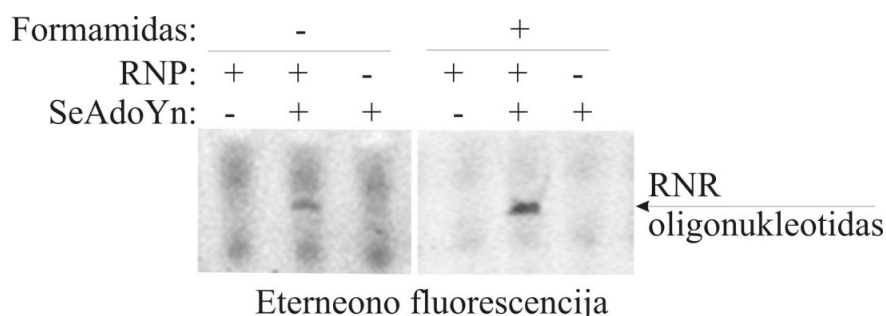
Taikinys ir modifikacija	Teorinė protonuoto nukleozido masė	Nustatytas m/z dydis
C34(wt)	Metil-	258,1084
	Propinil-	282,1084
U17a	Metil-	259,0925
	Propinil-	283,0925
A31	Metil-	282,1202
	Propinil-	306,1202
Ae3	Metil-	282,1202
	Propinil-	306,1202

3.1.7 Programuojamas tRNR žymėjimas fluoroforu

Sėkmingai mTAG būdu įvedę propinilgrupę į pasirinktas vietas tRNR molekulėje, siekėme parodyti, kad, pasitelkiant „click“ chemiją, prie taip modifikuotų nukleotidų galima prijungti žymę. Pasirinkome prijungti fluoroforą ir tam naudojome fluorescencinio dažo Eterneono-480/635 (toliau čia vadinamas tiesiog Eterneonu) azidą.

Azidų-alkinų cikloprijungimo reakcijos sąlygos pirmiausiai buvo optimizuotos naudojant 24 bp DNR oligonukleotidą su mTAG būdu įvesta grandine, turinčia galinį trigubą ryšį. DNR oligonukleotidui modifikuoti naudota MTazė eM.HhaI ir kofaktorių Ado-6-alkyne, antrame žingsnyje - Eterneono azidas (pav. 3.19A). Pasiektas žymėjimo našumas, artimas 100%. Nustatėme, kad „click“ reakcijai nėra būtina substratinė DNR ar RNR išgryninti iš modifikavimo reakcijos mišinio – užtenka jį papildyti azido prijungimui reikalingais reagentais. Po modifikavimo reakcijos netgi paranku palikti mišinyje nepanaudotą kofaktorių ir jo skilimo produktus, taip išlaikant aukštesnę reaguojančių grupių koncentraciją, reikalingą efektyviam azidų ir alkinų jungimuisi. DNR žymėjimo atveju fermento-substrato kompleksas po modifikavimo reakcijos buvo išardomas karščiu, kad modifikuotas nukleotidas taptų geriau prieinamas fluoroforo azidui. *P.abysyi* C/D RNP yra termostabilus,

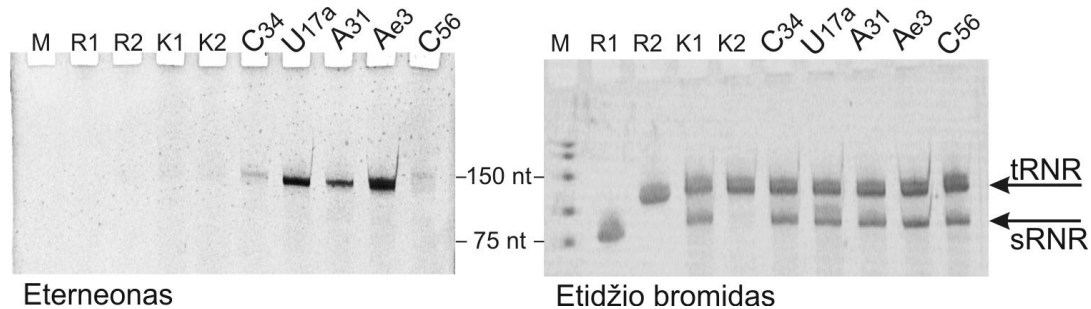
todėl fermento-substrato kompleksą, o kartu ir galbūt antrajam žymėjimo žingsniui nepalankią substratinės RNR struktūrą, pabandėme išardyti žinomu RNR denatūracijos reagentu formamidu. Po modifikavimo reakcijos pridėjus lygų tūrį šio reagento, fluoroforo prijungimas prie modifikuoto RNR oligonukleotido tapo pastebimai našesnis (3 kartus ryškesnis fluorescencijos signalas) (pav. 3.12). Po fluoroforo prijungimo RNR iš mišinio išvalyta vienu žingsniu – gryninimu per kolonėles (*ZR RNA MicroPrep* rinkiniu).



Pav. 3.12. Modifikavimo reakcijos komponentų denatūracija formamidu prieš antrąjį žymėjimo žingsnį. Modelinis substratas 22 nt ilgio RNR oligonukleotidas (10 μ M) modifikuotas su wt C/D RNP (4 μ M) ir SeAdoYn (400 μ M) inkubuojant 65°C 60 min. Po modifikavimo reakcijos pridėtas (kaip pažymėta) lygus tūris formamido, po to – „click“ chemijos reagentai (DMSO, CuBr, TBTA ir Eterneono-480/635 azidas). Mišinys inkubuotas 37°C 30 min. Galiausiai RNR išgryninta per kolonėles (*ZR RNA MicroPrep* rinkiniu). Po mėginių elektroforezės PAA gelyje išmatuota Eterneono fluorescencija. Prieš „click“ reakciją formamidu papildyto mėginio Eterneonu pažymėtos RNR fluorescencijos signalas buvo maždaug 3 kartus stipresnis nei mėginyje, nepaveiktame formamidu.

Substratinės tRNR molekulės, modifikuotos turimais C/D RNP variantais, po „click“ chemijos reakcijos su Eterneono azidu įgavo aiškų fluorescencinį švytėjimą (pav. 3.13). Fluorescencijos signalas matomas tik ties RNR, atitinkančia tRNR (substratą) ir jo nėra ties kreipiančiąją RNR (RNP fermento dalimi). Fluorescencijos signalo taip pat nebuvo matyti kontrolinėse reakcijose be kofaktoriaus ar kreipiančiosios RNR. Taigi, fluorescuojanti žymė buvo prikabinta tik prie tRNR molekulių, kurios buvo modifikuotos nuo C/D RNP priklausomu keliu. Pastebėtina, kad žymėjimo našumas trijuose naujai užprogramuotuose taikiniuose (U17a, A31 ir Ae3) buvo didesnis nei ties laukinio tipo taikiniu (C34) ir ryškiausia fluorescencija, stebėta ties Ae3 taikiniu, viršijo C34 taikinio signalą 7 kartus. Taikinių santykinis

fluorescencijos ryškumo lygis maždaug atitiko HPLC-MS metodu stebėtus propinilinimo skirtumus. Tai rodo, kad „click“ chemijos reakcija ties visais taikiniaiis vyko maždaug vienodai efektyviai.

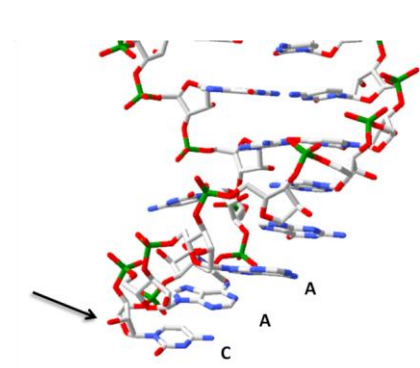


Pav. 3.13. Sekai-specifinis fluorescencinis tRNR žymėjimas pasitelkiant C/D RNP vykdomą fermentinį propinilinimą ir „click“ chemijos reakciją. Substratinė tRNR (1 μ M) inkubuota su C/D RNP variantais (1 μ M), surinktais su skirtingomis kreipiančiosiomis RNR (taikiniai nurodyti), ir SeAdoYn (400 μ M), 68°C 30 min. Reakcija sustabdyta pridedant lygų tūrį RNR dažo (jo sudėtyje yra 95% formamido). Fluoroforo prijungimui „click“ chemijos būdu mišinys papildytas DMSO, CuBr, TBTA ir Eterneono-480/635 azidu bei inkubuotas 37°C 1 val. RNR išgryninta naudojant kolonėles. Po elektroforezės PAA gelyje išmatuota Eterneono fluorescencija (kairiau) ir galiausiai gelis nudažytas etidžio bromidu visai RNR išryškinti (dešiniau). M - DNR dydžio standartas *Ultra Low Range*; R1 - kreipiančioji sR47 RNR; R2 - nemodifikuota tRNR; K1 - kontrolinė reakcija be kofaktoriaus; K2 - kontrolinė reakcija be kreipiančiosios RNR. Rodyklėmis parodytos juostelės, atitinkančios tRNR ir kreipiančiąsias RNR (sRNR).

Prieš „click“ reakcijas mišiniai buvo papildyti iki 50% formamidu ir tai akivaizdžiai, kaip minėta, pagerino „click“ reakcijos našumą - tikriausiai taip išardant RNP-substrato kompleksą. Tačiau tRNR molekulių, o ypač iš hipertermofilinių organizmų, struktūra yra labai stabili ir mūsų „click“ reakcijos sąlygose gali būti nepakankamai išardyta. Tad žymėjimo našumo skirtumus galėjo įtakoti ir RNR susisukimas, dėl kurio taikinių 2'OH-propinilgrupės galėjo būti paslėptos struktūroje. Artimiausia mūsų substratui žinoma eksperimentiškai nustatyta kristalinė struktūra yra *Pyrococcus horicoshii* tRNR-Leu(CAA) molekulės, komplekse su leucil-tRNR sintaze (PDB kodas 1wz2, Fukunaga ir kt., 2005). tRNR pirmojo antikodono nukleotido 2'OH grupė yra visiškai atsukta į tirpalą (pav. 3.14). Taip pat gerai į tirpalą eksponuotos 2'OH grupės buvo ir šios struktūros vietose, atitinkančiose mūsų parinktus naujus taikinius. Žinoma, mūsų tRNR transkripto struktūra

galėjo skirtis nuo tRNR, esančios komplekse su baltymu, todėl visiškai atmesti tikimybės, kad mūsų parinkti taikiniai yra skirtingai prieinami „click“ chemijos reagentams, negalime.

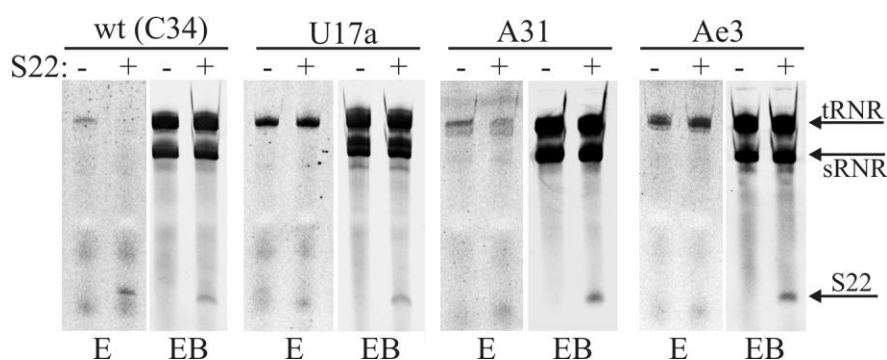
C/D RNP vykdomo RNR modifikavimo naudojant SeAdoYn kofaktorių priklausomybė nuo reakcijos sąlygų (pH, joninės jėgos, inkubacijos laiko) vėl buvo tikrinta stebint fluoroforo įjungimą į modifikuotą tRNR. Rezultatai patvirtino, kad tinkamiausios sąlygos yra tos, kurios buvo nustatytos TLC metodu.



Pav. 3.14. Taikinio nukleotido 2'OH grupė yra prieinama tirpalui. *Pyrococcus horicoshii* tRNR-Leu(CAA) molekulės, esančios komplekse su leucil-tRNR sintaze, struktūra (PDB kodas 1wz2). Parodytas antikodono nukleotidų išsidėstymas erdvėje. Rodykle pažymėta C34 nukleotido, atitinkančio mūsų laukinio tipo C/D RNP taikinį, 2'OH grupė.

Parodę, kad perprogramavę kreipiančiąsias RNR, nuo C/D RNP priklausomu mTAG būdu galime modifikuoti pasirinktus nukleotidus tRNR sekoje ir prijungti fluoroforą, siekėme patikrinti tokio žymėjimo specifiskumą. Pirmiausiai atlikome konkurencijos eksperimentą: į tRNR modifikavimo reakcijas su skirtingais kreipiančiųjų RNR variantais pridėjome dešimties kartų, lyginant su tRNR, molinį perteklių 22 nt ilgio RNR oligonukleotido (S22), turinčio laukinio tipo sR47 atpažinimo seką. T.y. šis oligonukleotidas atitinka tRNR dalį, atpažįstamą C34 taikino modifikavimo metu. Esant tokiam konkurenciniam substratui ir C/D RNP su laukinio tipo kreipiančiaja RNR, tRNR nebeįgavo fluorescencinės žymės, žymė buvo prijungiama prie RNR oligonukleotido (pav. 3.15). O štai tRNR žymėjimo, vykstančio esant sR47-U17a ir sR47-Ae3 kreipiančiųjų RNR variantams, šis RNR oligonukleotidas nepaveikė. sR47-A31 kreipiančiosios RNR atveju, tRNR žymėjimo našumas sumažėjo, bet oligonukleotido žymėjimas neišryškėjo. Tai gali būti paaiškinta

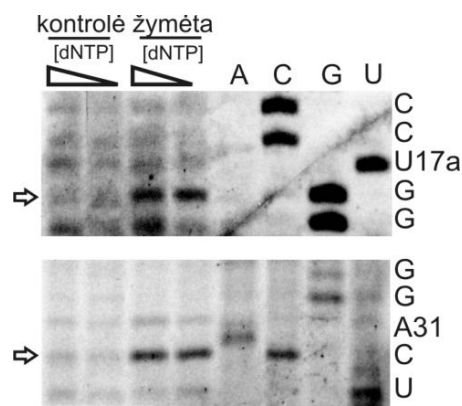
tu, kad sR47-A31 ir laukinio tipo kreipiančiosios RNR atpažįstama seka dalinai persidengia (9 bp). Tikriausiai S22 oligonukleotidas konkuravo su tRNR atpažinimo metu, tačiau komplementarumo ir sąveikos stiprumo nepakako modifikavimo reakcijai. Iš viso to galima daryti išvadą, kad propinilinio nukreipimas yra stipriai specifinis, reikalingas visiškas (daugiau nei 9 nt) komplementarumas tarp sRNR kreipiančiosios ir jos atpažįstamos taikinio sekos RNR substrate.



Pav. 3.15. sRNR nukreipiamo tRNR žymėjimo specifiškumas esant konkuruojančiam substratiniam RNR oligonukleotidui. Žymėjimas (taikiniai nurodyti paveikslėlio viršuje) buvo atliktas taip, kaip ir pav. 3.13, tik šiuo atveju į propinilinio reakcijas buvo pridėta 22 nt ilgio RNR oligonukleotido (S22), turinčio laukinio tipo sR47 atpažinimo seką. Jo molinis kiekis dešimt kartų viršijo tRNR kiekį. Po elektroforezės PAA gelyje išmatuota Eterneono fluorescencija (E, vaizdas kairiau kiekvienam taikiniui) ir gelis nudažytas etidžio bromidu visai RNR išryškinti (EB, vaizdas dešiniau kiekvienam taikiniui). Matyti, kad laukinio tipo sRNR atveju, esant konkurenciniam oligonukleotidui, fluorescencinis žymėjimas nuo tRNR persikelia ant oligonukleotido. Esant kitoms kreipiančiosioms RNR, oligonukleotidas nėra žymimas ir išlieka pilnas ar dalinis (A31 atveju) tRNR žymėjimas.

Tikslios tRNR vietos, kur nuo C/D RNP priklausomai buvo įjungta žymė, taip pat buvo patvirtintos atvirkštinės transkripcijos užlaikymo (*RT-stop*) metodu. Žinoma, kad 2'-O-m modifikacija gali lemti atvirkštinės transkripcijos užlaikymą (Motorin ir kt., 2007). Mūsų atveju prie 2'-O atomo prijungta daug didesnė grupė – fluoroforas, tad efektas turėtų būti dar stipresnis. Tirtos gausiausiai fluorescencija pažymėtos tRNR, t.y. kai žymė įvesta U17a, A31 arba Ae3 vietose. Lygiagrečiai buvo nuskaitoma nemodifikuotos tRNR-Leu seka Sengerio metodu. U17a ir A31 vietose pažymėtų tRNR atvejais aiškiai matyti pratęsiant pradmenis susidarę nepilno ilgio produktai, kurių ilgis

atitinka atvirkštinės transkriptazės užlaikymą ties nukleotidu, esančiu prieš pat taikinio nukleotidą (pav. 3.16). Kontrolinėse reakcijose tokių produktų nėra. Tai puikiai patvirtina, kad žymė buvo prijungta prie pasirinktų taikinio nukleotidų. Ae3 atveju žymės prijungimo vieta šiuo metodu negalėjo būti patvirtinta dėl to, kad sekoskaitos rezultatai aplink Ae3 taikinį neatitiko tRNR sekos netgi panaudojus keletą skirtingų pradmenų. Tokia eksperimento baigtis nėra netikėta, nes atvirkštinės transkripcijos užlaikymo metodo galimybes dažnai apriboja stipriai struktūrizuotos RNR vietos (Motorin ir kt., 2007).



Pav. 3.16. Žymėjimo specifiškumo tyrimas atvirkštinės transkripcijos užlaikymo metodu. Substratinė tRNR buvo modifikuota esant SeAdoYn kofaktoriui ir C/D RNP su skirtingomis sRNR; po to „click“ chemijos būdu prijungtas fluoroforas Eterneonas – taip kaip pav. 3.13. Pradmens pratęsimo atvirkštine transkripcija tyrimas rodo, kad, esant atitinkamos kreipiančiosios RNR pagalba pažymėtai tRNR, polimerazė stabdoma (parodyta rodyklėmis) ties nukleotidu, esančiu prieš pat taikinio nukleotidą (U17a arba A31).

3.1.7 Programuojamas modelinės pre-iRNR žymėjimas fluoroforu

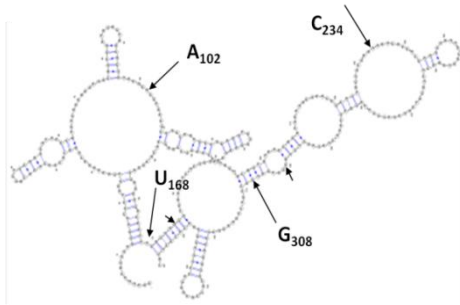
Toliau siekėme išbandyti šį metodą pažymint ilgesnę RNR molekulę ir visiškai nesusijusią su jokiais žinomais archėjų C/D RNP MTazės taikiniais. Šiam tikslui pasirinkome triušio β -globino pre-iRNR fragmentą (357 nt ilgio), apimančią pirmuosius egzoną ir introną ir dalį antrojo egzono. Taikiniais buvo pasirinktos keturios vietos: dvi pirmajame egzone (A102 ir U168), viena introne (C234), ir viena antrajame egzone šalia introno-egzono ribos (G308) (pav. 3.17A). *In silico* sudarytas šios modelinės pre-iRNR struktūros modelis rodo, kad pasirinkti taikiniai išsidėstę įvairiuose struktūros dariniuose: kilpose (A102 ir C234), stiebelyje (G308) ar trumpame tarpe tarp dviejų stiebelių (U168) (pav. 3.17B). Atitinkamos kreipiančiosios RNR buvo sukonstruotos pakeičiant sR47 D kreipiančiąją seką. Visų C/D RNP, surinktų su šiomis

A

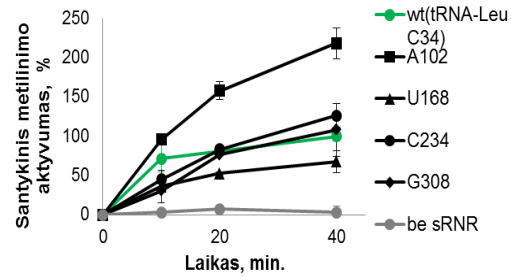
```

1  GAAUACAAGC UUGGGCUGCA CUGCUGCUUA CACUUGCUIIU UGACACAACU GUGUUUACUU
61 GCAAUCCCCC AAAACAGACA GAAUGGUGCA UCUGUCCAGU GAGGAGAAGU CUGCGGUCAC
121 UGCCUGUGG GGCAAGGUGA AUGUGGAAGA AGUUGGUGGU GAGGCCCUUG GCAGGUUGGU
181 auccuuuuua cagcacaacu uaauagagaca gauagaaacu ggucuuguag aaaCagagua
241 gucgccugcu uuucugccag gucugacuu cucucuccug ggucuguuuuc auuuucucag
301 GCUGGUUGUC UACCCAUGGA CCCAGAGGUU CUUCGAGUCC UUUGGGGACC UGUCCUC
  
```

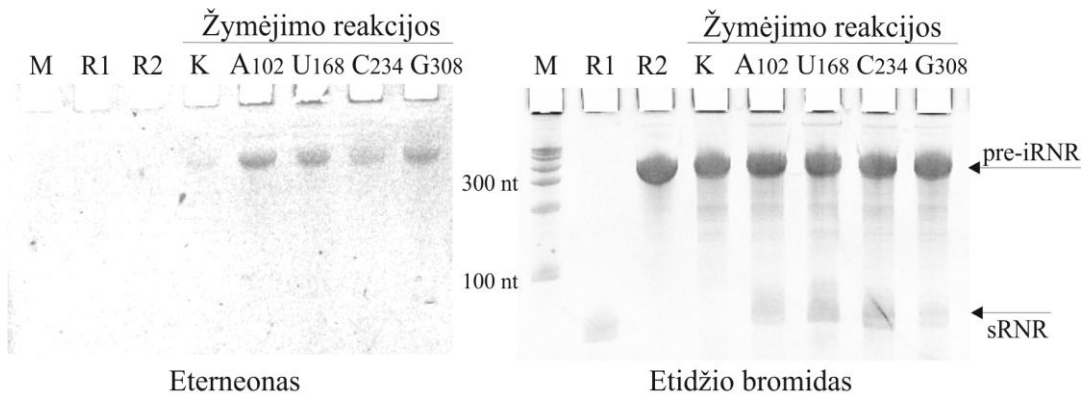
B



C



D

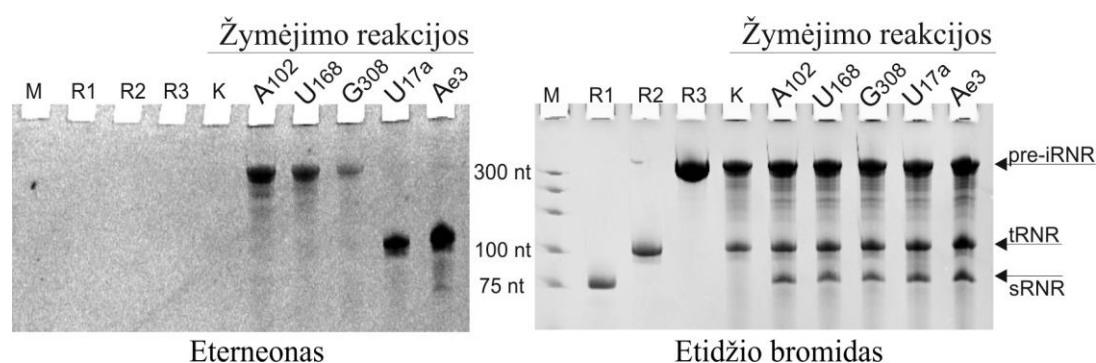


Pav. 3.17. Programuojamas sekai specifinis modelinės pre-iRNR žymėjimas.

(A) Triušio β -globino pre-iRNR 357 nt ilgio fragmento, apimančio pirmą egzoną ir introną ir dalį antrojo egzono, seka. Egzonų seka užrašyta didžiosiomis raidėmis, introno – mažiosiomis. Pasirinkti keturi taikiniai. Kreipiančiųjų RNR atpažįstamos sekos pažymėtos pilka spalva (pirmas nt nėra svarbus), taikinio nukleotidas – juoda. (B) Modelinės pre-iRNR struktūra, *in silico* sumodeliuota *Gensilico RNA* metaserveryje. Ilgomis rodyklėmis parodyti pasirinkti taikiniai, mažomis – introno ribos. (C) C/D RNP vykdomo pre-iRNR metilinimo priklausomybė nuo pasirinkto taikinio. 1 μ M C/D RNP inkubuoti su 1 μ M modeliniu pre-iRNR substratu ir 100 μ M tritį turinčiu AdoMet 68°C temperatūroje. (D) Dviejų žingsnių fluorescencinis modelinės pre-iRNR žymėjimas pasirinktuose taikiniuose pasitelkiant atitinkamai užprogramuotus C/D RNP, kofaktorių SeAdoYn ir „click“ chemiją fluoroforui Eterneonui prijungti. Eksperimentas atliktas kaip pav. 3.13. Eterneono fluorescencijos vaizdas kairiau. To paties gelio, nudažyto etidžio bromidu visai RNR išryškinti, vaizdas dešiniau. M - RNR dydžio standartas; R1 - kreipiančioji sR47 RNR; R2 - nemodifikuota pre-iRNR; K - kontrolinė reakcija be kreipiančiosios RNR. Rodyklėmis parodytos juostelės, atitinkančios pre-iRNR ir kreipiančiąsias RNR (sRNR).

sRNR, metilinimo aktyvumas esant pre-iRNR substratui buvo panašus į aktyvumą esant laukinio tipo kreipiančiosios RNR ir jos atpažįstamo substrato porai - sR47 ir tRNR-Leu (Pav. 3.17C). Dviejų žingsnių fluorescencinis žymėjimas taip pat buvo sėkmingas visuose keturiuose taikiniuose (Pav. 3.17D), tačiau fluorescencijos intensyvumas nebuvo vienodas ir nekoreliavo su metilinimo našumu - taip pat kaip ir matėme tRNR-Leu substrato atveju.

Galiausiai, metodo specifiškumui parodyti, tos pačios modifikacijos ir žymėjimo reakcijos buvo atliktos mišinyje esant abiem - tRNR ir pre-iRNR - substratams ir mėginiams besiskiriant tik kreipiančiosiomis RNR. Pastarosios buvo parinktos iš RNP katalizę nukreipiančiųjų tiek į pre-iRNR, tiek į tRNR specifines vietas (pav. 3.18). Gauti rezultatai patikimai parodė, kad C/D RNP vykdomas žymėjimas yra nukreipiamas į užprogramuotą RNR substratą nepriklausomai nuo mišinyje esančių kitų RNR molekulių.

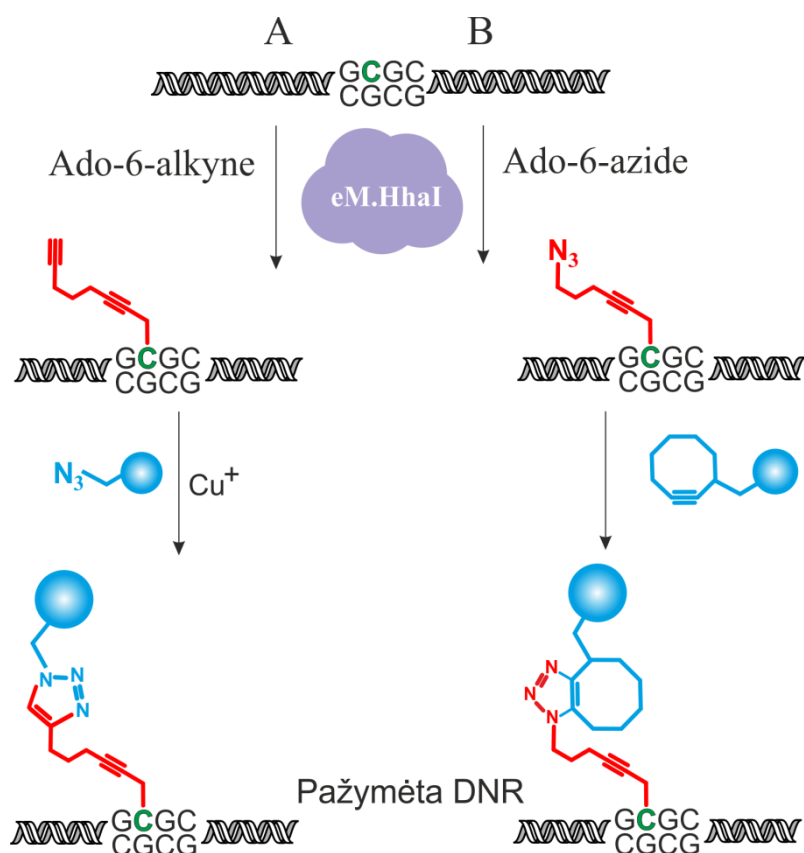


Pav. 3.18. C/D RNP vykdomo RNR žymėjimo specifiškumas substratui. Eksperimentas buvo atliktas kaip pav. 3.13 ir 3.18D, išskyrus tai, kad reakcijos mišinyje buvo abu modeliniai substratai – pre-iRNR ir tRNR. Kiekviename mėginyje buvo skirtinga kreipiančioji RNR, reakciją nukreipianti į A102, U168 arba G308 pre-iRNR molekulėje, arba į U17a arba Ae3 tRNR molekulėje – kaip nurodyta paveikslėlio viršuje. Eterneono fluorescencijos vaizdas kairiau, to paties gelio, nudažyto etidžio bromidu visai RNR išryškinti, vaizdas dešiniau. M - DNR dydžio standartas *Ultra Low Range*; R1 kreipiančioji sR47 RNR; R2 - tRNR; R3 - pre-iRNR; K, kontrolinė reakcija be kreipiančiosios RNR. Rodyklėmis parodytos juostelės, atitinkančios pre-iRNR, tRNR ir kreipiančiąsias RNR (sRNR).

3.2 Bioortogonalus sekai specifinis DNR žymėjimas

Aktyvuotų grupių pernaša nuo sintetinių AdoMet analogų panaudojant MTazes (mTAG metodas) intensyviai tiriama ir taikoma DNR žymėjimui.

Baltymų inžinerijos būdu DNR citozino 5-os padėties MTazės HhaI aktyvus centras buvo praplėstas taip, kad šis fermentas tapo alkiltransferaze, efektyviai pernešančia prailgintas grupes nuo sintetinių kofaktoriaus AdoMet analogų. mTAG reakcijose ji yra aktyvesnė nei su AdoMet ir efektyviai naudoja kofaktoriaus analogus aplinkoje esant gamtinio kofaktoriaus. Taip pakeista M.HhaI išlaikė savo taikinio specifiškumą – modifikuojamas pirmasis citozinas GCGC sekoje (pabrauktas) (Lukinavičius ir kt., 2012). Ši pakeisto transferazinio aktyvumo M.HhaI pavadinta eM.HhaI (nuo angl. *engineered*). Lygiagrečiai MTazių inžinerijai buvo susintetinta eilė kofaktoriaus analogų, turinčių prailgintas pernešamas grandines su įvairiomis funkcinėmis grupėmis ir parodytas jų aktyvumas su eM.HhaI. Nuspręsta į eM.HhaI naudojamų sintetinių kofaktorių arsenalą įtraukti ir tokius, kurie turi azidų-alkinų cikloprijungimo („click“ chemijos) reakcijai tinkamas funkcines grupes. Ado-6-alkyne turi galinį trigubą ryšį, o Ado-6-azide – azidogrupę. Abiem atvejais

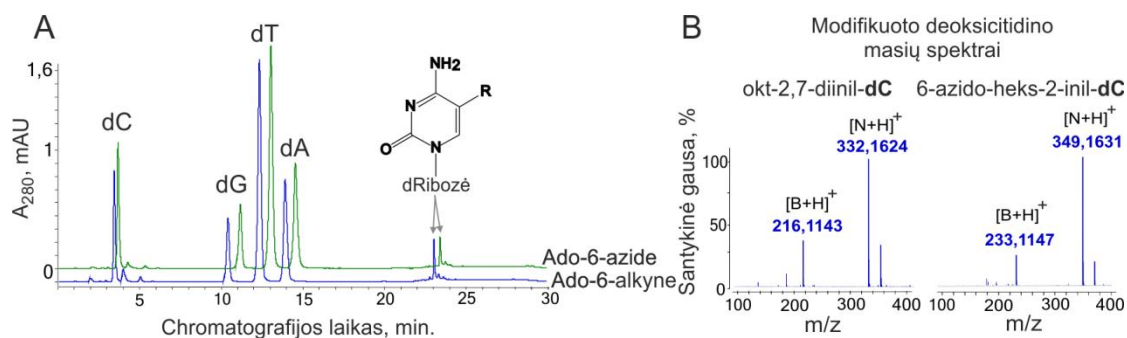


Pav. 3.19. DNR mTAG žymėjimas, panaudojant MTazę eM.HhaI ir sintetinius kofaktorius Ado-6-alkyne (A) bei Ado-6-azide (B), ir azidų-alkinų cikloprijungimą.

pernešamos grupės pagrindą sudaro šešių anglies atomų grandinė su kofaktorių aktyvuojančia triguba jungtimi β padėtyje (pav. 3.19). Žinoma, kad tokios konstrukcijos kofaktoriai yra puikiai tinkami mTAG reakcijoms: stabilūs reakcijos tirpale 37°C temperatūroje ir aktyvūs eM.HhaI katalizuojamoje reakcijoje (Lukinavičius ir kt., 2013). Remiantis eM.HhaI katalizuojamos reakcijos su sintetiniais kofaktoriais ypatumais (sėkmingai veikia mišinyje esant AdoMet ir laukinio tipo MTazės dažniausiai neperneša tokių ilgų grandinių), ir azidų-alkinų susijungimo bioortogonalumu, buvo galima manyti, kad ši molekulinė įrankių sistema yra tinkama žymėti DNR sudėtinguose biologiniuose molekulių mišiniuose, įskaitant ląstelių lizatą.

3.2.1 eM.HhaI aktyvumas su sintetiniais kofaktoriais

Fermentinis eM.HhaI aktyvumas su Ado-6-alkyne ir Ado-6-azide pirmiausiai buvo nustatytas naudojant modelinį substratą 24 bp ilgio dvigrandinį DNR oligonukleotidą, turintį vieną HhaI atpažinimo seką. Po modifikavimo reakcijos DNR buvo fermentiškai suskaldyta iki nukleozidų ir jie ištirti HPLC-MS metodu. Nustatyti nauji junginiai su panašiais UV sugerties spektrais, bet ilgesniu chromatografinio užlaikymo laiku nei būdinga

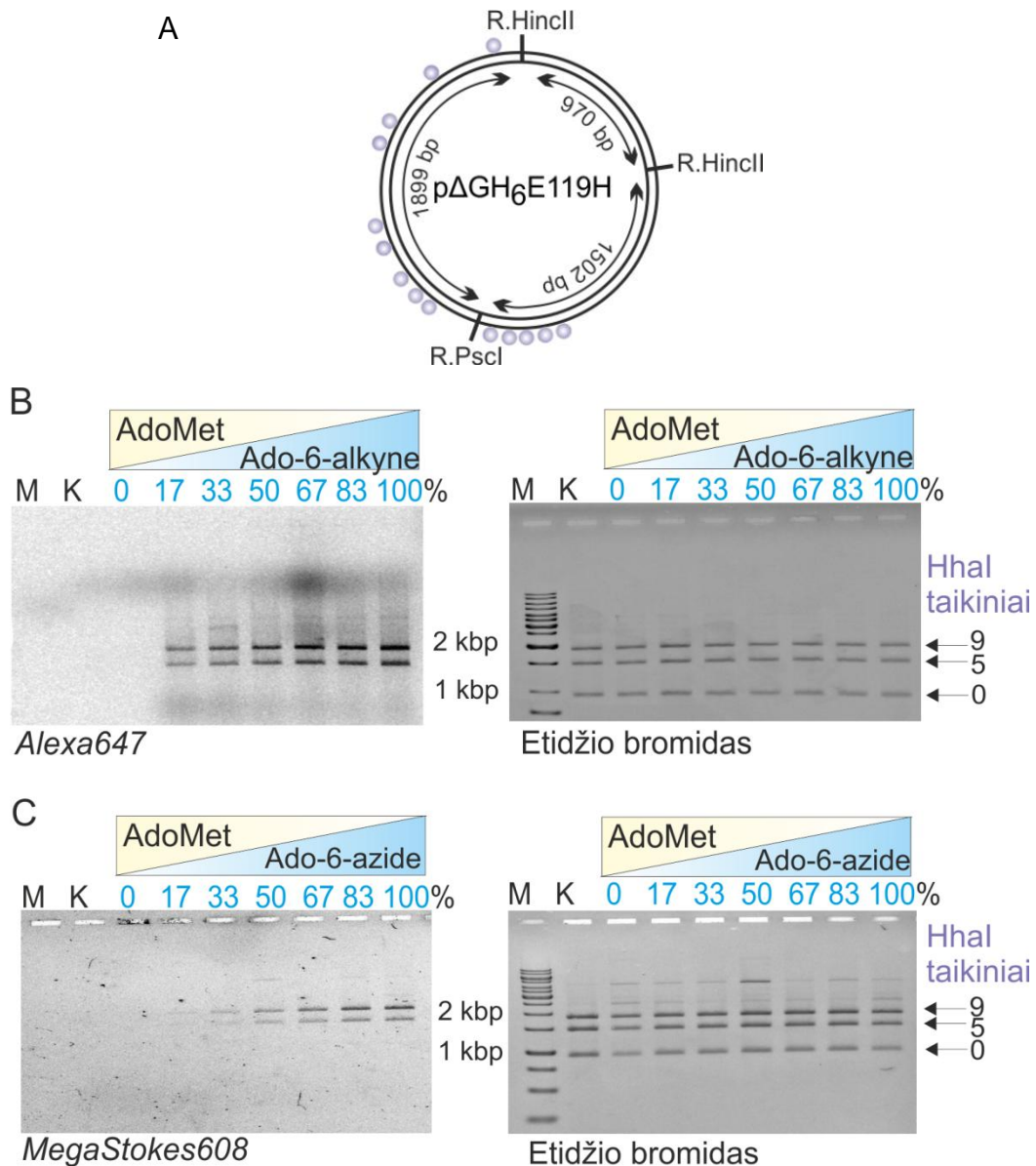


Pav. 3.20. HPLC-MS tyrimas produktų, gautų po eM.HhaI vykdomo DNR modifikavimo esant kofaktoriams Ado-6-alkyne arba Ado-6-azide. 0,5 μ M eM.HhaI, 33 μ M substratinis 24 bp ilgio oligonukleotidas, turintis vieną HhaI atpažinimo seką, ir 300 μ M kofaktorių Ado-6-alkyne arba Ado-6-azide inkubuoti 37°C temperatūroje 4 val. Po reakcijos MTazė išaktyvinta palaikant 80°C 20 min, o DNR išsodinta etanoliumi. Po to DNR fermentiškai suskaidyta iki nukleozidų. Gautas nukleozidų mišinys ištirtas HPLC-MS metodu. (A) A_{280} chromatogramoje matyti smailės, atitinkančios naujus deoksicitidino darinius. (B) Šių smailių masių spektruose rastos m/z vertės atitinka teorines mases protonuoto deoksicitidino (N+H) ir protonuotos citozino bazės (B+H) su prijungtomis pernešamomis grupėmis, atitinkančiomis naudotą sintetinį kofaktorių.

nemodifikuotam deoksicitidinui (pav. 3.20). Kontroliniuose mėginiuose be MTazės arba be kofaktoriaus nerasta jokių modifikuotų nukleozidų. Šių naujų junginių masių spektruose rastos m/z vertės patikimai atitiko teorines atitinkamai modifikuoto deoksicitidino molekulinės mases. Be to, masių spektrometrijos metu citozino bazė atskyla nuo ribozės, tad buvo aptiktos ir m/z vertės, atitinkančias teorines modifikuoto citozino molekulinės mases. Nebuvo aptikta jokių kitų modifikuotų nukleozidų. Visa tai patvirtina, kad nuo tirtų sintetinių kofaktorių ant DNR, nuo eM.HhaI priklausomu būdu, ant citozino bazės buvo pernešta visa prailginta grupė.

Siekiant metodo panaudojimo DNR žymėjimui sudėtinguose mišiniuose, tokiuose kaip *in vivo* ar *ex vivo* eksperimentai, pageidautina, kad mTAG reakcijos vyktų netgi mišinyje esant gamtinio kofaktoriaus AdoMet. Kofaktorių konkurencijos eksperimentui pasirinkome daugiakopijinę rekombinantinę plazmidę pΔGH₆E119H, kuri turi 14 HhaI taikinių, netolygiai pasiskirsčiusių sekoje (pav. 3.21A). Modifikacijos reakcijos vykdytos esant AdoMet ir sintetinio kofaktoriaus Ado-6-alkyne arba Ado-6-azide mišiniams, kuriuose bendra kofaktorių koncentracija buvo pastovi, tačiau skyrėsi jų santykis. Prie modifikuotos DNR, papildžius mišinį reikiama reagentais, „click“ chemijos būdu buvo prijungtas tinkamą funkcinę grupę turintis fluoroforas: Alexa647 azidas Ado-6-alkyne atveju ir MegaStokes608 ciklooktinas Ado-6-azide atveju. Alexa647 azido prijungimui prie galinės trigubos jungties buvo reikalinga Cu⁺ katalizė. O prie perneštos azidogrūpės jungiamas (MegaStokes608) fluoroforas buvo pasirinktas toks, kuris turi trigubą jungtį ciklooktino žiede ir dėl žiedo įtampos alkino-azido susijungimui nebereikia jokių pagalbinių medžiagų (Nagy ir kt., 2010). Išsodinant etanolium arba kolonėlių pagalba išvalyta DNR sukarpyta R.HincII ir R.PscI endonukleazėmis, susidarant trims DNR fragmentams: 1899 bp su 9-iais HhaI taikiniiais, 1502 bp su 5-iais ir 970 bp, kuriame nėra HhaI taikinių. Gauti DNR fragmentai atskirti elektroforeze agarozės gelyje ir išmatuota prijungtos žymės fluorescencija. Išryškėjo, kad eM.HhaI vykdoma prailgintų grupių pernaša nuo Ado-6-alkyne ir Ado-6-azide puikiai vyksta šiems kofaktoriams konkuruojant

su AdoMet: prijungto dažo fluorescencija matoma netgi tuose mėginiuose, kur sintetinio kofaktoriaus buvo tik 17%. O didėjant sintetinio kofaktoriaus daliai, įjungto fluoroforo kiekis didėja (pav. 3.21B,C).



Pav. 3.21. Sekai specifinis fluorescencinis DNR žymėjimas panaudojant eM.HhaI ir sintetinius kofaktorius Ado-6-alkyne arba Ado-6-azide, mišinyje esant gamtinio kofaktoriaus AdoMet, *in vitro*. Plazmidė pΔGH6E119H (0,25 μM HhaI taikinių) modifikuota inkubuojant su eM.HhaI (0,125 μM) ir AdoMet bei Ado-6-alkyne arba Ado-6-azide kofaktorių mišiniais, kuriuose bendra kofaktorių koncentracija buvo pastovi (50 μM), tačiau skyrėsi jų santykis. Sintetinio kofaktoriaus dalis mišinyje procentais nurodyta paveikslėlyje. Kontroliniuose mėginiuose (K) nebuvo jokio kofaktoriaus. Prie modifikuotos DNR „click“ chemijos būdu buvo prijungtas fluoroforas su tinkama funkcine grupe: Alexa647 azidas Ado-6-alkyne atveju ir MegaStokes608 cikloktinas Ado-6-azide atveju. Išvalyta DNR sukarpyta R.HincII ir R.PscI endonukleazėmis. Galiausiai, DNR

fragmentai atskirti elektroforeze agarozės gelyje ir išmatuota prijungtos žymės fluorescencija bei nudažyta etidžio bromidu visai DNR išryškinti. M – DNR dydžio standartas *1 kb DNA Ladder*. (A) Schema, parodanti HhaI taikinių (pažymėti rutuliukais) išsidėstymą pΔGH₆E119H plazmidėje ir naudotų restrikcijos endonukleazių kirpimo vietas. (B) DNR mTAG žymėjimas naudojant kofaktorių Ado-6-alkyne ir Alexa647 azidą. Modifikuota DNR po elektroforezės nudažyta etidžio bromidu ir išmatuota Alexa647 (635 nm lazeriu) bei etidžio bromido (473 nm lazeriu) fluorescencija. (C) DNR mTAG žymėjimas naudojant kofaktorių Ado-6-azide ir MegaStokes608 ciklooktiną. Po elektroforezės pirmiausia buvo išmatuota MegaStokes fluorescencija, po to gelis nudažytas etidžio bromidu.

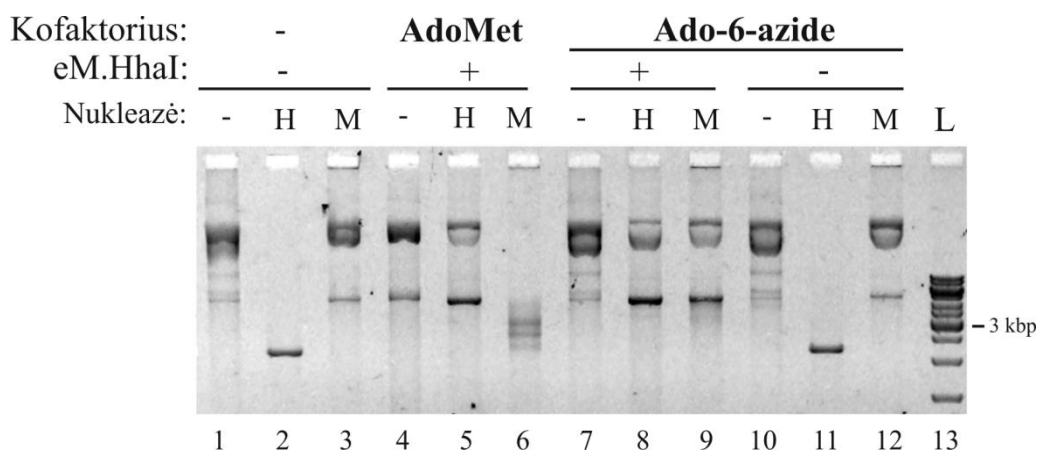
Fragmentų su pažymėtais HhaI taikiniai ryškumo santykis teoriškai turėtų būti 9:5, t.y. 64:36% nuo bendros sumos. Išmatuotasis santykis atitiko šiuos skaičius ir nepriklausomai nuo sintetinio kofaktoriaus koncentracijos buvo intervale 68:32% - 60:40%. Vadinasi, žymės įvedimas tarp taikinių pasiskirsto tolygiai, nėra įtakojamas DNR sekos konteksto. Fragmentas, neturintis HhaI taikinių, visiškai neįgavo pastebimos fluorescencijos – tai rodo aukštą mūsų sistemos specifiškumą.

3.2.2 Sekai specifinis DNR žymėjimas fluoroforu ląstelių lizate

Toliau tyrėme, ar mūsų dviejų stadijų DNR žymėjimo reakcija, paremta bioortogonalio chemija, yra galima bakterijų ląstelių lizate. Preliminarūs eksperimentai parodė, kad šiam tikslui labiausiai tiks Ado-6-azide, nes jo atveju galima naudoti „click“ chemiją, kuriai nereikalinga vienvalenčio vario katalizė.

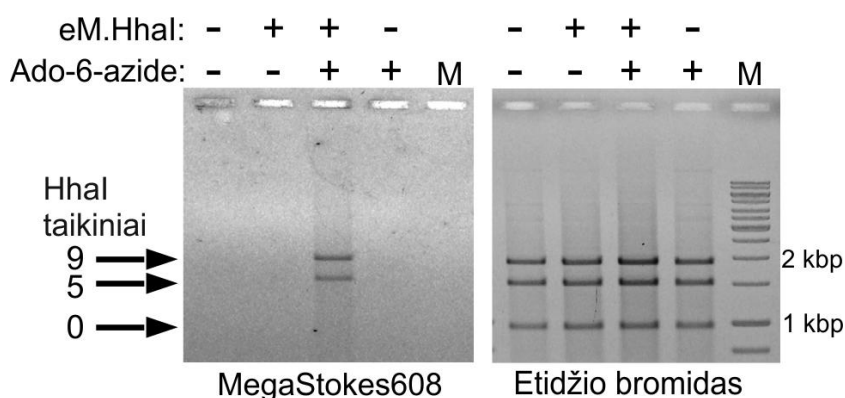
E.coli ER2267 ląstelės, turinčios pΔGH₆E119H plazmidę, buvo suardytos lizocimu ir į lizatą pridėta eM.HhaI (iki 2 μM) bei Ado-6-azide arba AdoMet (kontrolinėje reakcijoje) (iki 50 μM). Siekdami tiesiogiai – be fluoroforo prijungimo žingsnio - patikrinti, kaip efektyviai DNR modifikacija vyksta ląstelių lizate, po inkubacijos plazmidės išgryninome kolonėlių pagalba ir karpėme metilinizacijai jautriomis endonukleazėmis R.Hin6I ir R.McrBC. R.Hin6I kerpa tik nemodifikuotas plačiąja prasme (t.y. nemetilintas ir kitaip nemodifikuotas) GCGC sekas. R.McrBC kerpa šalia GCGC tik jeigu ši seka yra metilinta, ir nekerpa, jei seka nemodifikuota arba modifikuota

prailgintomis grupėmis (Lukinavičius ir kt., 2012). Pasirodė, kad didžioji dauguma HhaI atpažinimo sekų turi modifikaciją, dėl kurios nei R.Hin6I, nei R.McrBC nekerpa DNR (pav. 3.22). Vadinasi, eM.HhaI lizate puikiai perneša prailgintas grupes. Ląstelėse AdoMet koncentracija yra apie 300 μM (Cheng ir Blumenthal, 1999). Kadangi surinkta biomasė buvo suspenduojama ne mažiau nei dešimt kartų didesniame nei jos tūryje, lizate ląstelių citoplazmos turinys buvo praskiestas ir, atitinkamai AdoMet koncentracija galėjo būti vienetų-dešimčių μM eilės. Tad sintetinio kofaktoriaus modifikavimo reakcijoje buvo apie kelis-dešimt kartų daugiau nei AdoMet ir nenuostabu, kad eM.HhaI beveik tik jį ir tenaudojo. Taigi, taip gauname plazmides, kuriose modifikuoti visi GCGC taikiniai (visiškai nekerpa R.Hin6I, pav. 3.22, takelis 8) ir didžiojoje daugumoje atvejų yra pernešta ne metil-, o prailgintoji grupė (pav. 3.22 palyginkite takelius 3, o taip pat 12, – visiškai nemetilinta ir nesukirpta, takelį 6 – visiškai metilinta ir sukirpta bei takelį 9 – matosi tik nežymūs karpymo pėdsakai, o didžioji dalis plazmidės apsaugota nuo karpymo). Analogiški rezultatai gauti ir su Ado-6-alkyne.



Pav. 3.22. Plazmidinės DNR mTAG modifikavimas bakterijų ląstelių lizate. *E.coli* ER2267 ląstelės, turinčios plazmidę p $\Delta\text{GH}_6\text{E119H}$, suardytos lizocimu ir į lizatą pridėta eM.HhaI (iki 2 μM) bei Ado-6-azide arba AdoMet (iki 50 μM). Po inkubacijos plazmidės išgrynintos kolonėlių pagalba ir karpytos endonukleazėmis R.Hin6I (takeliai H) ir R.McrBC (takeliai M). R.Hin6I kerpa DNR ties nemodifikuotais HhaI taikiniais (takeliai 2 ir 11), bet nekerpa ties modifikuotais (takeliai 5 ir 8); R.McrBC kerpa DNR šalia metilintų HhaI taikinių (takelis 6); nei viena iš šių nukleazių nekerpa GCGC taikinių, modifikuotų prailgintomis alkilo grupėmis. DNR, modifikuota naudojant eM.HhaI ir Ado-6-azide, buvo atspari abiejų nukleazių veikimui (takeliai 8 ir 9). L – DNR dydžio standartas *DNA Ladder mix*.

Galiausiai, buvo ištirta galimybė abu DNR žymėjimo žingsnius - sekai specifinį DNR mTAG alkilinimą ir nekatalizuojamą „click“ reakciją – paeiliui atlikti bakterijų ląstelių lizate. Tam *E.coli* ląsteles, turinčias pΔGH₆E119H plazmidę, suardėme lizocimu ir paveikėme eM.HhaI ir kofaktoriumi Ado-6-azide kaip ankstesniame eksperimente. Antrajam žymėjimo žingsniui įvykdyti inkubavimas tiesiog buvo pratęstas pridėjus MegaStokes608 ciklooktino. Po to plazmidinė DNR buvo išgryninta, sukarpyta endonukleazėmis R.HincII bei R.PscI ir gauti trys fragmentai atskirti elektroforeze agarozės gelyje kaip ir sintetinių kofaktorių konkurencijos su AdoMet eksperimente (3.2.1). Stebėtas MegaStokes608 fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymas visiškai atitiko GCGC taikinių skaičių sukarpytos plazmidės fragmentuose ir nebuvo matomas kontroliniuose mėginiuose bei fragmente, neturinčiame HhaI taikinių (pav. 3.23). Kitaip tariant, fluoroforo įjungimas į DNR buvo priklausomas nuo eM.HhaI, kofaktoriaus Ado-6-azide ir HhaI taikinių skaičiaus fragmente, bei specifiskas tik šiems taikiniams. Šis eksperimentas parodė, kad naudodami mūsų MTazės ir sintetinio kofaktoriaus sistemą galime atlikti sekai specifinį ląstelinės DNR žymėjimą ląstelių lizate.



Pav. 3.23. Sekai specifinis dviejų žingsnių DNR žymėjimas ląstelių lizate. *E.coli* ER2267 ląstelės, turinčios plazmidę pΔGH₆E119H, suardytos lizocimu, į lizatą pridėta eM.HhaI (iki 2 μM) bei Ado-6-azide (iki 50 μM) ir inkubuota 3 val. 37 °C. Pridėjus MegaStokes608 ciklooktino (iki 200 μM) inkubacija pratęsta dar 3 val. Po to plazmidinė DNR išgryninta ir sukarpyta endonukleazėmis R.HincII ir R.PscI. Gauti DNR fragmentai atskirti elektroforeze agarozės gelyje ir išmatuota MegaStokes608 fluorescencija (kairiau); po to visa DNR nudažyta etidžio bromidu (dešiniau). M - DNR dydžio standartas *1 kb DNA Ladder*.

3.3 Rezultatų aptarimas

Nukleorūgščių tyrimams reikalingi molekuliniai įrankiai, leidžiantys specifiškai, tik prie tam tikrų sekų, tam tikrose polinukleotidinės grandinės vietose, prijungti norimus reporterinius ar giminingumo žymenis. Šioje disertacijoje aprašytais darbais atvertos naujos mTAG taikymo galimybės specifiniam RNR ir DNR žymėjimui. RNR atveju buvo pasiekta specifinio taikinio pasirinkimo laisvė iki beveik bet kurio norimo sekos nukleotido. DNR žymėjimui parodyta galimybė visą žymėjimo procedūrą atlikti netgi tokiuose sudėtinguose biologiniuose mišiniuose kaip ląstelių lizatas.

Abiem atvejais žymėjimo antrojo žingsnio metu naudota bioortogonalumu pasižyminti azidų-alkinų cikloprijungimo (AAC) reakcija. Ji leidžia antrąjį žymėjimo žingsnį – cheminį žymės prijungimą prie fermentiškai įvestos funkcinės grupės – atlikti nesusiduriant su kryžminių reaktyvumų keliamais apribojimais. Todėl pastaruoju metu AAC panaudojimas sparčiai plinta biochemijos ir kituose tyrimuose, taip pat ir mTAG (Motorin ir kt., 2011; Artyukhin ir Woo, 2012; Peters ir kt., 2010; Islam ir kt., 2011; Wang ir kt., 2011; Willnow ir kt., 2012; Bothwell ir kt., 2012). Jis pasiteisino ir šioje disertacijoje aprašomų darbų metu.

3.3.1 Programuojamas sekai specifinis RNR žymėjimas panaudojant archėjų C/D RNP

Visose iki šiol aprašytose mTAG sistemose taikinio pozicijos yra apspręstos kiekvienos MTazės substratinio specifiškumo, kuris negali būti pakeistas paprastos biomolekulių inžinerijos būdu. Kartais tai gali tapti kertiniu trūkumu, siekiant pažymėti natūralias biologiškai aktyvias molekules, kadangi dauguma metilino taikinių jau bus metilinti *in vivo* ir todėl nebegalės būti pažymėti naudojant atitinkamus gamtinius fermentus. Arba tiesiog prireikus pažymėti poziciją, kuri nėra nei vienos laukinio tipo MTazės taikinis.

Mes surinkome fermentinę-cheminę sistemą, tinkamą sintetiniu būdu programuojamam sekai specifiniam kovalentiniam RNR molekulių

funkcionalizavimui ir žymėjimui *in vitro*. Sistema pagrįsta C/D ribonukleoproteininio (RNP) komplekso aktyvumu. Komplekso baltymai yra lengvai išgryninami. Kreipiančiosios RNR sekos, kuri taikinio seką atpažįsta komplementarumo principu, pakeitimui reikalingi DNR oligonukleotidai lengvai prieinami komerciškai. Pakeitimas DNR lygmenyje, pagrįstas senosios sekos iškirpimu restrikcijos endonukleazėmis ir sintetinių oligonukleotidų įsiuvimu, bei transkripcija *in vitro* leidžia greitai ir paprastai gauti reikiamą kreipiančiąją RNR.

Cheminė sistemos dalis – sintetinis MTazės kofaktorius. Tarp ištirtų kofaktoriaus AdoMet analogų, SeAdoYn, turintis pernešamą prop-2-inilgrupę ir seleno atomą vietoje sieros, pasirodė esąs labiausiai tinkamas C/D RNP vykdomai reaktyvių funkcinių grupių pernašai. Sieros atomą ir prop-2-inilgrupę turintis kofaktoriaus analogas yra labai nestabilus neutraliuose ir šarminiuose vandeniniuose tirpaluose dėl greito vandens molekulės prijungimo prie pernešamos grupės (Islam ir kt., 2011; Willnow ir kt., 2012; Lukinavičius ir kt., 2013). Lyginant su kofaktoriaus analogais, turinčiais ilgesnes šonines grandines, SeAdoYn privalumas, tikriausiai, yra nedidelė pernešama grupė, kuri gali geriau įsikomponuoti laukinio tipo fermento aktyviajame centre.

Siekiant C/D RNP pagalba pernešti ilgesnes grandines su įvairesnėmis funkcinėmis grupėmis, buvo bandyta racionalios baltymų inžinerijos būdu praplėsti *P.abyssi* fibrilarino aktyvųjį centrą. Tačiau dėl aktyviojo centro aminorūgščių svarbaus vaidmens katalizėje, galimų pakeitimų pasirinkimas buvo labai mažas, o ir vienintelė galima mutacija A152G nedavė laukto rezultato. Visa tai leidžia manyti, kad aktyvaus centro erdvinė inžinerija gali būti netinkama šiai fermentų grupei.

Su SeAdoYn pavyko gauti iki maždaug 30% modifikuoto substrato, kai metilinimo našumas buvo artimas 100%. Tačiau net ir dalies substratinių molekulių žymėjimas yra pakankamas daugeliui taikymų: pvz., tokiems eksperimentams kaip vienos molekulės tyrimai arba sekai specifinis biotino ar kito giminingumo žymens prijungimas siekiant norimos RNR praturtinimo. Metilinimo efektyvumo skirtumai (*in vitro*) skirtinguose taikiniuose yra

būdingas archėjų C/D RNP bruožas (Appel ir Maxwell, 2007). Buvo manoma, kad tai apsprendžia struktūros, kurią reikia išardyti hibridizuojantis kreipiančiajai RNR, stabilumas. Tačiau propinilgrupės prijungimo našumas ne visada santykinai atitinka metilinimo našumą toje pačioje vietoje. Didelis žymėjimo intensyvumas, stebėtas tRNR substrato pozicijose U17a ir Ae3, gerai koreliuoja su aukštu metilinimo lygiu esant kofaktoriui AdoMet ir gali būti paaiškintas tuo, kad šie taikiniai, lyginant su likusiais, yra mažiau G+C turtingose srityse. Kitų trijų tRNR pozicijų atveju stebėtos prieštaringos tendencijos: pvz., C34 ir C56 atvejais metilinimas palyginti efektyvus, o propinilgrupės prijungimas - ne. Todėl manome, kad pernašos reakcijai įtakos turi taikinio sekos bei susidarančio kreipiančiosios-substratinės RNR duplekso pobūdis. DNR MTazė HhaI ir kitos, metilinančios bazes polinukleotidinėse grandinėse, taikinio bazę išsuka iš DNR spiralės į savo aktyvų centrą (Klimašauskas ir kt., 1994; apžvelgta Roberts ir Cheng, 1998). Taip bazė „ištraukiama“ iš struktūros bei sekos konteksto ir metilinama tarsi atskiras mažamolekulinis taikinytis. C/D RNP atveju RNR dupleksas išsidėsto arti surišto kofaktoriaus bei kai kurių aktyvaus centro aminorūgščių (Lin ir kt., 2011). Tad sekos variacijos aplink taikinio nukleotidą gali lemti skirtingą šių svarbių katalizės dalyvių cheminę aplinką ir konformaciją.

Apibendrinant, trys iš keturių naujai pasirinktų taikinių tRNR substrate ir visi keturi pre-iRNR buvo sėkmingai pažymėti *in vitro* pasitelkus mūsų C/D RNP ir sintetinio kofaktoriaus sistemą. Taigi, ši sintetiškai užprogramuojama sistema potencialiai gali būti pritaikyta žymint RNR taikinius įvairiems vizualizacijos ir giminingumu pagrįstiems eksperimentams. Gamtinėse RNR esančios modifikacijos gali trukdyti kreipiančiosios RNR hibridizacijai ir/arba gali būti jau modifikuota taikinio nukleotido 2'-O pozicija. Todėl siekiant aukšto žymėjimo efektyvumo, galima išbandyti kelis modifikacijos taikinius norimoje RNR, ar netgi kelis greta esančius nukleotidus norimoje RNR srityje. Daugeliui tyrimų gali būti svarbi galimybė pažymėti taikinius, kurie nėra modifikuojami jokių laukinio tipo fermentų – mūsų metodas suteikia galimybę visa tai padaryti.

3.3.2. Selektyvus DNR žymėjimas biologinėse sistemose

Racionali DNR citozino-5 MTazių aktyvaus centro inžinerija ir mūsų skyriuje sukurti AdoMet analogai, kurių pagrindas yra heks-2-inilgrupė, suteikia tvirtą pagrindą įvairiems mTAG panaudojimams, įskaitant dviejų žingsnių sekai specifinį DNR žymėjimą. Ado-6-alkyne ir Ado-6-azide kofaktorių pernešamosios grandinės yra santykinai ilgos: 8-9 atomų ilgio (neskaičiuojant vandenilio). Anksčiau aprašyti kofaktoriai dažnai turėjo nedideles pernešamas grupes ir buvo numatyti darbui su laukinio tipo MTazėmis (Dalhoff ir kt., 2006; Peters ir kt., 2010; Motorin ir kt., 2011; Artyukhin ir Woo, 2012; Willnow ir kt., 2012). Pastaroji strategija leidžia patikrinti sintetinio kofaktoriaus veikimą su plačiu spektru fermentų, ir netgi tirti ištikus ląstelių metilomus (Bothwell ir kt., 2012). Tačiau kai kuriems taikymams neparanku tai, kad šie kofaktoriai nėra specifiniai norimam fermentui, jie gali būti naudojami ne tik dominančių, bet ir kitų mišinyje esančių MTazių. Be to, laukinio tipo fermentų atveju AdoMet visada stipriai konkuruoja su sintetiniais kofaktoriais. Laukinio tipo MTazių veikla su ilgas (≥ 5 atomų) pernešamas grandines turinčiais kofaktoriais yra apsunkinta, o dažnai ir negalima, kaip parodyta tiriant DNR (Lukinavičius ir kt., 2007, 2012) ir baltymų MTazes (Islam ir kt., 2011; Wang ir kt., 2011; Willnow ir kt., 2012). Nors pasitaiko ir laukinio tipo MTazių, veikiančių su įvairiais kofaktoriaus analogais, pavyzdžiui, DNR MTazė TaqI (Dalhoff ir kt., 2006; Lukinavičius ir kt., 2007). DNR (Lukinavičius ir kt., 2007, 2012) ir baltymų (Islam ir kt., 2011; Wang ir kt., 2011) MTazių sukurta tokių mutantinių formų, įskaitant eM.HhaI, kurios puikiai veikė su ilgesnes pernešamas grandines turinčiais kofaktoriais, kartu stipriai sumažėjus jų aktyvumui su AdoMet. Taip gaunama iš dalies bioortogonalioji MTazės-kofaktoriaus sistema: fermentas vis dar šiek tiek veikia su AdoMet, tačiau jį mišinyje lengvai nukonkuruoja sintetinis kofaktorių; ir nors išlieka nedidelė tikimybė, kad kai kurios laukinio tipo MTazės taip pat gali būti aktyvios su pasirinktu sintetiniu kofaktoriumi,

dauguma jo nenaudos. Tokios su kitomis MTazėmis ir AdoMet nepersidengiančios fermento-kofaktoriaus sistemos – tai galimybė specifiškai žymėti norimus taikinius sudėtinguose biomolekulių mišiniuose. Mes parodėme, kad turint tokią dalinai bioortogonalią MTazės-kofaktorių sistemą, DNR galima specifiškai modifikuoti ir ląstelių lizate, nepaisant ten esančių kitų MTazių ir gamtinio kofaktoriaus AdoMet. Galiausiai, modifikavus DNR AAC chemijai tinkamomis funkcinėmis grupėmis, lizate galima atlikti ir antrąjį žymėjimo žingsnį.

Tokia pakankamai ilga grandinė, kaip hex-2-inil- su galine funkcinė grupe, pernešta ant taikinio molekulės lemia geresnę galinės funkcinės grupės prieinamumą ir didesnę jos reaktyvumą, o tai yra naudinga efektyviam modifikuotos molekulės susijungimui su kitais stambiais junginiais ar didelėmis biomolekulėmis. DNR modifikacijos atveju stambūs junginiai, prijungti prie ilgų linijinių šoninių grandinių dažniausiai yra geriau toleruojami DNR polimerazių, lyginant su esančiais ant trumpesnių jungtukų (Weisbrod ir kt., 2008). Tai svarbu efektyviam pažymėtos DNR padauginimui ir analizei PGR bei sekoskaitos metodais. Įvairių MTazių ir kofaktorių kombinacijos galėtų būti panaudotos „daugiaspalviam“ sekai specifiniam DNR žymėjimui.

Ado-6-azide kofaktorių jau sėkmingai pritaikytas epigenominiams tyrimams specifiškai prijungiant žymenis ir praturtinant nemonifikuotas, epigenetiškai nepažymėtas žmogaus genomo vietas (Kriukienė ir kt., 2013).

IŠVADOS

1. *Pyrococcus abyssi* C/D ribonukleoproteininis kompleksas (RNP) katalizuoja sekai-specifinę prailgintų šoninių grandinių (iki 5 anglies atomų ilgio) pernašą nuo sintetinių gamtinio kofaktoriaus *S*-adenozil-L-metionino (AdoMet) analogų ant taikinio nukleotido substratinėje RNR *in vitro*.
2. Naudojant C/D RNR su sintetiškai pakeistomis kreipiančiosiomis sekomis, C/D RNP vykdoma prop-2-inilgrupės pernaša nuo sintetinio kofaktoriaus SeAdoY_n gali būti nukreipta į pasirinktus substratinės RNR nukleotidus.
3. C/D RNP katalizuojama prop-2-inilgrupės pernaša ir po jos vykdoma azidų-alkinų cikloprijungimo („click“) reakcija gali būti naudojama sekai specifiniam įvairių substratinių RNR žymėjimui *in vitro*.
4. DNR metiltransferazė HhaI (variantas Q82A/Y254S/N204A) efektyviai katalizuoja sekai specifinę heks-2-inil- šoninių grandinių, turinčių galines alkinil- arba azido- grupes, pernašą nuo sintetinių kofaktoriaus analogų (atitinkamai Ado-6-alkyne arba Ado-6-azide) ant DNR *in vitro*. Ši fermentinė pernaša ir tolesnis fluoroforo prijungimas „click“ reakcijos pagalba gali būti atliekami bakterijų ląstelių lizate.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Paskelbti moksliniai straipsniai disertacijos tema:

1. **Tomkuvienė, M.**, Clouet-d'Orval, B., Černiauskas, I., Weinhold, E., Klimašauskas, S. (2012) Programmable sequence-specific click-labeling of RNA using archaeal box C/D RNP methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 40(14):6765-73.
2. Lukinavičius, G., **Tomkuvienė, M.**, Masevičius, V., Klimašauskas, S. (2013) Enhanced chemical stability of AdoMet analogues for improved methyltransferase-directed labeling of DNA. *ACS Chem Biol.* Epub. 04.10.

Kiti:

1. Sergeeva, O.V., Burakovsky, D.E., Sergiev, P.V., Zatsepin, T.S., **Tomkuvienė, M.**, Klimašauskas, S., Dontsova O.A. (2012) Usage of rRNA-methyltransferase for site-specific fluorescent labeling. *Moscow University Chemistry Bulletin* 67 (2), 88-93.

Disertacijoje pateikta medžiaga buvo pristatyta šiose konferencijose:

1. **Tomkuvienė, M.**, Clouet-d'Orval, B., Černiauskas, I., Weinhold, E., Klimašauskas, S. Programmable sequence-specific click-labeling of RNA using archaeal box C/D RNP methyltransferases. „The 18th annual meeting of the RNA Society“, Davosas, Šveicarija, 2013.06.11-16. Stendinis pranešimas.
2. **Tomkuvienė, M.**, Clouet-d'Orval, B., Černiauskas, I., Weinhold, E., Klimašauskas, S. Programmable sequence-specific click-labeling of RNA using archaeal box C/D RNP methyltransferases. „The 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress“, Sevilija, Ispanija, 2012.09.04-09. Stendinis pranešimas.

3. **Tomkuvienė, M.**, Clouet-d'Orval, B., Černiauskas, I., Weinhold, E., Klimašauskas, S. Programmable sequence-specific click-labeling of RNA using archaeal box C/D RNP methyltransferases. Lietuvos Biochemikų Draugijos XII-asis suvažiavimas-konferencija. Molėtų raj., Lietuva, 2012.06.28-30. Stendinis pranešimas. Įvertintas „Thermo Scientific“ skirtu geriausio stendinio pranešimo apdovanojimu.
4. **Tomkuvienė, M.**, Clouet-d'Orval, B., Černiauskas, I., Weinhold, E., Klimašauskas, S. Programuojamas sekai specifinis RNR modifikavimas ir žymėjimas panaudojant archėjų C/D RNP kompleksus. Lietuvos mokslų akademijos II-ji jaunųjų mokslininkų konferencija „Fizinių ir technologijos mokslų tarpdalykiniai tyrimai“, Vilnius, Lietuva. 2012.02.14. Žodinis pranešimas. Įvertintas geriausio pranešimo diplomu.
5. **Gudeliauskaitė, M.**, Clouet-d'Orval, B., Lukinavičius, G. and Klimašauskas, S. Reconstitution of archaeal C/D Box sRNPs: towards synthetically programmable sequence-specific labelling of RNA. Lietuvos Biochemikų Draugijos XI suvažiavimas-konferencija. Molėtų raj., Lietuva, 2010.06.15-17. Stendinis pranešimas.
6. **Gudeliauskaitė, M.**, Clouet-d'Orval, B., Lukinavičius, G. and Klimašauskas, S. Reconstitution of archaeal C/D Box sRNPs: towards synthetically programmable sequence-specific labelling of RNA. „33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference“, Atėnai, Graikija, 2008.06.28-07.03. Stendinis pranešimas.
7. **Gudeliauskaitė, M.**, Clouet-d'Orval, B., Lukinavičius, G. ir Klimašauskas, S. Programuojama RNR molekulių modifikacija archėjų C/D sRNP pagalba. Lietuvos Biochemikų Draugijos X suvažiavimas-konferencija. Molėtų raj., Lietuva, 2008.06.20-22. Stendinis pranešimas.
8. **Gudeliauskaitė, M.**, Clouet-d'Orval, B. and Klimašauskas, S. Reconstitution of an archaeal C/D box RNP containing an sRNA K-loop structure. FEBS Workshop „DNA and RNA modification Enzymes:

Comparative Structure, Mechanism, Function and Evolution“, Aussois, Prancūzija, 2007.09.11-16. Stendinis pranešimas.

FINANSINĖ PARAMA

Disertacijoje aprašyti darbai buvo iš dalies finansuoti Europos Socialinio Fondo Visuotinės Dotacijos (VP1-3.1-ŠMM-07-K-01-105), JAV Nacionalinio Sveikatos Instituto (NIH, R21HG004535), Lietuvos-Prancūzijos mokslininkų bendradarbiavimo programos „Žiliberas“ (SUT-157) ir FP7-RegPot-2009-1 (245721, MoBiLi) projektų lėšomis.

CURRICULUM VITAE

Vardas, pavardė Miglė Tomkuvienė
Gimimo data 1982 01 11
Darbovietės adresas DNR modifikacijos tyrimų skyrius,
Vilniaus Universiteto Biotechnologijos Institutas,
V.A. Graičiūno 8, LT-02241 Vilnius
Telefono nr. +370 5 2602118 (darbovietės)
+370 684 91512 (asmeninis)
E-pašto adresai migleg@ibt.lt (darbovietės)
migleg11@gmail.com (asmeninis)

Išsilavinimas

2006-2013 Doktorantūros studijos.
Fizinių mokslų sritis, Biochemijos kryptis,
šaka - nukleorūgštys, baltymų sintezė P 320.
Vilniaus Universitetas, Vilnius, Lietuva.

2006 Magistro laipsnis. Biologija, genetika.
Vilniaus Universitetas, Vilnius, Lietuva.
Magna Cum Laude

2004 Bakalauro laipsnis. Biologija, molekulinė biologija.
Vilniaus Universitetas, Vilnius, Lietuva.
Cum Laude

Darbo patirtis

Vilniaus Universiteto Biotechnologijos Instituto
DNR modifikacijos tyrimų skyriaus

2010-dabar Jaunesnioji mokslo darbuotoja
2006-2010 Bioinžinierė
2003-2006 Laborantė

Stažuotės

2013 Archėjų C/D RNP tyrimai vadovaujant dr. B.
2011 Clouet-d'Orval. 1-3 sav. trukmės vizitai. Prof.
2008 A.Carpousis grupė, CNRS Mikrobiologijos ir
2007 molekulinės genetikos laboratorija, Paul Sabatier
2006 universitetas, Tulūza, Prancūzija.

PADEKA

Dėkoju darbo vadovui prof. Sauliui Klimašauskui už pasiūlytas doktorantūros studijas jam vadovaujant ir įdomias darbo temas. Už puikų, rūpestingą vadovavimą ir perteiktą dalį didžiulės patirties. Už išugdytą kompetenciją, kuri leidžia man siekti mokslų daktaro laipsnio ir suteikia tvirtą pagrindą ateičiai.

Dėkoju pirmajai savo vadovei dr. Rūtai Gerasimaitei už išsamų mokslinių darbų pradžiamokslį, už tai, kad išmokė dirbti savarankiškai. Studentams Ignui Černiauskui ir Janinai Ličytei už dėmesį turėti puikią savo „komandą“. Dr. Zitai Liutkevičiūtei už pagalbą įsisavinant TLC ir HPLC-MS metodus. Dėkoju visiems Biotechnologijos instituto kolegoms už draugišką ir motyvuojančią darbo atmosferą.

Merci dr. Beatrice Clouet-d'Orval ir visiems LMGM kolegoms ne tik už darbo patirtį, bet ir už nuostabią pažintį su Pietų Prancūzijos gyvenimu.

Dėkoju dr. Gražvydui Lukinavičiui, dr. Michael Martin, dr. Sophie Willnow, prof. Elmar Weinhold ir dr. Viktorui Masevičiui už sintetinius kofaktoriaus analogus. Giedrei Urbanavičiūtei už eM.HhaI preparatą. Dr. Giedriui Sasnauskui už McrBC preparatą. Dr. Arvydui Kanopkai už plazmidę su triušio β -globino genu. Dr. Gintautui Žvirbliui už pET43.1a(+) plazmidę.

Dėkoju biologijos mokytojai Alydai Daulenskienei ir chemijos mokytojui Viliui Mincevičiui už tai, kad jų pamokose atėjo galutinis suvokimas, kokią profesiją noriu rinktis, ir už stiprų paruošimą studijoms.

Dėkoju šeimai ir draugams už domėjimąsi, supratimą ir palaikymą. Mamai – pirmajai biologijos mokytojai, ir a.a. tėčiui už nuo mažens įskiepytą glaudų ryšį su gamta. Močiutei už smetonišką discipliną; sesei už lengvesnį požiūrį. Vyriui Vyteniui už tai, kad jis šalia, ir už gražų gyvenimą. Savo katei, vardu Entropija Naglėja, už jaukius pasisėdėjimus kartu, rašant disertaciją.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aittaleb, M., Rashid, R., Chen, Q., Palmer, J. R., Daniels, C. J., & Li, H. (2003). Structure and function of archaeal box C/D sRNP core proteins. *Nature structural biology*, 10(4), 256–63.
2. Aittaleb, M., Visone, T., Fenley, M. O., & Li, H. (2004). Structural and thermodynamic evidence for a stabilizing role of Nop5p in S-adenosyl-L-methionine binding to fibrillar. *The Journal of biological chemistry*, 279(40), 41822–9.
3. Appel, C. D., & Maxwell, E. S. (2007). Structural features of the guide:target RNA duplex required for archaeal box C/D sRNA-guided nucleotide 2'-O-methylation. *RNA (New York, N.Y.)*, 13(6), 899–911.
4. Artyukhin, A. B., & Woo, Y.-H. (2012). DNA extraction method with improved efficiency and specificity using DNA methyltransferase and “click” chemistry. *Analytical biochemistry*, 425(2), 169–74.
5. Baum, D. A., & Silverman, S. K. (2007). Deoxyribozyme-catalyzed labeling of RNA. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 46(19), 3502–4.
6. Beynon, R., & Easterby, J. (1998). *Buffer Solutions: the Basics*. Taylor and Francis. Taylor and Francis.
7. Bleichert, F., Gagnon, K. T., Brown, B. A., Maxwell, E. S., Leschziner, A. E., Unger, V. M., & Baserga, S. J. (2009). A dimeric structure for archaeal box C/D small ribonucleoproteins. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5946), 1384–7.
8. Bortolin, M.-L., Bachellerie, J.-P., & Clouet-d'Orval, B. (2003). In vitro RNP assembly and methylation guide activity of an unusual box C/D RNA, cis-acting archaeal pre-tRNA(Trp). *Nucleic acids research*, 31(22), 6524–35.
9. Bortolin-Cavaillé, M.-L., & Cavaillé, J. (2012). The SNORD115 (H/MBII-52) and SNORD116 (H/MBII-85) gene clusters at the imprinted Prader-Willi locus generate canonical box C/D snoRNAs. *Nucleic acids research*, 40(14), 6800–7.
10. Bothwell, I. R., Islam, K., Chen, Y., Zheng, W., Blum, G., Deng, H., & Luo, M. (2012). Se-adenosyl-L-selenomethionine cofactor analogue as a reporter of protein methylation. *Journal of the American Chemical Society*, 134(36), 14905–12.
11. Bower-Phillips, K. R., Taylor, D. W., Wang, H., & Baserga, S. J. (2012). The box C / D sRNP dimeric architecture is conserved across domain Archaea, *RNA*, 18:1527–1540.
12. Brameier, M., Herwig, A., Reinhardt, R., Walter, L., & Gruber, J. (2011). Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: expanding the range of regulatory RNAs. *Nucleic acids research*, 39(2), 675–86.
13. Braun, G., Diechtierow, M., Wilkinson, S., Schmidt, F., Hüben, M., Weinhold, E., & Reich, N. O. (2008). Enzyme-Directed Positioning of Nanoparticles on Large DNA Templates, *Bioconjugate Chem.*, 19:476–479.
14. Cavaillé, J., Nicoloso, M., & Bachellerie, J. P. (1996). Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides. *Nature*, 383(6602), 732–5.
15. Chang PV, Prescher JA, Sletten EM, Baskin JM, Miller IA, Agard NJ, Lo A, Bertozzi CR. (2010) Copper-free click chemistry in living animals. *Proc Natl Acad Sci*;107(5):1821-6.
16. Cheng, X. and Blumenthal, R. (1999). *S-adenosylmethionine-dependent Methyltransferases: Structures and Functions* (p. 400).
17. Cho, I.-M., Lai, L. B., Susanti, D., Mukhopadhyay, B., & Gopalan, V. (2010). Ribosomal protein L7Ae is a subunit of archaeal RNase P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14573–8.
18. Chow, C. S., Mahto, S. K., & Lamichhane, T. N. (2008). Combined Approaches to Site-Specific Modification of RNA. *ACS chemical biology*, 3(1), 30–37.

19. Clouet d'Orval, B., Bortolin, M. L., Gaspin, C., & Bachellerie, J. P. (2001). Box C/D RNA guides for the ribose methylation of archaeal tRNAs. The tRNA^{Trp} intron guides the formation of two ribose-methylated nucleosides in the mature tRNA^{Trp}. *Nucleic acids research*, 29(22), 4518–29.
20. Clouet-d'Orval, B., Gaspin, C., & Mougin, A. (2005). Two different mechanisms for tRNA ribose methylation in Archaea: a short survey. *Biochimie*, 87(9-10), 889–95.
21. Crawford, D. J., Hoskins, A. A., Friedman, L. J., Gelles, J., & Moore, M. J. (2008). Visualizing the splicing of single pre-mRNA molecules in whole cell extract. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(1), 170–9.
22. Dalhoff, C., Lukinavicius, G., Klimasauskas, S., & Weinhold, E. (2006). Direct transfer of extended groups from synthetic cofactors by DNA methyltransferases. *Nature chemical biology*, 2(1), 31–2.
23. Daujotyte, D., Vilkaitis, G., Manelyte, L., Skalicky, J., Szyperski, T., & Klimasauskas, S. (2003). Solubility engineering of the HhaI methyltransferase. *Protein engineering*, 16(4), 295–301.
24. Davis, G. D., Elisee, C., Newham, D. M., & Harrison, R. G. (1999). New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli. *Biotechnology and bioengineering*, 65(4), 382–8.
25. Davis DR. Biophysical and conformational properties of modified nucleosides (nuclear magnetic resonance studies). In: Grosjean H, Benne R, editors. Modification and Editing of RNA. Washington DC: ASM Press; 1998. p. 85-102.
26. Decatur, W. A., & Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in biochemical sciences*, 27(7), 344–51.
27. Deng, L., Starostina, N. G., Liu, Z.-J., Rose, J. P., Terns, R. M., Terns, M. P., & Wang, B.-C. (2004). Structure determination of fibrillarlin from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus. *Biochemical and biophysical research communications*, 315(3),
28. Dennis, P P, Omer, a, & Lowe, T. (2001). A guided tour: small RNA function in Archaea. *Molecular Microbiology*, 40(3), 509–519.
29. Dennis, Patrick P, & Omer, A. (2005). Small non-coding RNAs in Archaea. *Current opinion in microbiology*, 8(6), 685–94.
30. Dojahn, C. M., Hesse, M., & Arenz, C. (2013). A chemo-enzymatic approach to specifically click-modified RNA. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 49(30), 3128–30.
31. Dorywalska, M., Blanchard, S. C., Gonzalez, R. L., Kim, H. D., Chu, S., & Puglisi, J. D. (2005). Site-specific labeling of the ribosome for single-molecule spectroscopy. *Nucleic acids research*, 33(1), 182–9.
32. Draper, D. E. (2004). A guide to ions and RNA structure. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(3), 335–43.
33. Feder, M., Pas, J., Wyrwicz, L. S., & Bujnicki, J. M. (2003). Molecular phylogenetics of the RrmJ/fibrillarlin superfamily of ribose 2'-O-methyltransferases. *Gene*, 302(1-2), 129–38.
34. Finer-Moore, J. S., Liu, L., Birdsall, D. L., Brem, R., Apfeld, J., Santi, D. V., & Stroud, R. M. (1998). Contributions of orientation and hydrogen bonding to catalysis in Asn229 mutants of thymidylate synthase. *Journal of molecular biology*, 276(1), 113–29.
35. Forterre, Patrick, Gribaldo Simonetta and Celine Brochier-Armanet. Natural history of the archaeal domain. In: Garrett, RA, Klenk, HP, editors. Archaea: evolution, physiology, and molecular biology. Blackwell Publishing Ltd, 2007. p. 17-28.
36. Fukunaga, R., Ishitani, R., Nureki, O., & Yokoyama, S. (2005). Crystallization of leucyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Leu} from the archaeon Pyrococcus

- horikoshii. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 61(Pt 1), 30–2.
37. Gagnon, K. T., Zhang, X., Agris, P. F., & Maxwell, E. S. (2006). Assembly of the archaeal box C/D sRNP can occur via alternative pathways and requires temperature-facilitated sRNA remodeling. *Journal of molecular biology*, 362(5), 1025–42.
 38. Gagnon KT, Guuosheng Q, Maxwell ES. Multicomponent 2'-O-ribose methylation machines: evolving box C/D RNP structure and function. In: Grosjean H, editor. DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution. University of Paris: CNRS; 2009. p.108-121,
 39. Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research*, 31(13), 3784–8.
 40. Ge, J., Liu, H., & Yu, Y.-T. (2010). Regulation of pre-mRNA splicing in *Xenopus* oocytes by targeted 2'-O-methylation. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(5), 1078–85.
 41. Gerasimaitė, R., Merkienė, E., & Klimašauskas, S. (2011). Direct observation of cytosine flipping and covalent catalysis in a DNA methyltransferase. *Nucleic acids research*, 39(9), 3771–80.
 42. Ghalei, H., Hsiao, H.-H., Urlaub, H., Wahl, M. C., & Watkins, N. J. (2010). A novel Nop5-sRNA interaction that is required for efficient archaeal box C/D sRNP formation. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(12), 2341–8.
 43. Golovanov, A. P., Hautbergue, G. M., Wilson, S. A., & Lian, L.-Y. (2004). A simple method for improving protein solubility and long-term stability. *Journal of the American Chemical Society*, 126(29), 8933–9.
 44. Gramlich, P. M. E., Warncke, S., Gierlich, J., & Carell, T. (2008). Click-click-click: single to triple modification of DNA. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 47(18), 3442–4.
 45. Grosjean, H., Droogmans, L., Roovers, M., & Keith, G. (2007). Detection of enzymatic activity of transfer RNA modification enzymes using radiolabeled tRNA substrates. *Methods in enzymology*, 425, 55–101.
 46. Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714–23.
 47. Hager, J., Staker, B. L., Bugl, H., & Jakob, U. (2002). Active site in RrmJ, a heat shock-induced methyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, 277(44), 41978–86.
 48. Hardin, J. W., & Batey, R. T. (2006). The bipartite architecture of the sRNA in an archaeal box C/D complex is a primary determinant of specificity. *Nucleic acids research*, 34(18), 5039–51.
 49. Hardin, J. W., Reyes, F. E., & Batey, R. T. (2009). Analysis of a critical interaction within the archaeal box C/D small ribonucleoprotein complex. *The Journal of biological chemistry*, 284(22), 15317–24.
 50. Helm, M. (2006). Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic acids research*, 34(2), 721–33.
 51. Huang, C., & Yu, Y.-T. (2010). Targeted 2'-O methylation at a nucleotide within the pseudoknot of telomerase RNA reduces telomerase activity in vivo. *Molecular and cellular biology*, 30(18), 4368–78.
 52. Huang, Y., Ji, L., Huang, Q., Vassylyev, D. G., Chen, X., & Ma, J.-B. (2009). Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature*, 461(7265), 823–7.
 53. Islam, K., Zheng, W., Yu, H., Deng, H., & Luo, M. (2011). Expanding cofactor repertoire of protein lysine methyltransferase for substrate labeling. *ACS chemical biology*, 6(7), 679–84.

54. Ye, K., Jia, R., Lin, J., Ju, M., Peng, J., Xu, A., & Zhang, L. (2009). Structural organization of box C/D RNA-guided RNA methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(33), 13808–13.
55. Yu YT, Terns RM, Terns MP. Mechanisms and functions of RNA-guided RNA modification. In: H. Grosjean, editor. *Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing*. New York: Springer-Verlag Press; 2005. p. 223–62
56. Jao, C. Y., & Salic, A. (2008). Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(41), 15779–84.
57. Kanopka, A., Mühlemann, O., & Akusjärvi, G. (1996). Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature*, *381*(6582), 535–8.
58. Karijolic, J., & Yu, Y.-T. (2010). Spliceosomal snRNA modifications and their function. *Rna Biology*, *7*(2), 192–204.
59. Kishore, S., Khanna, A., Zhang, Z., Hui, J., Balwierz, P. J., Stefan, M., Beach, C., Nicholls, RD., Zavolan, M., Stamm, S. (2010). The snoRNA MBII-52 (SNORD 115) is processed into smaller RNAs and regulates alternative splicing. *Human molecular genetics*, *19*(7), 1153–64.
60. Klein, D. J., Schmeing, T. M., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2001). The kink-turn: a new RNA secondary structure motif. *The EMBO journal*, *20*(15), 4214–21.
61. Klimašauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J., & Cheng, X. (1994). HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell*, *76*(2), 357–69.
62. Klimašauskas, Saulius, & Weinhold, E. (2007). A new tool for biotechnology: AdoMet-dependent methyltransferases. *Trends in biotechnology*, *25*(3), 99–104.
63. Kolb, H. C., Finn, M. G., & Sharpless, K. B. (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, *40*(11), 2004–2021.
64. Krezel, A., Kopera, E., Protas, A. M., Poznański, J., Wysłouch-Cieszyńska, A., & Bal, W. (2010). Sequence-specific Ni(II)-dependent peptide bond hydrolysis for protein engineering. Combinatorial library determination of optimal sequences. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(10), 3355–66.
65. Kriukienė, E., Labrie, V., Khare, T., Urbanavičiūtė, G., Lapinaitė, A., Koncevičius, K., ... Klimašauskas, S. (2013). DNA unmethylome profiling by covalent capture of CpG sites. *Nature communications*, *4*, 2190.
66. Lee, B. W. K., Sun, H. G., Zang, T., Kim, B. J., Alfaro, J. F., & Zhou, Z. S. (2010). Enzyme-Catalyzed Transfer of a Ketone Group from an S²-Adenosylmethionine Analogue: A Tool for the Functional Analysis of Methyltransferases, *Journal of the American Chemical Society*, *132*:3642–3643.
67. Liang, X., Liu, Q., & Fournier, M. J. (2007). rRNA modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity. *Molecular cell*, *28*(6), 965–77.
68. Lin, J., Lai, S., Jia, R., Xu, A., Zhang, L., Lu, J., & Ye, K. (2011). Structural basis for site-specific ribose methylation by box C/D RNA protein complexes. *Nature*, *469*(7331), 559–63.
69. Liu, B., Ni, J., & Fournier, M. J. (2001). Probing RNA in vivo with methylation guide small nucleolar RNAs. *Methods (San Diego, Calif.)*, *23*(3), 276–86.
70. Lukinavičius, G., Lapienė, V., Stasevskij, Z., Dalhoff, C., Weinhold, E., & Klimašauskas, S. (2007). Targeted labeling of DNA by methyltransferase-directed transfer of activated groups (mTAG). *Journal of the American Chemical Society*, *129*(10), 2758–2759.
71. Lukinavičius, G., Lapinaite, A., Urbanaviciute, G., Gerasimaite, R., & Klimasauskas, S. (2012). Engineering the DNA cytosine-5 methyltransferase reaction for sequence-specific labeling of DNA. *Nucleic acids research*, *40*(22), 11594–602.

72. Lukinavičius, G., Tomkuvienė, M., Masevičius, V., & Klimašauskas, S. (2013). Enhanced Chemical Stability of AdoMet Analogues for Improved Methyltransferase-Directed Labeling of DNA. *ACS chemical biology*.
73. Michel, C. I., Holley, C. L., Scruggs, B. S., Sidhu, R., Brookheart, R. T., Listenberger, L. L., Behlke, M., Ory, D. Schaffer, J. E. (2011). Small nucleolar RNAs U32a, U33, and U35a are critical mediators of metabolic stress. *Cell metabolism*, 14(1), 33–44.
74. Moore, T., Zhang, Y., Fenley, M. O., & Li, H. (2004). Molecular basis of box C/D RNA-protein interactions; cocrystal structure of archaeal L7Ae and a box C/D RNA. *Structure (London, England : 1993)*, 12(5), 807–18.
75. Motorin, Y., Burhenne, J., Teimer, R., Koynov, K., Willnow, S., Weinhold, E., & Helm, M. (2011). Expanding the chemical scope of RNA:methyltransferases to site-specific alkylation of RNA for click labeling. *Nucleic acids research*, 39(5), 1943–52.
76. Motorin, Y., & Helm, M. (2011). RNA nucleotide methylation. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 2(5), 611–31.
77. Motorin, Y., Muller, S., Behm-Ansmant, I., & Branlant, C. (2007). Identification of modified residues in RNAs by reverse transcription-based methods. *Methods in enzymology*, 425, 21–53.
78. Nagy, K., Orbán, E., Bősze, S. and Kele, P. (2010), Clickable Long-Wave “Mega-Stokes” Fluorophores for Orthogonal Chemoselective Labeling of Cells. *Chem. Asian J.*, 5: 773–777
79. Neely, R. K., Dedecker, P., Hotta, J., Urbanaviciute, G., Klimasauskas, S., & Hofkens, J. (2010). DNA fluorocode: A single molecule, optical map of DNA with nanometre resolution. *Chemical Science*, 1(4), 453–460.
80. Nolivos, S., Carpousis, A J., Clouet-d’Orval, B. (2005). The K-loop, a general feature of the Pyrococcus C/D guide RNAs, is an RNA structural motif related to the K-turn. *Nucleic Acids Research*, 33(20), 6507–6514.
81. Noon, K. R., Bruenger, E., & McCloskey, J. a. (1998). Posttranscriptional modifications in 16S and 23S rRNAs of the archaeal hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology*, 180(11), 2883–2888.
82. Ochs, R. L., Lischwe, M. A., Spohn, W. H., & Busch, H. (1985). Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 54(2), 123–33.
83. Omer, a D., Lowe, T. M., Russell, a G., Ebhardt, H., Eddy, S. R., & Dennis, P. P. (2000). Homologs of small nucleolar RNAs in archaea. *Science*, 288(5465), 517–522.
84. Omer, A. D., Ziesche, S., Ebhardt, H., & Dennis, P. P. (2002). In vitro reconstitution and activity of a C/D box methylation guide ribonucleoprotein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5289–94.
85. Onizuka, K., Taniguchi, Y., Nishioka, T., & Sasaki, S. (2009). Site-specific modification of RNA by functionality-transfer ODN probes. *Nucleic acids symposium series (2004)*, (53), 67–8.
86. Ono, M., Yamada, K., Avolio, F., Scott, M. S., van Koningsbruggen, S., Barton, G. J., & Lamond, A. I. (2010). Analysis of human small nucleolar RNAs (snoRNA) and the development of snoRNA modulator of gene expression vectors. *Molecular biology of the cell*, 21(9), 1569–84.
87. Ono, M., Scott, M. S., Yamada, K., Avolio, F., Barton, G. J., & Lamond, A. I. (2011). Identification of human miRNA precursors that resemble box C/D snoRNAs. *Nucleic acids research*, 39(9), 3879–91.

88. Oruganti, S., Zhang, Y., Li, H., Robinson, H., Terns, M. P., Terns, R. M., ... Li, H. (2007). Alternative conformations of the archaeal Nop56/58-fibrillar complex imply flexibility in box C/D RNPs. *Journal of molecular biology*, 371(5), 1141–50.
89. Padilla, R., & Sousa, R. (2002). A Y639F/H784A T7 RNA polymerase double mutant displays superior properties for synthesizing RNAs with non-canonical NTPs. *Nucleic acids research*, 30(24), e138.
90. Paredes, E., & Das, S. R. (2011). Click chemistry for rapid labeling and ligation of RNA. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 12(1), 125–31.
91. Peters, W., Willnow, S., Duisken, M., Kleine, H., Macherey, T., Duncan, K. E., ... Weinhold, E. (2010). Enzymatic site-specific functionalization of protein methyltransferase substrates with alkynes for click labeling. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 49(30), 5170–3.
92. Petrov, A., & Puglisi, J. D. (2010). Site-specific labeling of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes for single-molecule manipulations. *Nucleic acids research*, 38(13), e143.
93. Pljevaljcic, G., Schmidt, F., Peschlow, A., & Weinhold, E. (2004). Sequence-specific DNA labeling using methyltransferases. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 283, 145–61.
94. Reichow, S. L., Hamma, T., Ferré-D'Amaré, A. R., & Varani, G. (2007). The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic acids research*, 35(5), 1452–64.
95. Roberts, R. J., & Cheng, X. (1998). Base flipping. *Annual review of biochemistry*, 67, 181–98.
96. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. and Sharpless, K. B. (2002) A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 41, 2596–2599.
97. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
98. Schmidt, F. H.-G., Hüben, M., Gider, B., Renault, F., Teulade-Fichou, M.-P., & Weinhold, E. (2008). Sequence-specific Methyltransferase-Induced Labelling (SMILing) of plasmid DNA for studying cell transfection. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(1), 40–8.
99. Schneider, K. L., Pollard, K. S., Baertsch, R., Pohl, A., & Lowe, T. M. (2006). The UCSC Archaeal Genome Browser. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), D407–10.
100. Schoemaker, R. J. W., & Gulyaev, A. P. (2006). Computer simulation of chaperone effects of Archaeal C/D box sRNA binding on rRNA folding. *Nucleic acids research*, 34(7), 2015–26.
101. Schroeder, K. T., McPhee, S. A., Ouellet, J., & Lilley, D. M. J. (2010). A structural database for k-turn motifs in RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(8), 1463–8.
102. Schubert, H. L., Blumenthal, R. M., & Cheng, X. (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends in biochemical sciences*, 28(6), 329–35.
103. Singh, S. K., Gurha, P., Tran, E. J., Maxwell, E. S., & Gupta, R. (2004). Sequential 2'-O-methylation of archaeal pre-tRNA^{Trp} nucleotides is guided by the intron-encoded but trans-acting box C/D ribonucleoprotein of pre-tRNA. *The Journal of biological chemistry*, 279(46), 47661–71.
104. Sletten, E. M., & Bertozzi, C. R. (2009). Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 48(38), 6974–98.
105. Starostina, N. G., Marshburn, S., Johnson, L. S., Eddy, S. R., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2004). Circular box C/D RNAs in *Pyrococcus furiosus*. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39), 14097–14101.
106. Stone, M. D., Mihalusova, M., O’connor, C. M., Prathapam, R., Collins, K., & Zhuang, X. (2007). Stepwise protein-mediated RNA folding directs assembly of telomerase ribonucleoprotein. *Nature*, 446(7134), 458–61.
 107. Struck, A.-W., Thompson, M. L., Wong, L. S., & Micklefield, J. (2012). S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. *Chembiochem a European journal of chemical biology*, 13(18), 2642–55.
 108. Sukackaite, R., Grazulis, S., Tamulaitis, G., & Siksny, V. (2012). The recognition domain of the methyl-specific endonuclease McrBC flips out 5-methylcytosine. *Nucleic acids research*, 40(15), 7552–62.
 109. Teittinen, K. J., Laiho, A., Uusimäki, A., Pursiheimo, J.-P., Gyenesei, A., & Lohi, O. (2013). Expression of small nucleolar RNAs in leukemic cells. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 36(1), 55–63.
 110. Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., & Hurt, E. C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell*, 72(3), 443–57.
 111. Tornøe, C. W., Christensen, C. and Meldal, M. (2002) Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.*, 67, 3057–3064.
 112. Tran, E., Brown, J., & Maxwell, E. S. (2004). Evolutionary origins of the RNA-guided nucleotide-modification complexes: from the primitive translation apparatus? *Trends in biochemical sciences*, 29(7), 343–50.
 113. Tran, E. J., Zhang, X., & Maxwell, E. S. (2003). Efficient RNA 2'-O-methylation requires juxtaposed and symmetrically assembled archaeal box C/D and C'/D' RNPs. *The EMBO journal*, 22(15), 3930–40.
 114. Tran, E., Zhang, X., Lackey, L., & Maxwell, E. S. (2005). Conserved spacing between the box C/D and C'/D' RNPs of the archaeal box C/D sRNP complex is required for efficient 2'-O-methylation of target RNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 11(3), 285–93.
 115. Uemura, S., Aitken, C. E., Korlach, J., Flusberg, B. A., Turner, S. W., & Puglisi, J. D. (2010). Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. *Nature*, 464(7291), 1012–7.
 116. Urbonavičius, J., Qian, Q., Durand, J. M., Hagervall, T. G., & Bjork, G. R. (2001). Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *EMBO J.*, 20(17), 4863–4873.
 117. Urbonavičius, J., Skouloubris, S., Myllykallio, H., & Grosjean, H. (2005). Identification of a novel gene encoding a flavin-dependent tRNA:m5U methyltransferase in bacteria--evolutionary implications. *Nucleic acids research*, 33(13), 3955–64.
 118. Van Nues, R. W., Granneman, S., Kudla, G., Sloan, K. E., Chicken, M., Tollervey, D., & Watkins, N. J. (2011). Box C/D snoRNP catalysed methylation is aided by additional pre-rRNA base-pairing. *The EMBO journal*, 30(12), 2420–30.
 119. Vilkaitis, G., Merkiene, E., Serva, S., Weinhold, E., Klimasauskas, S. (2001) The mechanism of DNA cytosine-5 methylation. Kinetic and mutational dissection of HhaI methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 276, 20924-20934
 120. Vitali, P., Basyuk, E., Le Meur, E., Bertrand, E., Muscatelli, F., Cavallé, J., & Huttenhofer, A. (2005). ADAR2-mediated editing of RNA substrates in the nucleolus is inhibited by C/D small nucleolar RNAs. *The Journal of cell biology*, 169(5), 745–53.

121. Wang, R., Zheng, W., Yu, H., Deng, H., & Luo, M. (2011). Labeling substrates of protein arginine methyltransferase with engineered enzymes and matched S-adenosyl-L-methionine analogues. *Journal of the American Chemical Society*, *133*(20), 7648–51.
122. Watkins, N. J., & Bohnsack, M. T. (2011). The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, *3*(3), 397–414.
123. Weisbrod, S. H., & Marx, A. (2008). Novel strategies for the site-specific covalent labelling of nucleic acids. *Chemical communications (Cambridge, England)*, (44), 5675–85.
124. Willnow, S., Martin, M., Lüscher, B., & Weinhold, E. (2012). A selenium-based click AdoMet analogue for versatile substrate labeling with wild-type protein methyltransferases. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, *13*(8), 1167–73.
125. Xue, S., Wang, R., Yang, F., Terns, R. M., Terns, M. P., Zhang, X., Maxwell, E. S., Li, H. (2010). Structural basis for substrate placement by an archaeal box C/D ribonucleoprotein particle. *Molecular cell*, *39*(6), 939–49.
126. Zhang, X., Champion, E. A., Tran, E. J., Brown, B. A., Baserga, S. J., & Maxwell, E. S. (2006). The coiled-coil domain of the Nop56/58 core protein is dispensable for sRNP assembly but is critical for archaeal box C/D sRNP-guided nucleotide methylation. *RNA (New York, N.Y.)*, *12*(6), 1092–103.
127. Ziesche, S. M., Omer, A. D., & Dennis, P. P. (2004). RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and non-ribosomal RNAs in Archaea. *Molecular microbiology*, *54*(4), 980–93.