

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Biochemijos magistro studijų programos II k. studentas

Justas STONKUS

Magistro darbas

Nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų 2'-O-metilnukleozidų demetilazių tyrimas

Darbo vadovė

Dr. Rasa Rutkienė

Vilnius, 2022

Nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų 2'-*O*-metilnukleozidų demetilazių tyrimas

Darbas atliktas Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje

Justas Stonkus

/parašas/

Darbo vadovė

Leisti / neleisti gintis

Dr. Rasa Rutkienė

/parašas/

Irašo data

Turinys

Santrumpos.....	5
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių superšeima	8
1.1.1. Nuo α -KG ir Fe(II) priklausomų oksigenazių struktūriniai ypatumai.....	11
1.1.2. Nuo α -KG ir Fe(II) priklausomų oksigenazių veikimo mechanizmas	12
1.1.3. Biodegradacijoje dalyvaujančios nuo α -KG ir Fe(II) priklausomos oksigenazės	15
1.1.4. Nuo α -KG ir Fe(II) priklausomų oksigenazių aktyvumo tyrimai ir biotechnologinis pritaikymas	16
1.2. Nukleozidų modifikacijos ir nukleozidų analogai.....	17
1.2.1. RNR nukleozidų modifikacija ir modifikacijų pašalinimas	18
1.3. 2'-O-metilnukleozidai ir jų biologinė reikšmė	19
1.3.1. Biologinis RNR 2'-O-metilinimas.....	20
1.3.2. <i>E. coli</i> tRNR 2'-O-metilinimas	23
1.3.3. 2'-O-metilnukleozidus degraduojantys fermentai	24
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	25
2.1. Medžiagos	25
2.1.1. Reagentai	25
2.1.2. Mitybinės terpės	26
2.1.3. Buferiniai tirpalai	26
2.1.4. Plazmidės, vektoriai ir bakteriniai kamienai	26
2.1.5. Prietaisai	28
2.2. Metodai	29
2.2.1. Elektrokompetentinių <i>Escherichia coli</i> ląstelių ruošimas	29
2.2.2. Bakterijų transformacija elektroporacijos metodu	29
2.2.3. Demetilazių aktyvumo nustatymas <i>in vivo</i>	29
2.2.4. Rekombinantinių baltymų sintezė <i>Escherichia coli</i> ekspresijos kamienuose	30
2.2.5. Beląstelinio ekstrakto ruošimas.....	30
2.2.6. Rekombinantinių baltymų gryninimas	30
2.2.7. Baltymų elektroforezė	31
2.2.8. Baltymų koncentracijos nustatymas.....	31
2.2.9. 2'-O-metil-5-metilцитидино monofosfato fermentinė sintezė.....	31
2.2.12. 2'-O pozicijoje modifikuotų nukleozidų fermentinio aktyvumo nustatymas	32
2.2.13. Tandeminė aukšto efektyvumo skysčių chromatografija ir masių spektrometrija	32

2.2.14.	<i>E. coli</i> tRNR skyrimas.....	32
2.2.15.	Nukleorūgščių elektroforezė agarozės gelyje.....	33
2.2.16.	Nukleorūgščių elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje	33
2.2.17.	Nukleorūgščių žymėjimas radioaktyviu ³² P izotopu	33
2.2.18.	Baltymų sąveikos su nukleorūgštimis tyrimas elektroforetinio poslinkio metodu....	34
2.2.20.	Fitanoil-KoA hidroksilinimo nustatymas	34
2.2.21.	Skaitinių duomenų apdorojimas ir grafikų braižymas.....	35
3.	REZULTATAI	36
3.1.	FJS oksigenazės aktyvumo tyrimai	36
3.1.1.	Divalentčių metalo jonų, buferio prigimties ir pH įtaka FJS demetilazės aktyvumui..	39
3.1.2.	FJS optimalios veikimo temperatūros ir termostabilumo matavimas	41
3.1.3.	FJS substratinio specifiškumo kiekybinis įvertinimas	43
3.1.4.	FJS demetilazės kinetiniai tyrimai	44
3.2.	FJS demetilazės homologų atranka ir tyrimas.....	45
3.2.1.	FJS, PHYA, PHYF ir PHYP sekų palyginimas su žinomos struktūros baltymais.....	46
3.2.2.	Nuo α-ketoglutarato ir Fe(II) jonų priklausomų oksigenazių filogenetinis medis	48
3.2.3.	PHYA, PHYF ir PHYP fermentų aktyvumo tyrimas <i>in vivo</i>	50
3.2.4.	Rekombinantinių PHYA, PHYF ir PHYP aktyvumo tyrimas <i>in vitro</i>	51
3.3.	2'-O-metilnukleozidų demetilazių sąveikos su nukleorūgštimis tyrimas	54
3.3.1.	FJS ir PHYF sąveikos su <i>E. coli</i> tRNR tyrimas 2 % agarozės gelyje	54
3.3.3.	FJS, PHYA, PHYF ir PHYP EMSA analizė su žymėtomis tRNR	57
3.3.4.	FJS, PHYA ir PHYF demetilazių aktyvumo tyrimas su tRNR	59
4.	REZULTATŲ APTARIMAS.....	60
	Darbo išvados.....	61
	Santrauka.....	62
	Summary	63
	Padėka	64
	Literatūros sąrašas	65
	1 priedas.	70
	2 priedas	71
	3 priedas	72

Santrumpos

DCEP	–	dietilpirokarbonatas
DTT	–	ditiotreitolis
EDTA	–	etilendiamintetraacetatas
Fitanoil-KoA	–	kofermento A 3,7,11,15-tetrametilheksadekanoatas
HEPES	–	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfoninė rūgštis
HPLC-MS	–	aukšto efektyvumo skysčių chromatografija ir masių spektrometrija
IPTG	–	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozidas
KP	–	kalio fosfatas
NR	–	nukleorūgštys
PMSF	–	fenilmetilsulfonilfluoridas
TAE	–	buferis su Tris, acetato anijonais ir EDTA
TBE	–	Tris, boro rūgšties ir EDTA buferis
TCEP	–	tris(2-karboksietil)fosfinas
TEMED	–	tetrametiletildiaminas
TLC	–	plonasluoksnė chromatografija
Tris	–	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
UV	–	ultravioletinė šviesa
α -KG	–	α -ketoglutaratas

IVADAS

Nuo XX amžiaus 7-tojo dešimtmečio, kai buvo atrastos ir charakterizuotos trys nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazės, žinios apie šią fermentų šeimą gerokai išsiplėtė. Šiuo metu Interpro duomenų bazėje (Blum ir kt., 2021) identifikuojama apie 138 tūkstančius šiai oksigenazių superšeimai priskiriamų baltymų sekų, taip pat daugėja žinių apie funkcinę nuo α -KG ir Fe(II) jonų priklausomų oksigenazių įvairovę. Žinoma, kad nuo α -KG ir Fe(II) jonų priklausomos oksigenazės dalyvauja visuose molekulinės organizmo genetinės informacijos perdavimo etapuose, kontroliuodamos chromatino modifikacijas, iRNR transkripciją, demetilinimą ir splaisingą, taip pat modifikuodamos tRNR, translacijos faktorius, ribosomas ir kitus baltymus (apžvelgta Herr ir Hausinger, 2018). Šios šeimos oksigenazės taip pat dalyvauja ląstelės metabolitų biosintezėje ir priešingame, neretai mažiau dėmesio sulaukiančiame procese – biologinių junginių katabolizme.

Daugelis, jei ne visi, biologinės kilmės junginiai ir medžiagos yra skaidomos kurio nors iš gausybės mikroorganizmuose randamų skirtingų genų koduojamo fermento. Prokariotiniai organizmai pasižymi milžiniška dar nepakankamai ištirta genetinė įvairove, kurios pažinimą ir biotechnologinį pritaikymą riboja tai, kad dauguma aplinkoje randamų mikroorganizmų kultivavimo būdų dar neatrasti. Vienas iš šio ribojimo įveikimo būdų yra metagenominių bibliotekų konstravimas ir funkcinis tikrinimas. Būtent šiuo būdu, vykdant 2'-O-metilnukleozidų biodegradacijoje dalyvaujančių genų ir jų koduojamų baltymų paiešką, buvo atrasta šiame darbe nagrinėjama nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausoma 2'-O pozicijoje modifikuotų nukleozidų demetilazė FJS.

Pagal centrinę molekulinės biologijos dogmą, gyvų organizmų genetinės informacijos srautuose pagrindinę vietą užima didelės molekulinės masės polimerai, sudaryti iš 3',5'-fosfodiesteriniu ryšiu sujungtų nukleotidų, vadinamų nukleorūgštimis. Genetinės informacijos saugojimui svarbiausios chemiškai stabilesnės deoksiribonukleorūgštys (DNR), o perdavimui (transkripcijai) – ribonukleorūgštys (RNR), kurios pasižymi didesne funkcine ir struktūrine įvairove. Galima išskirti dvi svarbiausias šios įvairovės priežastis – tai RNR ribozėje esanti 2' hidroksilo grupė bei didesnis RNR nukleozidų modifikacijų kiekis ir rūšių skaičius. Žinoma maždaug 170 skirtingų RNR nukleozidų modifikacijų (MODOMICS duomenų bazė, Boccaletto ir kt., 2018), iš kurių dažniausiai pasitaikanti yra 2'-O-metilinimas. Metilo grupės nukleozido 2'-O pozicijoje yra randamos transportinėje, ribosominėje, informacinėje bei mažose nekoduojančiose RNR (Ayadi ir kt., 2019). Ir, nors skirtingai nei daugumos kitų,

2'-O-metilo grupės modifikacijos atveju pakeičiama ne heterociklinės bazės, o ribozės cheminė sudėtis, tai vis vien pakeičia kai kurias RNR savybes, pavyzdžiui, stabilumą ir struktūrą, šios modifikacijos sutrikimai taip pat yra siejami su ligomis (Dimitrova ir kt., 2019). Dėl šios priežasties fundamentiniai baltymų, potencialiai susijusių su šia RNR modifikacija, tyrimai yra aktualūs. RNR 2'-O modifikacijas pašalinantys fermentai taip pat yra perspektyvus biotechnologinis įrankis, kuris galėtų būti panaudotas RNR žymės 2'-O pozicijoje pašalinime.

Daugelio modifikuotų bazių, nukleozidų ir nukleotidų biosintezės keliai yra gerai žinomi ir išnagrinėti, tačiau neišsamus šių junginių katabolizmo supratimas, net tarp gerai ištirtų organizmų, yra kliūtis kitų fermentų funkcijos priskyrimui. Iki šiol literatūroje nėra aprašytų fermentų, kurie katalizuotų 2'-O-metilnukleozidų demetilinimą 2'-O pozicijoje. Dėl šios priežasties mano bakalauro darbo tyrimų metu atrasta FJS demetilazė, vykdanči nukleozidų metilo ar alilo grupės pašalinimą 2'-O pozicijoje, yra unikalus fermentas. Todėl šio **darbo tikslu** pasirinkta tęsti nuo α -ketoglutatarato ir geležies(II) jonų priklausomos FJS demetilazės savybių tyrimą bei plėsti panašų aktyvumą turinčių oksigenazių biblioteką.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti nuo α -ketoglutatarato ir geležies(II) jonų priklausomos FJS demetilazės termostabilumą, optimalią veikimo temperatūrą ir pH bei kiekybiškai nustatyti šio fermento substratinį specifiskumą.
2. Patikrinti, ar atrinkti FJS demetilazės homologai skaido 2'-O-metilnukleozidus bei palyginti FJS demetilazės ir išgrynintų rekombinantinių homologinių baltymų aktyvumą *in vitro*.
3. Nustatyti, ar FJS demetilazė ir atrinkti homologiniai baltymai sąveikauja su nukleorūgštimis.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių superšeima

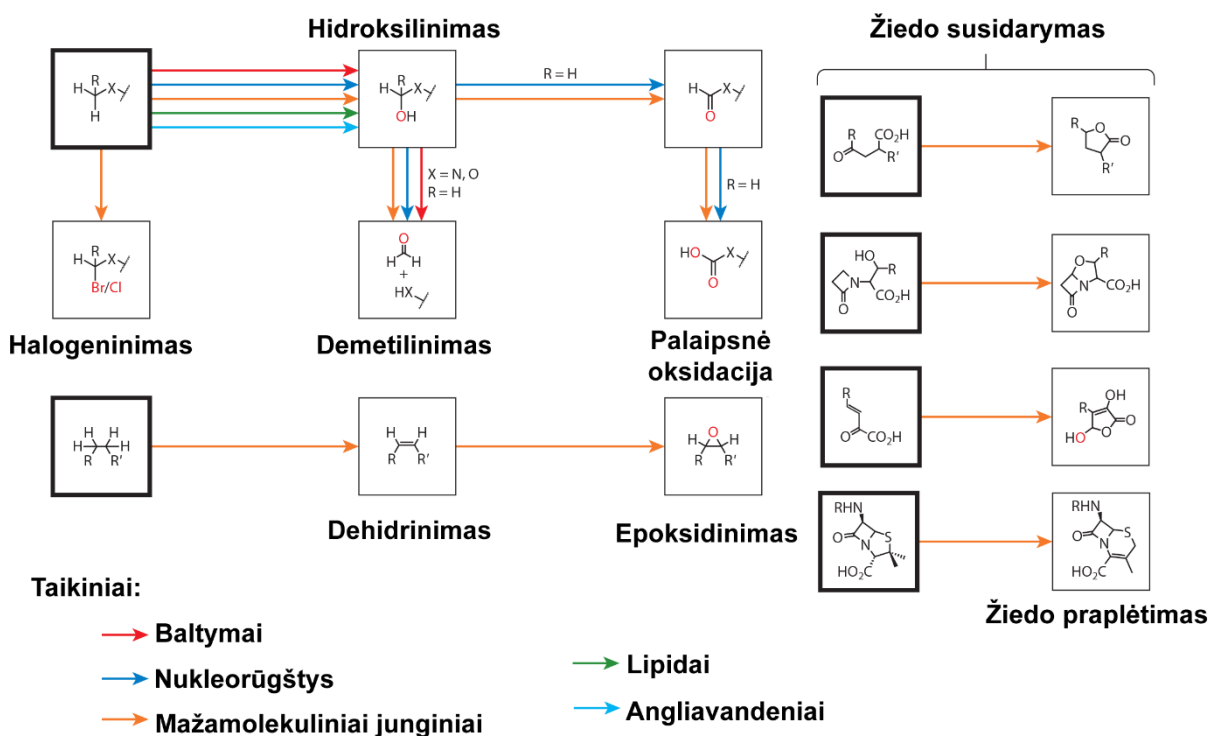
Nuo α -ketoglutarato priklausomos oksigenazės (EC 1.14.11) yra neheminių divalentį geležies katijoną aktyviajame centre turintys fermentai, aptinkami prokariotinėse, archėjinėse bei eukariotinėse ląstelėse ir dalyvaujantys daugelyje biosintezės bei katabolizmo reakcijų. Šiai fermentų superšeimai būdinga tai, kad jų katalitiniame aktyvumei oksidacijos molekulinio deguonimi ar halogeninimo reakcijose dalyvauja aktyviajame centre esantis Fe(II) katijonas, o be pirminio substrato papildomai reikalingas α -ketoglutaratas (α -KG), kuris reakcijos metu yra dekarboksilinamas. Dekarboksilinant α -ketoglutaratą susidaro sukcinatas bei anglies dioksidas, todėl daugumos šios šeimos oksigenazių katalizuojamų reakcijų bendra lygtis (ar bent pirmasis jos žingsnis) gali būti užrašomas taip:



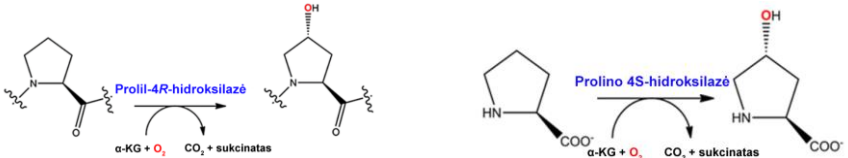
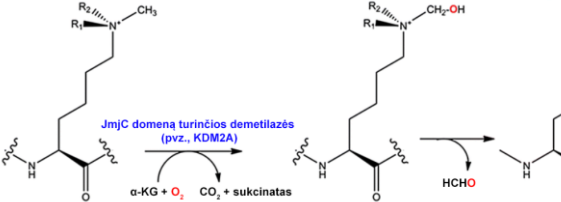
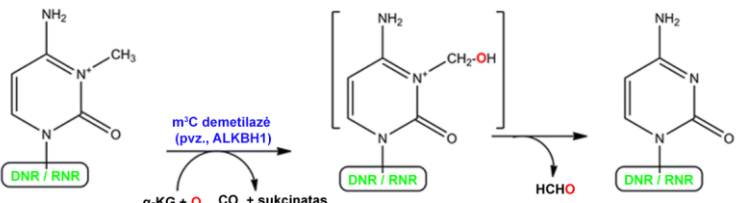
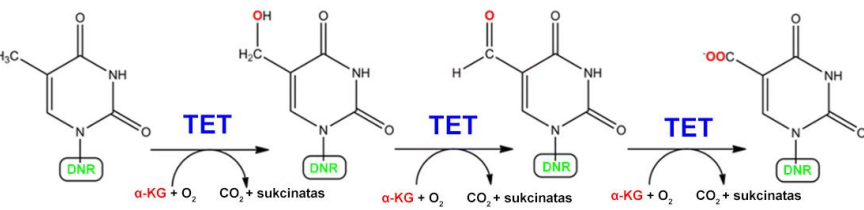

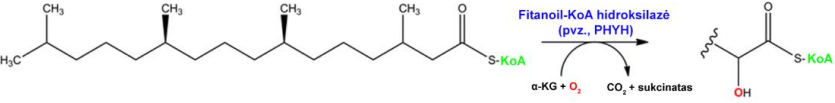
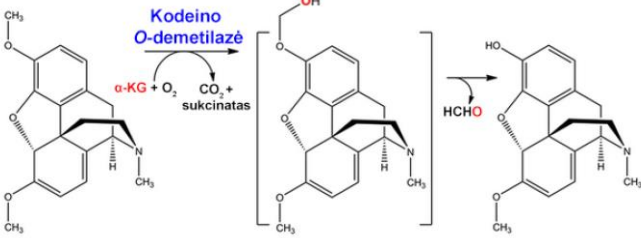
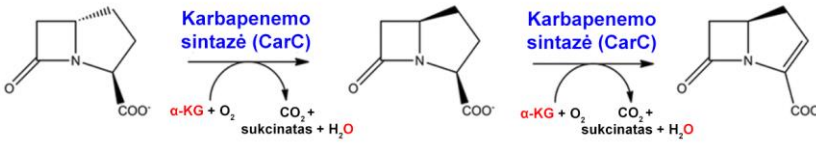
Kaip jau minėta, nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių šeima pasižymi plačiu katalizuojamų reakcijų tipų spektru (apžvelgta Islam ir kt., 2018). Šių fermentų katalizuojamų reakcijų pavyzdžiai apima hidroksilinimą, halogeninimą, ciklinių junginių susidarymą ir praplėtimą, metilo grupių pašalinimą (susidarant formaldehidui), atomų persitvarkymą molekulėse, taip pat dehidrinimo, epimerizacijos ar ryšio tarp anglies atomų nutraukimo ir kitas reakcijas (**1.1 pav.**). Tiesa, reikėtų paminėti, kad gyvūnuose (tarp jų ir žmonėse) žinomos tik α -KG-Fe(II) oksigenazių katalizuojamos C-H jungčių hidroksilinimo bei *N*-metilo grupių demetilinimo reakcijos (McDonough ir kt., 2010). Vis dėlto, turint omenyje šių fermentų katalizuojamų reakcijų cheminį įvairiapusiškumą, nenuostabu, kad nuo α -KG ir Fe(II) priklausomos oksigenazės taip pat pasižymi modifikuojamų substratų, svarbių skirtingoms biologinėms funkcijoms, gausa (pavyzdžiai pateikti **1.1 lentelėje**). Modifikuojamų substratų gausa randama tiek prokariotiniuose, tiek ir eukariotiniuose organizmuose, ypač augaluose, kur nuo α -KG ir Fe(II) priklausomos oksigenazės dalyvauja antrinių metabolitų biosintezėje (apžvelgta Kawai ir kt., 2014). Nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomos oksigenazės taip pat yra svarbi ląstelės informacijos perdavimo grandinės (DNR \rightarrow RNR \rightarrow baltymai) reguliacijos dalis, pavyzdžiui, šios superšeimos baltymai reguliuoja hipoksijos indukuojamo faktoriaus (HIF) transkripcijos centrą, vykdo DNR reparaciją, dalyvauja epigenetinėje ir epistranskriptomineje reguliacijoje vykdydami histonų demetilinimą, DNR ir RNR modifikacijų pašalinimą, ir yra būtini kitiems gyvybiškai svarbiems procesams,

pavyzdžiui, posttransliaciniam įvairių baltymų ir peptidinių antibiotikų prolilo grupių hidroksilinimui (apžvelgta Herr ir Hausinger, 2018; Islam ir kt., 2018).

Nustatyta, kad, be α -ketoglutarato, daugelio α -KG-Fe(II) oksigenazių kataliziniam aktyvumui taip pat reikalingas ir askorbatas, nors gali būti naudojami ir kiti redukuojantys agentai, pavyzdžiui, ditiotreitolis, tris(2-karboksietil)fosfinas ar 5,6,7-trihidroksiflavonas, (Khan ir kt., 2020). Askorbato reikšmę nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių veiklai puikiai iliustruoja kolageno prolilo grupių 4-hidroksilazės (CP4H) aktyvumas: esant vitamino C trūkumui, sumažėja šio fermento aktyvumas, tad sumažėja ir kolageno struktūrą stabilizuojančio hidroksiprolino kiekis, todėl pasireiškia skorbuto simptomai (Myllylä ir kt., 1978). Manoma, kad askorbatas α -KG-Fe(II) oksigenazėms reikalingas kaip kofaktorius, padedantis palaikyti aktyviajame centre esantį geležies katijoną divalentėje būsenoje – oksigenazės, aktyviajame centre turinčios trivalentį geležies katijoną, nebėra aktyvios.



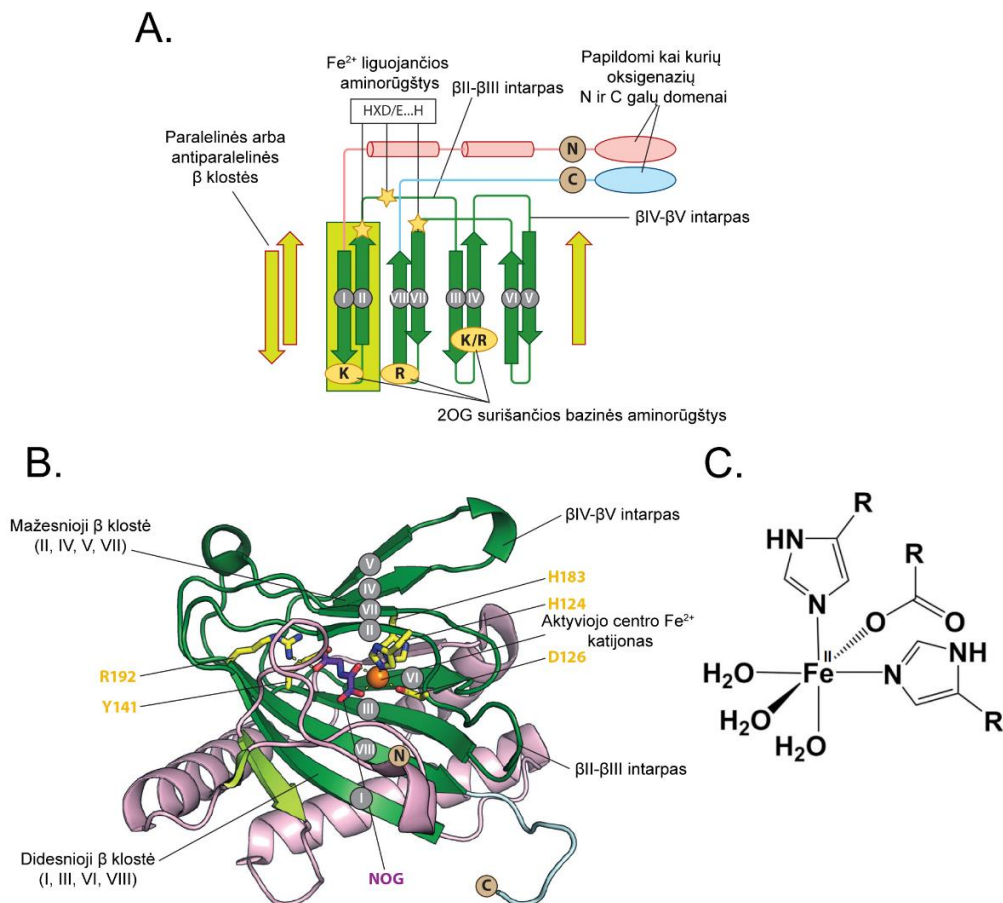
1.1 pav. Nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių katalizuojamų reakcijų schematinė apžvalga (modifikuota iš Islam ir kt., 2018).

Funkcija	Pavyzdžiai
Baltymų (pvz., kolageno) ar pavienių aminorūgščių hidroksilinimas	
Baltymų (pvz., histonų) demetilinimas	
RNR ir DNR demetilinimas	
RNR ir DNR hidroksilinimas ir palaipsnė oksidacija	
Pavienių nukleobazių ir nukleozidų hidroksilinimas	
Lipidų metabolizmas	
Augalų antrinių metabolitų (flavonoidų, alkaloidų, giberelinų ir kt.) biosintezė	
Antibiotikų biosintezė	

1.1 lentelė. Nuo α -KG ir Fe(II) priklausomų oksigenazių biologinės funkcijos ir konkrečių katalizuojamų reakcijų pavyzdžiai (parengta pagal Hausinger, 2015).

1.1.1. Nuo α -KG ir Fe(II) priklausomų oksigenazių struktūriniai ypatumai

Nors katalitiškai ir įvairios, nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomos oksigenazės tarpusavyje yra susijusios konservatyviu struktūriniu motyvu. Šios šeimos baltymų erdvinės struktūros kristalografiniai tyrimai rodo, kad nuo α -KG ir Fe(II) priklausomos oksigenazės pasižymi konservatyviu iš β klosčių sudarytos dvigrandininės spiralės (angl. *DSBH* – *double stranded β helix*) erdvinės struktūros motyvu. Šioje konservatyvioje *DSBH* struktūroje yra fermento aktyvusis centras (**1.2 pav. A, B**), o tarp β klosčių esantys β II- β III bei β IV- β V intarpai kai kuriose α -KG-Fe(II) oksigenazėse svarbūs sąveikaujant su specifiniu substratu (Clifton ir kt., 2006).



1.2 pav. Nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių struktūriniai motyvai:

A. Bendra nuo α -KG/Fe(II) priklausomų oksigenazių dviejų dimensijų topologija (Islam kt., 2018).

B. Tridimensė nuo α -KG/Fe(II) oksigenazės PPHD iš *Pseudomonas putida* struktūra (PDB ID:4IW3), NOG – N-oksalilglicinas (Islam ir kt., 2018).

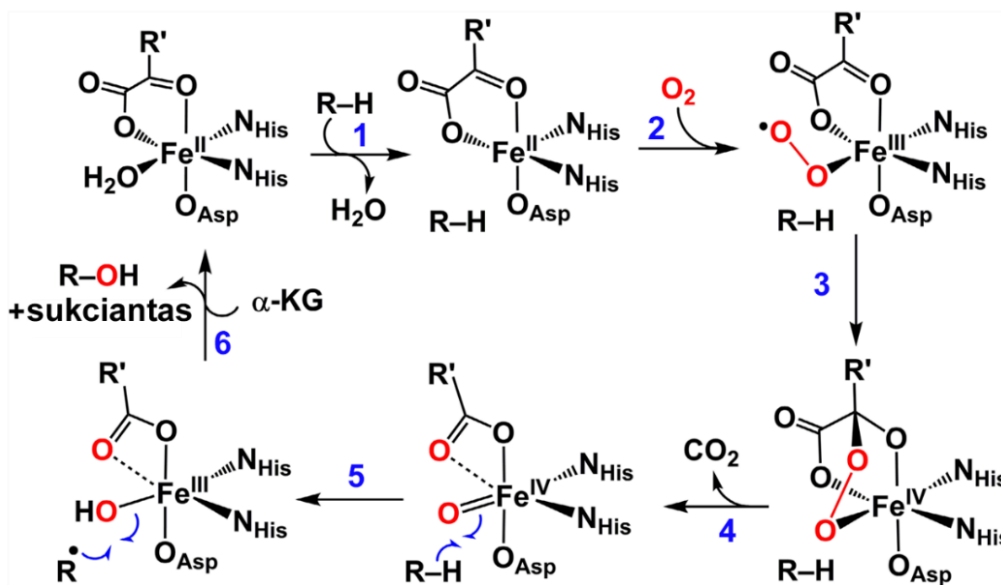
C. Nuo α -KG/Fe(II) priklausomų oksigenazių facialinės triados (His-X-Asp/Glu...His) struktūrinė formulė.

Daugumos nuo α -KG ir Fe(II) priklausomų oksigenazių aktyviuosiuose centruose geležies(II) joną kompleksuoja trijų aminorūgščių šoninės grandinės – karboksilatas iš aspartato ar glutamato ir dviejų histidinių imidazolai (**1.2 pav. C**). Toks His-X-Asp/Glu...His struktūrinis motyvas vadinamas facialine triada. α -KG oksigenazių halogenazėse facialinė triada skiriasi nuo randamų šios fermentų šeimos oksigenazėse: Asp/Glu būna pakeisti alaninu arba glicinu, o vietoje karboksilato randamas Fe(II) koordinuojamas halido jonas (Blasiak ir Drennan, 2008).

Dažniausiai α -KG-Fe(II) oksigenazės būna monomerinės arba dimerinės formos, o dimerizacijoje gali dalyvauti tiek N galo, tiek ir C galo terminaliniai domenai. Žinomos ir oksigenazės, kurių dimerizacijoje dalyvauja β IV- β V intarpas (apžvelgta Aik ir kt., 2015).

1.1.2. Nuo α -KG ir Fe(II) priklausomų oksigenazių veikimo mechanizmas

Pirmasis pakankamai tikslus α -KG oksigenazių veikimo mechanizmas buvo pasiūlytas dar 1982 m., aprašant kolageną veikiančios prolil-4-hidroksilazės aktyvumą (Hanuske-Abel ir Günzler, 1982). Vėliau šis reakcijos mechanizmas buvo pritaikytas aiškinant ir kitų šios šeimos fermentų aktyvumus (**1.3 pav.**) bei patvirtintas įvairių nuo α -KG priklausomų oksigenazių tyrimais (Bollinger ir kt., 2015).



1.3 pav. Nuo α -KG ir Fe(II) priklausomų oksigenazių mechanizmas (Kal & Que, 2017). Tekste išskirti reakcijos etapai pažymėti mėlynais skaičiais. R' pažymėta α -KG $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ liekana.

Galima išskirti tokius α -KG oksigenazių vykdomos hidroksilinimo reakcijos etapus:

1) prie aktyviojo centro, kuriame yra divalentės geležies katijonas su dviem ryšiais prisijungusiu bidentatiniu ligandu α -ketoglutaratu (**1.4 pav. A**), prisijungia substratas, dėl to nuo aktyviojo centro Fe(II) katijono disocijuoja viena H₂O molekulė (**1.4 pav. B**);

2) prie facialinės triados aminorūgščių liekanų, Fe(II) ir α -KG komplekso prisijungia molekulinis deguonis, susidaro Fe-O₂ tarpinis kompleksas;

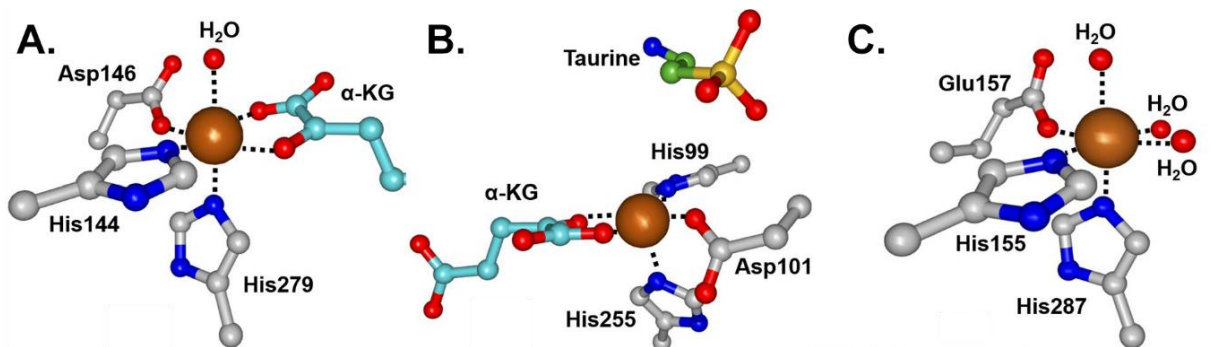
3) nekoordinuojamasis deguonies atomas vykdo nukleofilinę ataką į α -ketoglutarato C2 atomą, susidaro tarpinis biciklinis junginys;

4) α -ketoglutaratas dekarboksilinamas – atsikyla CO₂ molekulė, ryšys tarp O₂ atomų nutrūksta ir geležis tampa keturvalentė – susiformuoja tarpinis Fe(IV)=O kompleksas;

5) Fe(IV)=O tarpinis junginys nutraukia taikinio C-H ryšį, susidaro Fe(III) ir hidroksido kompleksas bei substrato radikalas;

6) katalitinio ciklo pabaiga: hidroksilo radikalas nueina nuo Fe(III), susidaro hidroksilintas produktas. Produktas disocijuojasi ir regeneruojamas Fe(II) aktyvusis centras, prie kurio vėl gali jungtis α -ketoglutaratas (**1.4 pav. C**).

Nuo α -KG ir Fe(II) priklausomų demetilazių atveju, kai hidroksilinamas substrato anglies atomas būna sudaręs ryšį su azoto ar deguonies heteroatomu (pvz., **1 pav.** pateiktų AlkB katalizuojamų reakcijų metu), pirminis reakcijos produktas degradoja, susidaro papildomas produktas – formaldehido molekulė.



1.4 pav. Nuo α -ketoglutarato ir Fe(II) jonų priklausomų hidroksilazių aktyviųjų centrų struktūra katalitinio ciklo metu (Kal ir Que, 2017):

A. Klavaminato sintazės (CAS) aktyviojo centro Fe(II) katijono ir α -KG kompleksas su viena prisijungusia H₂O molekule (PDB ID: 1DS1).

B. Taurino hidroksilazės (TauD) kompleksas su α -KG ir substratu taurinu, be prisijungusių H₂O molekulių (PDB ID: 1GQW).

C. Asparagino oksigenazės (AsnO) aktyviojo centro Fe(II) su 3 prisijungusiomis H₂O molekulėmis (PDB ID: 2OG6).

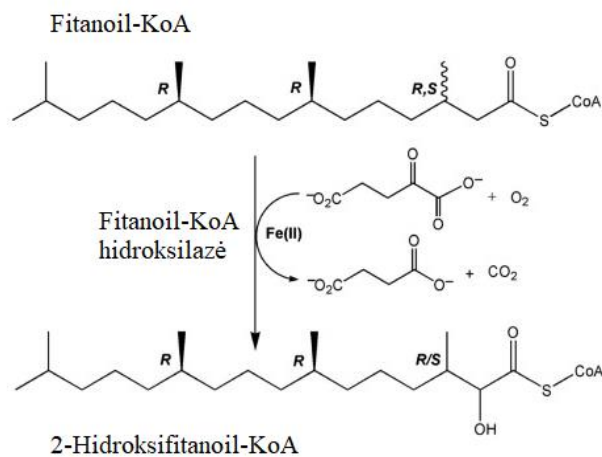
Išgrynintos nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomos oksigenazės neretai yra jautresnės aplinkos poveikiui nei dauguma kitų gryninamų fermentų. Taip yra todėl, kad šios baltymų šeimos oksigenazių aktyvumo praradimas šalia įprastų priešasčių vyksta ir dėl divalentės geležies oksidacijos iki trivalentės formos (arba visiško Fe(II) praradimo fermento aktyviajame centre) bei katalizei reikalingų aminorūgščių šoninių grupių autooksidacijos (apžvelgta Mantri ir kt., 2012). α -KG-Fe(II) oksigenazėse vykstančią autooksidaciją iliustruoja Liu et al., 2001 pateiktas pavyzdys: išgrynintos 2,4-dichlorofenoksiacetato oksigenazės (TfdA) katalizuojamos reakcijos metu dėl sąveikos su deguonimi hidroksilinama paties fermento triptofano (Trp112) liekana. Šios reakcijos metus susidaro šalutinis produktas HO-Trp112, kuris koordinaciniu ryšiu susijungia su geležies trivalenčiu jonu – fermentas praranda aktyvumą ir įgauna mėlyną spalvą. Šio tyrimo metu po sąveikos su deguonimi TfdA oksigenazė nevykdė fermentinės reakcijos net ir reakcijos mišinį papildžius askorbatu bei α -ketoglutarato pertekliumi. Dalinis TfdA aktyvumas (~60 %, lyginant su pradiniu) buvo atkurtas fermentą paveikus reduktoriumi ditionitu, fermentas tapo dar aktyvesnis (~81 % aktyvumas, lyginant su pradiniu) po redukcijos ditionitu baltymą papildomai dializavus su EDTA ir painkubavus su Fe(II) jonais.

Panašiai vykstančia autooksidacijos reakcija taip pat pasižymi ir metilintas DNR bei RNR bazes demetilinantis fermentas AlkB. Kai ši oksigenazė inkubuojama be pirminio substrato, o tik su Fe(II) katijonais, α -ketoglutaratu, hidroksilinamas oksigenazės triptofanas Trp178 ir, kaip ir TfdA atveju, dėl hidroksitriptofano koordinacinio ryšio su Fe(III) katijonu, baltymas tampa neaktyviu mėlynos spalvos chromoforu (Henshaw ir kt., 2004).

Nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių katalitinę efektyvumą *in vitro* mažina dar ir tai, kad neprisijungę substrato fermentai vykdo šalutinę α -ketoglutarato dekarboksilinimo reakciją. Šis aktyvumas turi ypač daug įtakos reakcijos išėigai tada, kai arba reakcijos mišinyje nėra pakankamai pirminio substrato, arba esamas substratas nėra pakankamai giminingas oksigenazei (Luo ir kt., 2006). Tai trukdo norint nustatyti α -KG oksigenazių katalizuojamos fermentinės reakcijos konstantas matuojant reakcijos eigą netiesiogiai, tai yra, žiūrint ne specifinio substrato mažėjimą ar produkto susidarymą, bet matuojant α -ketoglutarato ar deguonies suvartojimą arba sukcinato ar anglies dioksido susidarymą reakcijos mėginyje.

1.1.3. Biodegradacijoje dalyvaujančios nuo α -KG ir Fe(II) priklausomos oksigenazės

Dėl gebėjimo į junginius įvesti deguonies atomą ir taip nutraukti termodinamiškai stiprų C-H ryšį ir aktyvuoti anglies atomą tolesnėms reakcijoms, nuo α -KG ir Fe(II) priklausomos oksigenazės dalyvauja ląstelėje skaidant junginius, kurie yra reikalingi ląstelės procesų reguliavimui (aprašyta 1.2.1 poskyryje) arba tolesniam šių junginių katabolizmui ir jų įtraukimui į kitų junginių biosintezę (apžvelgta Herr ir Hausinger, 2018). Pavyzdžiui, žmogaus organizme vykstančiame katabolizme svarbią funkciją atlieka nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausoma fitanoil-KoA hidroksilazė PhyH.



1.5 pav. PhyH katalizuojama fitanoil-KoA hidroksilinimo reakcija (McDonough ir kt., 2005).

Fitanoil-KoA hidroksilazė (PAHX, PhyH) yra lokalizuota žmogaus ląstelių peroksisomose, kur dalyvauja fitano rūgšties katabolizme. Fitano rūgštis struktūriškai panaši į kitas riebalų rūgštis, tačiau negali būti skaidoma β -oksidacijos keliu dėl šios molekulės struktūroje esančios 3-metilo grupės. Todėl pirmame fitano rūgšties skaidymo žingsnyje šis junginys yra aktyvuojamas prijungiant kofermentą A, susidarant fitanoil-KoA molekulei, kurios C2 atomą toliau hidroksilina PHYH oksigenazė (**1.5 pav.**). Šio fermento veikimui, kaip ir kitų nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių atveju, reikalingas α -ketoglutaratas bei molekulinis deguonis, reakcijos metu be pagrindinio produkto susidaro ir sukcinatas bei anglies dioksidas (McDonough ir kt., 2005). Tinkamas PhyH hidroksilazės veikimas yra gyvybiškai svarbus žmogaus organizmui – dėl mutacijų PhyH koduojančiame gene ir šių mutacijų sukulto fitano rūgšties kaupimosi organizme pasireiškia Refsumo sindromas, kurio simptomai yra tremoras, kurtumas ir periferinė neuropatija (Mukherji ir kt., 2001).

1.1.4. Nuo α -KG ir Fe(II) priklausomų oksigenazių aktyvumo tyrimai ir biotechnologinis pritaikymas

Kaip minėta praeitame poskyryje, dėl α -KG oksigenazių katalizuojamoms fermentinėms reakcijoms reikalingų papildomų substratų ir iš jų susidarančių produktų galimi universalūs šios fermentų šeimos tyrimo metodai, iš kurių, bendru atveju, dažniausiai pritaikomi matuojant radioaktyviais izotopais pažymėto CO₂ ar sukcinato susidarymą, taip pat nustatant likusio α -ketoglutarato kiekį, pavyzdžiui, vykdant jo reakciją su *o*-fenilendiaminu, ar suvartoto deguonies kiekį, o demetilazių atveju – nustatant susidariusio formaldehido kiekį (apžvelgta Rose ir kt., 2011). Taip pat galima vykdyti ir kaskadines reakcijas su kitais fermentais, pavyzdžiui, sukcinato dehidrogenazę ar sukcinil-KoA sintetazę kartu su piruvato kinase ir laktato dehidrogenaze, ir tada tiriant jau šių reakcijų produktus. Taip pat hidroksilintus ar demetilintus specifinius reakcijos produktus galima nustatyti masių spektrometrijos, branduolių magnetinio rezonanso ar antikūniais paremtais metodais – žinoma, taip nustatomas tikslesnis fermento aktyvumas, kadangi nevertinamas šalutinių reakcijų indėlis į susidariusio sukcinato ar CO₂ kiekį.

Nuo α -KG ir Fe(II) oksigenazės pasižymi sudėtingesnėmis tyrimo metodikomis už daugelį kitų baltymų: dažnai būna nestabilios *in vitro*, jų aktyvumui reikalingi papildomi substratai. Nepaisant to, šios šeimos oksigenazės, kaip ir oksigenazės bendrai, yra patrauklios biotechnologiniam pritaikymui. Oksigenazės patrauklios, nes naudojamos molekulinę deguonį oksiduoja chemiškai įprastai inertiškus C-H, C=C ryšius, taip pat gali oksiduoti specifinius heteroatomus, nepakeičiant likusios molekulės struktūros. Termodinamiškai stiprių C-H ryšių oksidacija yra sudėtingas iššūkis organinės chemijos mokslui, ypač kai norima reakcijas vykdyti chemo-, regio- ir stereoselektyviai negaunant šalutinių produktų, o pradinis substratas yra sudėtingos molekulinės struktūros. Taip pat reakcijos metu reikalinga ne vien C-H ryšio, bet ir O₂ molekulės aktyvacija, o šiam tikslui naudojami reagentai po reakcijos gali būti sunkiai utilizuojami ar ekologiškai žalingi (Roduner ir kt., 2013). α -KG oksigenazės gali būti pritaikytos ne tik mažo mastelio struktūriškai sudėtingų molekulių sintezei, bet ir pramoninio masto organinių junginių sintezei, dažniausiai kaip pradinius junginius naudojant aminorūgštis, pavyzdžiui, *cis* bei *trans* 3 ir 4-hidroksiprolinų stereospecifinei sintezei (apžvelgta Peters ir Buller, 2019).

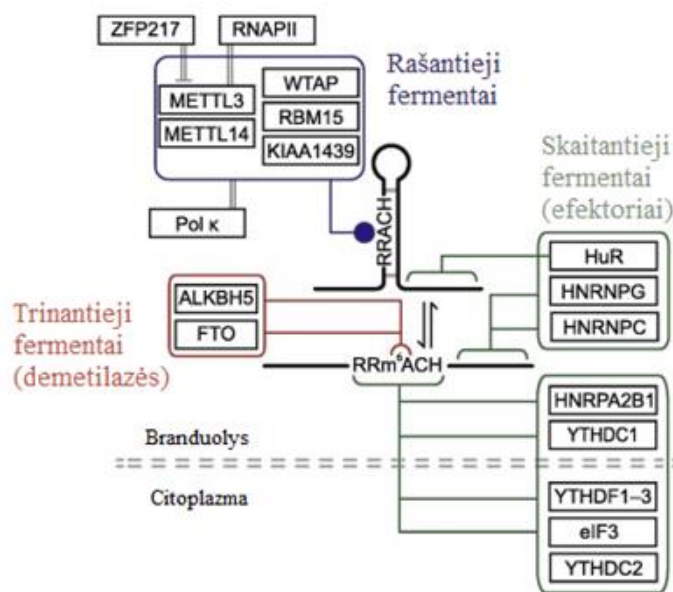
1.2. Nukleozidų modifikacijos ir nukleozidų analogai

Vykdamas deoksiribonukleorūgščių (DNR) ar ribonukleorūgščių (RNR) hidrolizę gaunama fosforo rūgštis ir smulkesni struktūriniai vienetai: RNR atveju gaunami ribonukleozidai, o DNR – deoksiribonukleozidai. DNR ir RNR šifruojamo universalus genetinis kodas neapsiriboja vien tik kanoniais nukleozidais. Šalia jų taip pat randami ir šį kodą praplečiantys heterociklinėse bazėse ar ribozės žiede modifikacijos turintys nukleozidai, kurie sudaro vis plačiau nagrinėjamų šakų – epigenetikos ir epitranskriptomikos – pagrindą. Kaip ir funkcijos bei struktūrų atveju, RNR pasižymi didesne modifikuotų nukleozidų įvairove – šiuo metu žinoma virš 150 skirtingų RNR randamų nukleozidų (MODOMICS duomenų bazė. Boccaletto ir kt., 2018).

Nukleorūgščių ir jų komponentų svarba biologinėms funkcijoms pasinaudojama kuriant chemiškai modifikuotus gamtoje randamų heterociklinių bazių, nukleozidų ar nukleotidų analogus ir juos pritaikant medicinoje bei biotechnologijoje. Citotoksiški nukleozidų ir nukleobazių analogai naudojami antivirusinėje ir priešvėžinėje terapijoje (apžvelgta Jordheim ir kt., 2013) ar kaip antibakteriniai junginiai (apžvelgta Thomson ir Lamont, 2019). Taip pat technologiškai pritaikomos ir nukleozidų modifikacijos, didinančios RNR ir DNR molekulių stabilumą, selektyvumą, atsparumą nukleazėms bei gerinančios farmakokinetines ir farmakodinamines savybes. Puikus to pavyzdys – iRNR vakcinas, kurių grandinėse uridinas pakeistas pseudouridinu, N1-metilpseudonuridinu bei 5-metilцитidinu, o 5' gale, kaip ir įprastai eukariotinėje iRNR, būna 7-metilgvanozinas, trifosfatu sujungtas su 2'-O-metilnukleozidu arba kitaip modifikuota 5' kepurėle (apžvelgta Chaudhary ir kt., 2021 ir Choi ir kt., 2018). Modifikuoti nukleozidai taip pat gali būti naudojami tiriant, sintetinant ir tobulinant aptamerų molekules (Diafa & Hollenstein, 2015). Aptamerai formuoja stabilias ir unikalias erdvines struktūras bei pasižymi dideliu giminingumu ir specifiskumu įvairioms taikinio molekulėms, pvz., baltymams, vaistams, gyvoms ląstelėms, mažoms organinėms ar neorganinėms molekulėms (Patel ir Suri, 2000; Sun ir Zu, 2015). Nors aptamerų pritaikymas apima jų panaudojimą nuo medicinos iki biotechnologijos, tačiau pagrindinės naudojimo sritys siejamos su klinicine terapija, pvz., aptamerai naudojami virusų ir bakterijų detekcijai, vėžinių žymenų aptikimui (Chang ir kt., 2013; Kiilerich-Pedersen ir kt., 2013; Rotherham ir kt., 2012).

1.2.1. RNR nukleozidų modifikacija ir modifikacijų pašalinimas

Išskiriamos trys fermentų grupės, dalyvaujančios epitranskriptomines informacijos srautuose: rašantieji fermentai (*writers*), kurie atlieka chemines modifikacijas, skaitantieji fermentai (*readers*), kurie turi specifinius domenus, dalyvaujančius atpažįstant šias modifikacijas, bei trinantieji fermentai (*erasers*), kurie pašalina šias chemines modifikacijas (apžvelgta Biswas ir Rao, 2018, ir Lewis ir kt., 2017). Epitranskriptominių valdymą galima iliustruoti remiantis labiausiai paplitusios ir genų ekspresijos reguliavimui svarbios eukariotinių ląstelių N^6 -metiladenozino (m^6A) modifikacijos žinduolių ląstelėse pavyzdžiu.



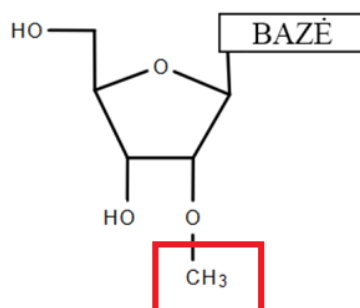
1.6 pav. iRNR adenzinų N^6 -metilinime ir demetilinime bei su šia modifikacija susijusioje genų ekspresijos reguliacijoje ir kituose biologiniuose procesuose dalyvaujantys baltymai (Batista, 2017).

iRNR adenzinų N^6 -metilinimą žmogaus organizme atlieka iš skirtingų baltymų sudarytas kompleksas, kurio branduolyje yra stabilus METTL3 ir METTL14 heterodimeras, su kuriuo sąveikauja heterodimero lokalizacijai ir efektyviam adenzino metilinimui reikalingas WTAP baltymas (Ping ir kt., 2014), su METTL3-METTL14 heterodimeru taip pat sąveikauja KIAA1429 (Schwartz ir kt., 2014) ir RBM15 (Patil ir kt., 2016) baltymai. Heterodimero METTL3 baltymas atlieka katalizinę funkciją – iRNR *RRACH* motyvo (kur *R* – G arba A, *H* – G, A arba C) adenzinų N^6 -metilinimą kaip metilo grupės donorą naudojant *S*-adenozilmetioniną. METTL14 metiltransferazės aktyvumu nepasižymi, o stabilizuoja heterodimero ir RNR sąveiką (Liu ir kt., 2014). N^6 -metilinimo kompleksas taip pat sąveikauja su RNR polimeraze II (Slobodin ir kt., 2017), UV sukeltų pažeidimų reparacijas vykdančia

DNR κ polimeraze (Xiang ir kt., 2017), o reguliuoti N^6 -metilinimą slopinant METTL3 aktyvumą gali ZFP217 baltymas (Aguilo ir kt., 2015). m^6A modifikaciją taip pat atpažįsta ir tolesnį modifikuotos iRNR likimą lemia bei reguliacines funkcijas atlieka efektoriniai baltymai, kurių dauguma savo struktūroje turi YTH domeną (apžvelgta He ir kt., 2019). Yra žinoma, kad žinduolių RNR (daugiausia iRNR) N^6 -metiladenozinai yra demetilinami ląstelės branduolyje dviejų nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių – FTO (Jia ir kt., 2011) bei AlkBH5 (Zheng ir kt., 2013). Abi šios oksigenazės yra *E. coli* randamos nuo α -KG ir Fe(II) priklausomos oksigenazės AlkB homologai ir yra susijusios su fiziologiniais pokyčiais: FTO – su žmonių antsvoriu, AlkBH5 – su pelių vaisingumu. N^6 -metiladenozino modifikaciją atliekantys, atpažįstantys ir pašalinantys fermentai pateikti **1.6 pav.**

1.3. 2'-O-metilnukleozidai ir jų biologinė reikšmė

2'-O-metilinimas yra po transkripcijos arba transkripcijos metu vykdoma RNR modifikacija, pridodant metilo grupę (-CH₃) prie ribozės 2' hidroksilo (-OH) grupės (**1.7 pav.**).



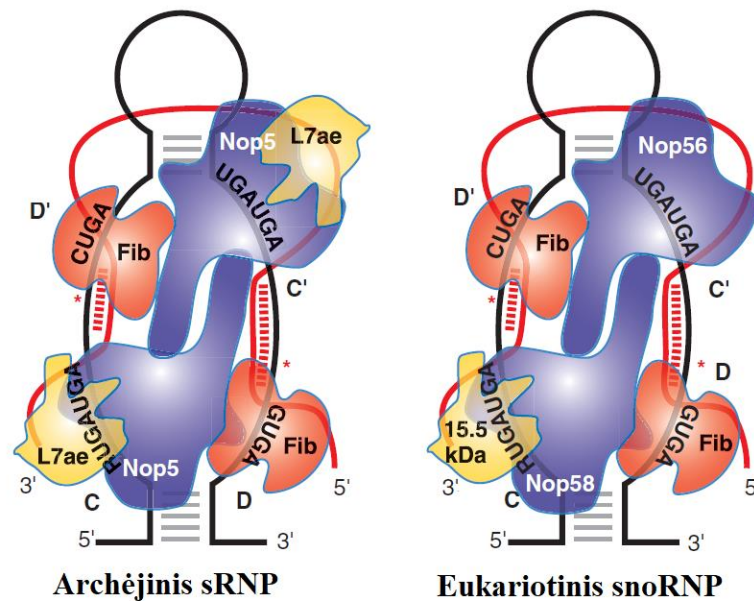
1.7 pav. Bendra 2'-O-metilnukleozidų struktūrinė formulė.

Tai yra viena iš dviejų plačiausiai paplitusių RNR modifikacijų, randama informacinėje, ribosominėje, transportinėje bei mažose nekoduojančiose (snRNR, snoRNR, siRNR, piRNR ir miRNR) ribonukleorūgštyse (MODOMICS duomenų bazė. Boccaletto ir kt., 2018). Kadangi, skirtingai nei daugumos kitų, šios nukleozidų modifikacijos atveju pakeičiama ne nukleozido bazės, o ribozės cheminė sudėtis, RNR 2'-O metilinimas tiesiogiai nekeičia kanoninio Watson-Crick bazių poravimosi, tačiau pakeičiamos kitos RNR savybės: 2'-O-metilribozė padidina RNR stabilumą (dėl to ši modifikacija ypač svarbi aukštose temperatūrose randamose ekstremofilinėse archėjose) bei turi įtakos RNR molekulių struktūrai ir RNR sąveikai su baltymų molekulėmis (Ayadi ir kt., 2019). 2'-O-metilo grupė, prisijungusi prie ribozės 2'-OH

pozicijos, stabilizuoja nukleozido ribozės C3'-endo konformaciją bei daro įtaką RNR antrinei struktūrai (Abou Assi ir kt., 2020). Taipogi, RNR su 2'-*O*-metilnukleozidais stabilumas, lyginant su nemodifikuota RNR, didesnis tiek RNR veikiant cheminiais reagentais (pvz., inkubacijos šarminėje terpėje metu ar vykdant reakciją su perjodato jonais, kai 2'-*O*-metilo grupė yra grandinės 3' gale), tiek veikiant kai kuriomis ribonukleazėmis (pvz., RNazei T2, RNazei H ar MgR – RNazių R šeimos narei). Atsparumas šarminiai terpei ir ribonukleazių veikimui atsiranda dėl žymiai mažesnio 2'-OCH₃ deguonies atomo nukleofiliškumo, o 2'-OCH₃ grupei esant RNR 3' gale, metilo grupė trukdo prie terminalinės ribozės prisijungti bidentatiniams oksidatoriams (pvz., perjodatui) ir taip pat mažina RNR ligazės ir poli(A) polimerazės efektyvumus. Taip pat 2'-*O*-metilo grupės mažina nuo RNR priklausomos DNR polimerazių (atvirkštinių transkriptazių) efektyvumą pratęsiant pradmenis, ypač esant žemoms deoksinukleozidų trifosfatų koncentracijoms. Šias 2'-*O*-metilintų RNR molekulių savybes ir jų pritaikymą nustatant 2'-*O*-metilnukleozidų vietą RNR grandinėje aprašė Motorin ir Marchand, 2018, bei Huang ir kt., 2016.

1.3.1. Biologinis RNR 2'-*O*-metilinimas

Nukleozidai su 2'-*O*-metilo grupėmis randami visuose trijuose gyvybės domenuose, tačiau skiriasi tai, kaip ši modifikacija gali būti atliekama. Tiek bakterijose, tiek archėjose, tiek ir eukariotinėse ląstelėse RNR ribozijų 2'-*O*-metilinimą atlieka pavieniui veikiančios metiltransferazės, o archėjose ir eukariotuose šią funkciją papildomai atlieka ir šiose ląstelėse randami C/D ribonukleoproteininiai kompleksai. Šios, kaip ir dauguma kitų metiltransferazių, kaip metilo grupės donorą naudoja SAM – *S*-adenozilmetioniną (apžvelgta Ayadi ir kt., 2019). C/D ribonukleoproteininiai (RNP) kompleksai yra sudaryti iš katalitinį aktyvumą turinčio subvieneto, kreipiančiosios snoRNR (*small nucleolar RNA* – mažosios branduolėlio RNR, eukariotuose) arba sRNR (*small RNA* – mažosios RNR, archėjose) ir struktūrinių baltymų. Eukariotinės ląstelės ar archėjinės ląstelės C/D ribonukleoproteininiai kompleksai atpažįsta RNR substratą dėl komplekse esančios mažosios nekoduojančios RNR sekos – čia randamos specifiniam taikiniui komplementarios 11-20 nukleotidų grandinės, kurių sekose yra C(5'-RUGAUGA-3') ir D(5'-CUGA-3') motyvai (**1.8 pav.**). Be kreipiančiųjų RNR, archėjinio C/D sRNP branduolį taip pat sudaro metiltransferazė fibrilarinas (Fib) ir Nop5 bei L7ae struktūriniai baltymai, o eukariotinio snoRNP – eukariotinis fibrilarinas, Nop56, Nop58 ir Snu13 (15,5 kDa) struktūriniai baltymai (Motorin ir Helm, 2011).

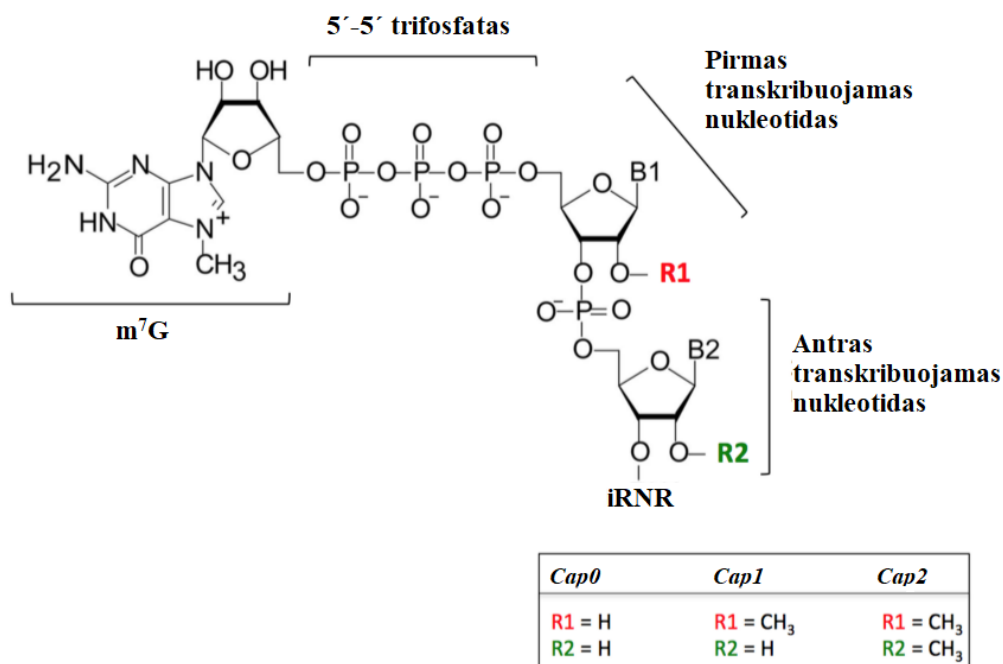


1.8 pav. Iš kreipiančiųjų RNR (pažymėtų juodai) ir baltymų sudaryti 2'-*O*-metilinimo kompleksai. RNR substratas pažymėtas raudonai, jo 2'-*O*-metilinimo pozicija – žvaigždute (Motorin ir Helm, 2011).

Anksčiausiai tyrinėti buvo pradėtas transportinių ir ribosominių ribonukleorūgščių 2'-*O*-metilinimas – šių modifikacijų kiekis ląstelėje priklauso nuo organizmo tipo ir 2'-*O*-metilinimo mechanizmo. Pavyzdžiui, *E. coli* ląstelių rRNR 2'-*O*-metilnukleozidai aptinkami vos keturiose pozicijose, o štai RNP kompleksus turinčiuose sudėtingesniuose organizmuose rRNR ribozės yra žymiai labiau metilintos: *Saccharomyces cerevisiae* – 55 pozicijose, *Homo sapiens* – 110 pozicijose, daugiausia svarbiausiuose rRNR funkcijai regionuose – peptidiltransferaziniame ir dekodavimo centruose (apžvelgta Ayadi ir kt., 2019). Tiesa, bakterijoms rRNR 2'-*O*-metilinimas svarbus dėl kitos priežasties, tai yra, atsparumo antibiotikams, kurie veikia prie bakterijų 23S rRNR V domeno. Taip paaiškinamas bakterijų atsparumas tokiems antibiotikams kaip chloramfenikolis, klindamicinas ir florfenikolis (Kehrenberg ir kt., 2005). Daugiau 2'-*O*-metilintų pozicijų, palyginus su *E. coli*, aptinkama 2'-*O*-metilinimo funkciją atliekančius RNP kompleksus turinčių organizmų tRNR (**1.10 pav.**) – šios modifikacijos hipertermofilinėse archėjose atlieka tRNR struktūros stabilizavimo funkciją (Kowalak ir kt., 1994).

Ribozės 2'-*O*-metilinimas taip pat vyksta eukariotinių ląstelių iRNR brendimo metu (apžvelgta Dimitrova ir kt., 2019). iRNR brendimo metu pirmiausia prie 5' terminalinio nukleotido 5'-5' ryšiu prijungiamas guanozinas (*capG*), tada šio invertuoto nukleotido heterociklinė bazė metilinama *N*⁷-metiltransferazės (*Cap0* struktūra). Sudėtingesniųjų

organizmų ląstelėse *Cap0* struktūra toliau modifikuojama metilinant pirmojo transkribuojamo nukleotido ribozę (*Cap1*), o kartais metilinama ir antrojo transkribuojamo nukleotido ribozė (*Cap2*, **1.9 pav.**). Šis 2'-*O* metilinimas 5' iRNR kepurėlėse ląstelei naudingas, nes leidžia endogeninę iRNR atskirti nuo egzogeninių, pvz., virusinių, iRNR (Daffis ir kt., 2010). Tačiau dauguma citoplazmoje savo genomo replikaciją atliekančių RNR virusų (flavivirusai, koronavirusai, paramiksovirusai, reovirusai ir rbdovirusai) yra prisitaikę prie šio gynybinio mechanizmo – jie koduoja 2'-*O*-metiltransferazes, kurios katalizuoja šeimininko iRNR kepurėlę atitinkančios struktūros sintezę. O kai kurie virusai (ortomiksovirusai, arenavirusai bei bunijavirusai) geba apsisaugoti ir nekoduodami 2'-*O*-metiltransferazių – jie iRNR kepurėles įgauna nuskeldami nuo šeimininko iRNR ir perkeldami ant savosios RNR (apžvelgta Hyde ir Diamond, 2015). Atsiradus pakankamai jautrioms 2'-*O*-metilnukleozidų nustatymo metodikoms, šios modifikacijos rastos ne tik eukariotinių ląstelių iRNR 5' kepurėlėse, bet ir tiksliai identifikuotos iRNR vidiniuose regionuose, pirmiausia žmogaus HeLa ir HEK ląstelėse (Dai ir kt., 2017).



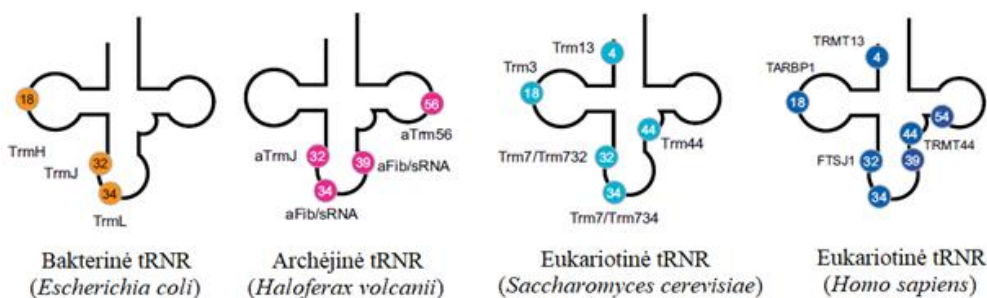
1.9 pav. iRNR 5' galo struktūra (pagal Dimitrova, Teyssset, ir Carré 2019).

2'-*O*-metilinimas taip pat svarbus ir eukariotinių ląstelių mažų nekoduojančių RNR stabilizavimui – metilo grupės pridėjimas prie šių RNR 3' galo 2'-OH grupės apsaugo jas nuo 3'-5' degradacijos ir 3' uridilino (miRNR su polyU uodega yra degraduojamos). Šią

modifikaciją baltažiedyje vairyne (*Arabidopsis thaliana*) atlieka metiltransferazė HEN1 (Yu ir kt., 2005), o kituose eukariotuose – HEN1 homologai (apžvelgta Ji ir Chen, 2012). Žinomas ir bakterinis HEN1 homologas, kurį koduoja dviejų genų operonas, taip pat koduojantis RNR reparacijoje dalyvaujantį fermentą polinukleotidų kinazę-fosfatazę Pnkp (Jain ir Shuman, 2010).

1.3.2. *E. coli* tRNR 2'-*O*-metilinimas

tRNR 2'-*O*-metilinimas yra plačiai aprašytas tiek prokariotiniuose, tiek ir eukariotiniuose organizmuose – žinomos tRNR metilinimo pozicijos ir jas atliekančios metiltransferazės (**1.10 pav.**, apžvelgta Ayadi ir kt. 2019). *E. coli* ląstelėse žinomos tik trys 2'-*O*-metilnamos tRNR pozicijos, kiekvieno iš šių nukleozidų ribozės metilinimą atlieka viena iš trijų specifinių metiltransferazių. Dažniausiai pasitaikantis 2'-*O*-metilinamas nukleozidas, randamas 12 iš 35 skirtingų *E. coli* tRNR, yra 18 pozicijoje (D kilpoje) esantis konservatyvus guanozinas – jį į 2'-*O*-metilguanoziną konvertuoja SPOUT klasės metiltransferazė TrmH. Kiti du *E. coli* tRNR 2'-*O*-metilnukleozidai randami 8 iš 35 tRNR antikodono kilpoje – 32 ir 34 („klibančiojoje“) pozicijose. 32 pozicijoje gali būti 2'-*O*-metilcitidinas arba 2'-*O*-metiluridinas (Cm32/Um32), o 34 pozicijoje randamas 2'-*O*-metilcitidinas arba 5-karboksimetilaminometil-2'-*O*-metiluridinas (Cm34/cmm5Um34) – šiuos nukleozidus metilina atitinkamai TrmJ ir TrmL metiltransferazės (**1.10 pav.**). Šios metiltransferazės nėra būtinos *E. coli* ląstelės gyvybingumui: mutantinės ląstelės, kuriose TrmH, TrmJ ar TrmL metiltransferazės koduojantys genai po vieną pakeisti atsparumo kanamicinui kasete, sukonstruoti ruošiant Keio kolekciją (Baba ir kt., 2006).



1.10 pav. Į skirtingų organizmų tRNR 2'-*O*-metilo grupes įvedančios metiltransferazės (pagal Ayadi ir kt. 2019).

1.3.3. 2'-*O*-metilnukleozidus degraduojantys fermentai

2'-*O*-metilintus nukleozidus degraduojantys fermentai nėra plačiai išnagrinėti – literatūroje aprašyti vos keli atvejai, kai šie junginiai yra nukleozidų hidrolazių substratai. Ši sritis nagrinėjama ne vien dėl fundamentinių tyrimų prasmės, bet ir dėl galimybės šiuos fermentus pritaikyti biotechnologinėje 2'-*O* pozicijoje modifikuotų nukleozidų sintezėje – toks sintezės būdas dėl galimų mažesnių gamybos kaštų ir mažesnio poveikio aplinkai turi potencialo pakeisti cheminę sintezę. Pirmasis toks aprašytas atvejis – nukleozidų hidrolazė LbNH iš gramteigiamų bakterijų *Lactobacillus buchneri* LBK78 kamieno, atrasta vykdant 2'-*O*-metiluridiną skaidančių fermentų paiešką tarp 267 kultivuojamų bakterijų kamienų (Mitsukawa ir kt., 2016). Ši nukleozidų hidrolazė katalizuoja dviejų tipų – hidrolizės bei transribozilimo – reakcijas, todėl tyrėjai pabandė pritaikyti šį fermentą 2'-*O*-metiladenozino sintezei kaip pradinius substratus naudojant adeniną ir 2'-*O*-metiluridiną. Deja, šis mėginimas nebuvo itin sėkmingas – reakcijos išeiga siekė vos 1 %, o transribozilimas vyko tik su adeninu – su kitomis nukleobazėmis aktyvumas nepastebėtas (Mitsukawa ir kt., 2017). Vėliau ta pati tyrėjų komanda atliko dar vieną panašų tyrimą – šįkart su didesniu aktyvumu pasižyminčia, į LbNH panašia 2'-*O*-metilnukleozidų hidrolaze AgNH, kuri taip pat šalia hidrolazinio aktyvumo pasižymi ir transriboziliiniu aktyvumu. Šis fermentas buvo pritaikytas chemiškai sudėtingiau susintetinamo junginio 2'-*O*-metil-6-chloroguanozino sintezei, tačiau buvo pasiekta tik 2,3 % išeiga (Mitsukawa ir kt., 2018).

Kita charakterizuota 2'-*O*-metilnukleozidų hidrolazė – RK9NH – buvo atrasta vykdant funkcinę paiešką DNR metagenominėse bibliotekose naudojant *Escherichia coli* DH10BΔpyrFEC auksotrofinį kamieną (Aučynaitė ir kt., 2018). Didžiausias RK9NH katalitinis aktyvumas stebėtas su pirimidinus turinčiais 2'-*O*-ribonukleozidais ir ribonukleozidais, žemesnis – su purinus turinčiais 2'-*O*-ribonukleozidais ir ribonukleozidais, o reakcijų su deoksiribonukleotidais išeiga buvo dar mažesnė: 2'-deoksiadenozinas, 2'-deoksicitidinas ir timidinas buvo neskaidomi iš viso. Hidrolizės reakcija taip pat nevyko su 3'-*O* pozicijoje alilo ar metilo grupe ir 2'-*O* pozicijoje alilo grupe modifikuotais nukleozidais.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

Reagentai	Gamintojas
Tris, TCEP, kanamicinas, adenzinas, guanozinas, inozinas, citidinas.	<i>AppliChem</i>
Chloroformas, boro rūgštis	<i>Avantor</i>
TEMED, Coomassie brilliant blue R-250	<i>Bio-Rad</i>
Metanolis, glicerolis (bevandenis)	<i>Chempur</i>
Bacto kazamino rūgštys	<i>Difco Laboratories</i>
β-merkaptoetanolis	<i>Ferak</i>
4-amino-3-hidrazino-5-merkaptio-1,2,4-triazolis	<i>Fluka</i>
2'- <i>O</i> -metilATP, 2'- <i>O</i> -metilGTP, 2'- <i>O</i> -metilUTP, 2'- <i>O</i> -metilCTP, 2'- <i>O</i> -metilcitidinas, 2'- <i>O</i> -metil-5-metilcitidinas, 2'- <i>O</i> -metiluridinas, 3'- <i>O</i> -metiluridinas, 2'- <i>O</i> -metil-5-metiluridinas, , 2'- <i>O</i> -aliluridinas, 3'- <i>O</i> -aliluridinas, 2'- <i>O</i> -metilguanozinas, 2'- <i>O</i> -metiladenozinas, 2'- <i>O</i> -metilinozinas, 2',3'- <i>O</i> -izopropilidenuridinas, 5-metilcitidinas, 5-metiluridinas	<i>Jena Bioscience</i>
99,8 % acto rūgštis	<i>Lach-Ner</i>
LB terpės mišinys	<i>Liofilchem</i>
Glicinas, hidroksimetilceliuliozė	<i>Merck</i>
[γ- ³² P]-ATP (6000 Ci/mmol)	<i>PerkinElmer</i>
Agaras, ampicilinas, EDTA, NaCl, ROTIPHERESE Gel 40 (29:1) ir (19:1) akrilamido/bisakrilamido tirpalai, ROTI Aqua-Phenol rūgštinis ir Phenol (pH 7,5–8,0) fenolio:chloroformo:izoamilio alkoholio tirpalai	<i>Roth</i>
tRNR (iš <i>E. coli</i> MRE 600 kamieno)	<i>Roche</i>
Amonio persulfatas, PageRuler Prestained Protein Ladder, RiboRuler Low Range RNA Ladder ir GeneRuler 50 bp DNA Ladder molekulinės masės žymenys, IPTG, TopVision agarozė, SYBR Green I nukleorūgščių dažas, FastAP termojautri šarminė fosfatazė, T4 polinukleotidų kinazė (PNK), PNK 10X Reaction Buffer A, RNA Gel Loading Dye (2X) RNR dažas, žymuo, RNazė A, DNazė I, ATP	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
Etidžio bromidas	<i>Serva</i>
Imidazolas, DMSO, FeSO ₄ ·7H ₂ O, MgCl ₂ ·6H ₂ O, NiSO ₄ ·7H ₂ O, MgSO ₄ ·7H ₂ O, CaCl ₂ , CoCl ₂ ·6H ₂ O, MnSO ₄ ·5H ₂ O, ZnSO ₄ ·7H ₂ O, CuCl ₂ ·2H ₂ O natrio askorbatas, 5-metilcitidinas, 5-metiluridinas, uridinas, chloroformas, metanolis, formaldehidai, jaučio serumo albuminas, dietilpirokarbonatas (DEPC), PMSF, DTT, β-ciklodekstrinas, kofermento A S-(3,7,11,15-tetrametilheksadekanoato) trietilamonio druska	<i>Sigma-Aldrich</i>
Etanolis	<i>HoneyWell</i>
Plasmid Miniprep Classic plazmidžių skyrimo rinkinys	<i>Zymo Research</i>
α-ketoglutaro rūgštis	<i>Reahim</i>
2'- <i>O</i> -metil-5-fluoruridinas, 5-fluoruridinas	<i>VU GMC BCHI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyrius (MMBS)</i>

2.1 lentelė. Darbo metu naudoti reagentai ir jų gamintojai.

2.1.2. Mitybinės terpės

1. LB (*Luria-Bertani*) (pH 7,0) – 10 g/L triptono, 5 g/L NaCl, 5 g/L mielių ekstrakto. Terpė agarizuota pridedant 15 g/L agarą. Terpės autoklavavimas vykdomas 30 min 1 atm slėgyje 121°C temperatūroje.

2. M9 agarizuota terpė (25 mL) gaminama maišant 5,0 mL 5x M9 druskų tirpalo pH 7,4 (35 g/L Na₂HPO₄, 15 g/L KH₂PO₄, 2,5 g/L NaCl, 5,0 g/L NH₄Cl), 0,5 mL 100 g/L (50x) kazamino rūgščių tirpalo, 125 µL 40 % gliukozės tirpalo, 125 µL 20 % ramnozės (galutinė konc. 1 g/L), 12,5 µL 1 M IPTG tirpalo (galutinė konc. 0,5 mM), 2,5 µL 15 g/L kanamicino (galutinė konc. 0,015 g/L), 2,5 µL 100 g/L ampicilino (galutinė konc. 0,1 g/L), 125 µL 2 g/L 2'-O-metilinto substrato (galutinė koncentracija 0,01 g/L) ir iki 25 mL atžymos užpilant M9 agarizuotos terpės (0,2 g/L MgSO₄, 0,01 g/L CaCl₂, 15 g/L TopVision agarą). 5x M9 druskų tirpalas ir agarizuota terpė buvo autoklavuojami atskirai 30 min 1 atm slėgyje 121°C temperatūroje, 40 % gliukozės tirpalas autoklavuojamas 0,5 atm slėgyje 121°C temperatūroje, 50x kazamino rūgščių tirpalas sterilizuotas 0,22 µm dydžio porų filtru (*Millipore*).

2.1.3. Buferiniai tirpalai

Darbo metu buferiniai tirpalai, skirti RNR skyrimui iš ląstelių, laikymui, analizei bei inkubavimui su baltymais, išskyrus vykdant formaldehido nustatymą *Purpald* reagentu, ruošiami naudojant vandenį, papildytą 0,1 % DEPC ir autoklavuotą 30 min 1 atm slėgyje 121°C temperatūroje. Naudojant su DEPC autoklavuotą vandenį paruošti buferiai, skirti darbui su RNR ir sudėtyje neturintys baltymų ar kitų autoklavuojant degraduojančių junginių (pavyzdžiui, ditiotreitolio), dar kartą autoklavuojami tomis pačiomis sąlygomis.

2.1.4. Plazmidės, vektoriai ir bakteriniai kamienai

Plazmidės ir vektoriai	Savybės
pLATE31-FJS	pLATE31 indukuojamas raiškos vektorius su įterptu genu, koduojančiu FJS oksigenazę su His ₆ fragmentu C gale. Amp _r .
pET-21a-PHYA	pET-21a indukuojamas raiškos vektorius su įterptu genu, koduojančiu PHYA oksigenazę su His ₆ fragmentu C gale. Amp _r .
pET-21a-PHYF	pET-21a indukuojamas raiškos vektorius su įterptu genu, koduojančiu PHYF oksigenazę su His ₆ fragmentu C gale. Amp _r .
pET-21a-PHYP	pET-21a indukuojamas raiškos vektorius su įterptu genu, koduojančiu PHYF oksigenazę su His ₆ fragmentu C gale. Amp _r .
pET-21a	Amp _r

2.2 lentelė. Darbo metu naudotos plazmidės ir plazmidiniai vektoriai.

Bakterinis kamienas	Genotipas	Šaltinis
<i>E. coli</i> KRX	[F' traD36, ΔompP proA ⁺ B ⁺ lacIq Δ(lacZ)M15] ΔompT endA1 recA1 gyrA96 (Nal ^r) thi-1 hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺) e14 ⁻ (McrA ⁻) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) Δ(rhaBAD)::T7 RNR polimerazė	<i>Promega</i>
<i>E. coli</i> KRX ΔpyrF	[F' traD36, ΔompP proA ⁺ B ⁺ lacIq Δ(lacZ)M15] ΔompT endA1 recA1 gyrA96 (Nal ^r) thi-1 hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺) e14 ⁻ (McrA ⁻) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) Δ(rhaBAD)::T7 RNR polimerazė ΔpyrF::kan	<i>VU GMC BCHI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyrius (MMBS)</i>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)	<i>Novagen</i>
<i>E. coli</i> HMS174 (DE3)	F ⁻ <i>recA1 hsdR</i> (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) (DE3) (Rif ^R)	<i>NEB</i>
<i>E. coli</i> ArcticExpress	F ⁻ ompT hsdS(r _B -m _B -) dcm+ Tetr gal endA Hte [cpn10 cpn60 Gentr] [argU ileYleuW Strr]	<i>Agilent Technologies</i>
<i>E. coli</i> BW25113	F ⁻ Δ(araD-araB)567 lacZ4787::rrnB-3 LAM ⁻ rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	<i>Keio kolekcija</i>
<i>E. coli</i> JW3626-1	F ⁻ , Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-3) λ ⁻ rph-1 ΔtrmH755::kan Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	<i>Keio kolekcija</i>
<i>E. coli</i> JW2516-2	F ⁻ Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ ⁻ , ΔtrmJ778::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514	<i>Keio kolekcija</i>
<i>E. coli</i> JW3581-1	F ⁻ , Δ(araD-araB)567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), λ ⁻ , ΔtrmL790::kan, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514	<i>Keio kolekcija</i>
<i>E. coli</i> BW25113 ΔtrmH ΔtrmJ	F ⁻ Δ(araD-araB)567 lacZ4787::rrnB-3 LAM ⁻ rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514 ΔtrmHΔtrmJ::kan	<i>VU GMC BCHI MMBS</i>
<i>E. coli</i> BW25113 ΔtrmH ΔtrmL	F ⁻ Δ(araD-araB)567 lacZ4787::rrnB-3 LAM ⁻ rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514 ΔtrmHΔtrmL::kan	<i>VU GMC BCHI MMBS</i>
<i>E. coli</i> BW25113 ΔtrmJ ΔtrmL	F ⁻ Δ(araD-araB)567 lacZ4787::rrnB-3 LAM ⁻ rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514 ΔtrmJΔtrmL::kan	<i>VU GMC BCHI MMBS</i>
<i>E. coli</i> BW25113 ΔtrmH ΔtrmJ ΔtrmL	F ⁻ Δ(araD-araB)567 lacZ4787::rrnB-3 LAM ⁻ rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514 ΔtrmHΔtrmJΔtrmL::kan	<i>VU GMC BCHI MMBS</i>

2.3 lentelė. Darbo metu naudoti bakteriniai kamienai ir jų genotipai.

2.1.5. Prietaisai

ÄKTA purifier 900 baltymų frakcionavimo aparatas (*GE Healthcare*)

ÄKTA pure baltymų frakcionavimo aparatas ir chromatografijos kolonėlės: 1 ir 5 mL HiTrap Chelating HP, HiTrap Q XL ir HiTrap Desalting su Sephadex G-25 geliu (*Cytiva*)

5430 R, 5810 R, 5415 R, 54145 D centrifugos (*Eppendorf*)

Orion 320 pH matuoklis (*Thermo Electron Corporation*)

Vandens gryninimo įrenginys Milli-Q Integral (*Merck Millipore*)

New Brunswick Innova rotacinė purtyklė su platforma (*Eppendorf*)

Helios γ spektrofotometras (*Thermo Electron Corporation*)

Mikroplokštelių skaitytuvas PowerWave XS (*BioTek Instruments*)

Aukšto slėgio skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos sistema: dvi LC-2020AD pompos, CBM-20A valdymo blokas, SIL-30AC automatinis bandinių ėmiklis, CTO-20AC kolonų termostatas, SPD-M20A fotodiodų gardelės detektorius, LCMS-2020 masių spektrometras su ESI šaltiniu (*Shimadzu*), YMC-Pack Pro C18 150×3 mm kolonėlė (*YMC*)

MicroPulser elektroporacijos aparatas (*Bio-rad*)

TLC Silica gel 60 F₂₅₄ plonasluoksnei chromatografijai skirtos plokštelės (*Merck Millipore*)

Thermomixer Comfort termomikseris su 1,5 mL blokais (*Eppendorf*)

UV-1 S/M ultravioletinės šviesos lempa (*Herolab*)

UVT-28 ME transiliuminatorius (*Herolab*)

nanoPAC-300P horizontaliosios elektroforezės sistema (*Cleaver Scientific*)

Mini-PROTEAN ir PROTEAN II xi (*Bio-rad*) vertikaliosios elektroforezės sistemos

E832 ir EV231 elektroforezės maitinimo blokai (*Consort*)

TV100Y baltymų elektroforezės aparatas (*Scie-Plas*)

UZDN-2T ultragarso aparatas (*SPE Academprylad*)

Nanofotometro komplektas Implem NP80-Touch (*Implem*)

Amicon Ultra-0.5, Ultra-4 ir Ultra-15 centrifuguojamos filtravimo kolonėlės su 10 kDa pralaidumo membrana (*Merck*)

Vaizdinimo sistemos GelDoc GO (*Bio-Rad*), Azure C280 (*Azure Biosystems*) ir FLA-5100 (*Fujifilm*)

BAS-MS 2340 radiacinei spinduliuotei jautrios plokštės (*Fujifilm*)

2.2. Metodai

2.2.1. Elektrokompentinių *Escherichia coli* ląstelių ruošimas

Į 5 mL skystos LB terpės sterilia mikrobiologine kilpele užsėjamas reikiamas kamienas ir toliau ląstelės augintos per naktį 30 °C temperatūroje 180 aps./min greičiu aeruojant. 1 mL iš per naktį užaugintos kultūros buvo užsėjamas į 50 mL LB terpės ir auginta 3–4 valandas minėtomis sąlygomis, kol kultūros optinis tankis pasiekė maždaug 0,5–0,6 (OD₆₀₀). Tuomet ląstelių augimas sustabdomas kolbutės atvėsinant lede, bakterijos surenkamos ir centrifuguojamos 4 °C temperatūroje. Gauta ląstelių biomasė tris kartus praplaunama 4 °C temperatūros steriliu 10 % glicerolio tirpalu. Po paskutinio centrifugavimo gautos ląstelės resuspenduojamos 1 mililitre 4 °C 10 % glicerolio tirpalo. Gauta suspensija po 100 µL išpilstoma į sterilius mėgintuvėlius, ląstelės laikomos –80 °C temperatūros šaldiklyje.

2.2.2. Bakterijų transformacija elektroporacijos metodu

Bakterijų transformacijos metu į 100 µL elektrokompentinių ląstelių dedama ~1 µL plazmidinės DNR tirpalo, pamaišoma pipetuoiant, tada porą minučių palaikoma lede. Po to bakterijos suspenduojamos ir perkeliama į atšaldytą sterilią elektroporacijos kiuvetę. Kiuvetę įstačius į elektroporacijos aparatą su nustatyta 1,8 kV/cm įtampa, apie 5 ms vykdomas elektros impulsas. Išėmus kiuvetę, ląstelės perkeliama į mėgintuvėlį su 1 mL LB terpės ir inkubuojamos 37 °C nuo 30 min iki 1 valandos. Po inkubacijos ląstelės surenkamos centrifuguojant 1 minutę 16000 aps./min greičiu greičiu ir išsėjamos ant pasirinktos agarizuotos terpės su atitinkamu antibiotiku.

2.2.3. Demetilazių aktyvumo nustatymas *in vivo*

2'-O-metilnukleozidų skaidymo aktyvumo įvertinimui *in vivo* baltymų ekspresijai skirtos plazmidės su FJS, PHYA, PHYF ir PHYP koduojančiais genais buvo panaudotos transformuojant *Escherichia coli* KRX ΔpyrF kamieną, uracilo auksotrofą. Po elektroporacijos transformuotos ląstelės išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu ir kanamicinu. Susiformavusios kolonijos lygiagrečiai buvo persėjamos ant M9 terpės praturtintos 2'-O-metilnukleozidais (1 µg/mL 2'-O-metilcitidino arba 2'-O-metiluridino) bei kontrolinių lėkštelių su nukleozidais (1 µg/mL citidino arba uridino).

2.2.4. Rekombinantinių baltymų sintezė *Escherichia coli* ekspresijos kamienuose

Darbe naudotų FJS, PHYA, PHYF ir PHYP rekombinantinių baltymų sintezė buvo vykdoma ekspresijai skirtuose *E. coli* bakteriniuose kamienuose: FJS – *E. coli* HMS174 (DE3), PHYA ir PHYF – *E. coli* BL21(DE3) kamiene, PHYP – *E. coli* ArcticExpress kamiene. *E. coli* bakterijų, transformuotų plazmidėmis su tikslinį baltymą koduojančiu genu, naktinės kultūros skiedžiamos norimu tūriu sterilios LB terpės taip, kad optinis tankis, esant bangos ilgiui 600 nm (OD_{600}), būtų ~0.02, tada bakterijos auginamos tol, kol OD_{600} pasieks 0,4–0,5, baltymų sintezė indukuojama IPTG ir ląstelės inkubuojamos tirpaus baltymo sintezei tinkamomis sąlygomis. FJS indukcija buvo vykdoma su 0,2 mM IPTG, po indukcijos ląstelės inkubuojamos 30 °C temperatūroje 4 h, PHYA – indukuojant 0,2 mM IPTG ir inkubuojant 16 °C per nakt, PHYF – indukuojant 0,5 mM IPTG ir inkubuojant 4 h 30 °C, PHYP – indukuojant 0,05 mM ir po indukcijos inkubuojant 12 °C temperatūroje per nakt.

2.2.5. Beląstelinio ekstrakto ruošimas

Užaugintos ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant 10 min 4 °C temperatūroje 4000 aps./min greičiu. Gauta ląstelių biomasė suspenduojama 50 mM Tris-HCl pH 8,0 buferyje su 300 mM KCl, 1 mM PMSF ir 10 % glicerolio ir 15 sekundžių intervalais 2 min ardoma ultragarsiniu dezintegratoriumi (22 kHz, 50 % amplitudė) ledo vonioje. Po ardymo netirpi frakcija atskiriama centrifuguojant 15 min 16000 aps./min greičiu 4 °C temperatūroje, supernatantas surenkamas ir naudojamas baltymų gryninimui.

2.2.6. Rekombinantinių baltymų gryninimas

FJS, PHYA, PHYF ir PHYP rekombinantiniai baltymai su His₆ fragmentais C gale buvo gryninami iš beląstelinio ekstrakto giminingumo chromatografijos būdu, naudojant Ni²⁺ jonų pripildytą HiTrap Chelating HP kolonėlę, kuri buvo iš anksto paruošiama ją plaunant 50 mM Tris-HCl buferiu pH 8,0 su 300 mM KCl ir 10 % glicerolio. Tiksliniai baltymai turintys histidinių inkarą buvo surenkami taikant gradientinę baltymų eliuciją didėjančia imidazolo (0 – 0,35 M) koncentracija. Imidazolas ir KCl buvo pašalinami mėginį su tiksliniu baltymu leidžiant per HiTrap desalting kolonėlę, naudojant 50 mM Tris-HCl pH 8,0 buferį su 10 % glicerolio. Po nudruskinimo baltymų preparatai buvo koncentruojami centrifuguojant Amicon Ultra-0.5, Ultra-4 arba Ultra-15 filtravimo kolonėlėse su 10 kDa pralaidumo membrana. Siekiant didesnio baltymų grynumo, PHYA ir PHYP baltyminiai preparatai po gryninimo Ni²⁺ giminingumo chromatografijos būdu buvo papildomai gryninami HiTrap Q XL jonų mainų

kolonėle, taikant gradientinę baltymų eliuciją didėjančia NaCl (0 – 0,7 M) koncentracija ir pakartojant baltymų nudruskinimą 50 mM Tris-HCl pH 8,0 buferiu su 10 % glicerolio.

2.2.7. Baltymų elektroforezė

Baltymų elektroforezė buvo atliekama pagal standartines metodikas (Laemmli, 1970), naudojant 5 % koncentruojamąjį ir 14 % skirstomąjį gelius, PageRuler Prestained Protein Ladder molekulinės masės žymenį ir dažant Coomassie Brilliant Blue R-250 dažais.

2.2.8. Baltymų koncentracijos nustatymas

Darbo metu baltymų koncentracija buvo nustatoma Lowry (Lowry ir kt., 1951) metodu arba pagal UV spindulių sugertį naudojant nanofotometro Implem NP80-Touch baltymų koncentracijos nustatymo funkciją. Sugertis buvo lyginama su 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 % glicerolio buferiu. Baltymų sugerties koeficientai skaičiuoti pagal amino rūgščių sudėtį, naudojant ProtParam bioinformatinį įrankį (Gasteiger ir kt., 2005).

2.2.9. 2'-*O*-metil-5-metilцитидино monofosfato fermentinė sintezė

2'-*O*-metil-5-metilцитидино monofosfato sintezė vykdyta 1,5 mL 50 mM kalio fosfato pH buferyje, papildytame 50 mM 2'-*O*-metil-5-metilцитидино, 5 mM GTP, 7 mM MgCl₂, 300 mM acetilfosfato, 0,1 mg/mL deoksinukleozidų kinazės (Dm-dNK) iš *Drosophila melanogaster* ir 0,25 mg/mL acetato kinazės iš *E. coli*. Reakcijos mišinys buvo inkubuojamas 500 apsisukimų per minutę greičiu 24 h 37 °C temperatūroje, po sintezės 2'-*O*-metil-5-metilцитидино monofosfatas mišinyje kokybiškai ir kiekybiškai nustatytas vykdant analizes TLC ir HPLC-MS metodais.

2.2.10. Plonasluoksnė chromatografija (TLC)

Plonasluoksnė chromatografija vykdyta su fluorascencinio F₂₅₄ dažo turinčiomis silikageliu degtomis aliuminio plokštelėmis. Ant plokštelės buvo užlašinamas 1 µL reakcijos mišinio, jis gerai išdžiovinamas ir toliau plokštelė patalpinama į stiklo kamerą su mobilia faze (7:3 chloroformo ir metanolio mišinys).

2.2.11. Formaldehido nustatymas *Purpald* reagentu

2'-*O*-metilцитидино demetilinimo reakcijos metu susidariusio formaldehido kiekis buvo nustatytas naudojant *Purpald* reagentą (4-amino-3-hidrazino-5-merkopto-1,2,4-triazolas). Reakcijos mišinys po inkubacijos su fermentu praskiedžiamas 50 mM Tris-HCl pH 8,0 buferiu

tiek, kad substrato pradinė koncentracija mišinyje būtų buvusi 0,1 mM, tada mėginys sumaišomas su 250 µL *Purpald* reagento (0,5 M natrio šarmo tirpale ištirpinto 30 mM 4-amino-3-hidrazino-5-merkaptio-1,2,4-triazolo), gautas mišinys paliekamas inkubuotis 30 min 30 °C temperatūroje. Susidaręs formaldehidą reakcijos mišinyje buvo nustatomas spektrofotometriškai matuojant sugerties intensyvumą, esant 550 nm bangos ilgiui. Teigiamai kontrolei buvo naudojamas reakcijos mišinys su žinoma (5 mM) formaldehido koncentracija.

2.2.12. 2'-O pozicijoje modifikuotų nukleozidų fermentinio aktyvumo nustatymas

Standartinį reakcijos mišinį (40 µL) sudarė 10 µL 20 mM atitinkamo substrato (galutinė konc. 5 mM), 10 µL ar 20 µL fermentinio preparato, 4 µL 100 mM α-ketoglutarato (10 mM), 1 µL 20 mM FeSO₄ (0,5 mM), 2 µL 20 mM askorbato (1 mM), distiliuotas H₂O ir tiek 500 mM Tris-HCl pH 8,0 buferio, kad galutinė koncentracija būtų 50 mM.

Reakcijos, kurių mišiniai vėliau analizuoti HPLC-MS metodu, buvo sustabdomos reakcijos mišinius sumaišant su 40 µL acetonitrilo ir pipetuojant, kol baltymai denatūruos. Denatūravę baltymai nusodinami centrifuguojant mėginį 20 min 16000 aps./min greičiu, o supernatantas naudojamas analizei.

2.2.13. Tandeminė aukšto efektyvumo skysčių chromatografija ir masių spektrometrija

Mėginių įnešimui į sistemą naudotas vandeninis 0,1 % skruzdžių rūgšties tirpalas (analizuojant mėginius su citidinu, 2'-O-metilcitidinu, 5-metilcitidinu, 2'-O-metil-5-metilcitidinu naudotas 0,1 % skruzdžių rūgšties, 2% metanolio tirpalas, o su 2'-O-metilnukleozidų trifosfatais bei fitanoil-KoA – 0,1% amonio karbonato tirpalas), chromatografinis frakcionavimas vykdytas 40 °C temperatūroje acetonitrilo koncentracijai didėjant linijiniu gradientu nuo 0 iki 60 % (citidino ir 2'-O-metilcitidino atvejais didinant metanolio koncentraciją linijiniu gradientu nuo 2 % iki 10 % su 3 min atidėjimu). Masių spektrai fiksuoti 350 °C temperatūroje ir esant ±4500 V įtampai, purškimui ir džiovinimui naudojant azoto dujas, analizės metu taikyti teigiamos ir neigiamos jonizacijos režimai. Gauti duomenys analizuoti LabSolutions LC/MS programine įranga.

2.2.14. *E. coli* tRNR skyrimas

Darbo metu tRNR iš *E. coli* bakterijų buvo skiriama, remiantis Edmonds ir kt. aprašyta metodika. Skirtingų kamienų *E. coli* bakterijos po auginimo 18 valandų 30 °C temperatūroje

aeruojančią, buvo centrifuguojama, o surinkta biomasė suspenduojama 10 mM Tris-HCl pH 7,5 buferyje su 10 mM MgCl₂ ir lizuojama pridedant natrio dodecilsulfato (galutinė koncentracija 0,2 %). Nukleorūgščių ekstrakcija iš gauto lizato vykdyta naudojant ROTI Aqua-Phenol rūgštinį fenolio tirpalą ir išsodinant nukleorūgštis etanoliu, o gautas nuosėdas suspenduojant 1 M natrio acetato pH 7,0 tirpale. Iš gauto tirpalo didelės molekulinės masės nukleorūgštys pašalinamos jas išsodinant pridėjus 0,54 pradinio tūrio izopropanolio. Gautos nuosėdos vėl suspenduojamos 1 M natrio acetato pH 7,0 tirpale ir dar kartą išsodinamos izopropanoliu. Iš gautų apjungtų supernatantų tRNR išsodinama pridedant 0,98 tūrio izopropanolio. Gautos tRNR nuosėdos toliau gryninamos vykdant ekstrakciją fenoliu, išsodinant tRNR etanoliu, resuspenduojant nuosėdas natrio acetato tirpale ir galiausiai išsodinant izopropanoliu (0,98 tūrio).

2.2.15. Nukleorūgščių elektroforezė agarozės gelyje

Nukleorūgščių elektroforezė atliekama horizontaliame 2 % agarozės gelyje, patalpintame į ant ledo vėsinaimą TBE buferį bei dažant su SYBR Green I dažu, dažo dedant į gelį ir elektroforezės buferį. Vykdamas elektroforetinio poslinkio analizę, naudota 1 µL 1 mg/mL tRNR, 15 arba 14 µL FJS arba PHYF fermentinio preparato, 0 arba 1 µL 100 mM α-ketoglutarato, ir 4 µL RNR dažo.

2.2.16. Nukleorūgščių elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

Žymėtų nukleorūgščių elektroforezė buvo atliekama 8 % arba 15 % poliakrilamidiniame (19:1 akrilamido:bisakrilamido) gelyje denatūruojančiomis (su 8M karbamido) arba nendenatūruojančiomis sąlygomis, naudojant TBE buferį. Gauti geliai išdžiovinti ir vizualizuoti naudojant radiacinei spinduliuotei jautrius ekranus, gauti vaizdai analizuoti naudojant elektroforegramų analizės programą Image Reader FLA-5000.

2.2.17. Nukleorūgščių žymėjimas radioaktyviu ³²P izotopu

Darbo metu išskirta tRNR (tiek iš *E. coli* ląstelių, tiek išgrynintų iš baltymų) prieš jos žymėjimą radioaktyviu ³²P izotopu pirmiausia buvo defosforilinama FastAP šarminė fosfataze (0,5x PNK A buferyje). Po reakcijos fosfatazė inaktyvuojama pridedant 5 mM EDTA ir palaikant reakcijos mišinį 10 min 75 °C temperatūroje. Tuomet vykdomas gautų defosforilintų nukleorūgščių kinavimas, naudojant T4 polinukleotidų kinazę (PNK) ir [γ-³²P]-ATP (1x PNK A buferyje), reakciją atliekant 37 °C temperatūroje 30 min. Galiausiai PNK

inaktyvuojama pridedant 10 mM EDTA ir inkubuojant 10 min 75 °C temperatūroje. Žymėtos nukleorūgštys iki panaudojimo laikomos -20 °C šaldiklyje.

2.2.18. Baltymų sąveikos su nukleorūgštimis tyrimas elektroforetinio poslinkio metodu

Radioaktyviuoju ³²P izotopu pažymėtos tRNR buvo inkubuotos su tiriamais išgrynintais baltymais 50 mM Tris-HCl pH 8,0 buferyje su 10 % glicerolio arba nespecifinę sąveiką mažinančiame (50 mM Tris-HCl pH 8,0, su 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 % glicerolio ir 0,2 mg/ml BSA) buferyje 30 °C temperatūroje 10 min. Gautų mėginių elektroforezė vykdyta 1–3 valandas 1× TBE buferyje 8 % arba 15 % poliakrilamido gelyje nedematūruojančiomis sąlygomis, esant 200–300 V įtampai.

2.2.19. Nukleorūgščių skyrimas iš išgryninto baltyminio preparato ir analizė

Išgrynintas FJS baltyminis preparato buvo padalintas į keturias dalis, gauti mėginiai sumaišomi su distiliuotu vandeniu ir 10x reakcijos buferiu taip, kad galutiniame mėginyje (0,5 mL) būtų 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ ir 1 mM ditioneitolio. Tada į vieną iš gautų mėginių pridedama 2 μL 20 mg/mL RNazės A, į antrą – 2 μL 20 mg/mL DNazės I, reakcijos mišiniai inkubuojami 40 min 37 °C temperatūroje. Tada į visus keturis mėginius buvo pridedama po 2 μL 20 mg/mL proteinazės K, reakcijos mišiniai inkubuoti 40 min 37 °C temperatūroje, hidrolizuoti baltymai pašalinami vykdant nukleorūgščių ekstrakciją rūgštiniu arba baziniu fenolio:chloroformo:izoamilo alkoholio tirpalu, fenolio likučių pašalinimui vandeninė fazė papildomai sumaišoma su chloroformu ir dar kartą centrifuguojama. Išskirtų nukleorūgščių tirpalai pakartotinai veikiami su 2 μL 20 mg/mL RNazės A bei 2 μL 20 mg/mL DNazės I (40 min 37 °C), tuomet nukleorūgštys iš jų vėl skiriamos vykdant ekstrakciją fenoliu. Gauti mėginiai žymimi radioaktyviu ³²P izotopu ir analizuojami TBE-PAGE metodu denatūruojančiomis sąlygomis.

2.2.20. Fitanoil-KoA hidroksilinimo nustatymas

Fitanoil-KoA hidroksilinimo aktyvumo nustatymas vykdytas remiantis Mukherji ir kt. aprašytais PhyH aktyvumo matavimais. Išgryninti FJS (4 mg/mL), PHYF (4 mg/mL), PHYA (0,25 mg/mL) ir PHYP (0,25 mg/mL) fermentiniai preparatai buvo inkubuojami 1 ir 12 valandų 30 °C temperatūroje 50 mM Tris-HCl pH 8,0 buferio (50 μL tūris) su 1 mM FeCl₂, 2 mM α-ketoglutarato, 10 mM askorbato, 4 mM ATP, 0,05 mM fitanoil-KoA (kofermento A S-(3,7,11,15-tetrametilheksadekanoato) trietilamonio druskos), 10 μM TCEP, 0,44 mM

β -ciklodekstrino. Reakcijos buvo stabdomos 150 μ L acetonitrilo, tada vykdoma HPLC-MS analizė, gautos chromatogramos ir masių spektrogramos lyginamos su kontroliniais mėginiais, paruoštais tomis pačios sąlygomis, tik į reakcijos mišinį vietoj fermento arba vietoj fitanoil-KoA dedant tokį pat tūrį buferio.

2.2.21. Skaitinių duomenų apdorojimas ir grafikų braižymas.

Visi darbe pateikti duomenų grafikai ir skaičiavimai, išskyrus atliekant FJS demetilazės kinetinius matavimus, atlikti naudojant Microsoft Excel programine įranga (2205 versija), skaičiuojant optimalią veikimo temperatūrą, modelis pritaikytas naudojant Solver plėtinį. Kinetinių matavimų duomenys, perskaičiavus juos į molines vertes, naudojant kalibracines kreives ir Excel programinę įrangą, toliau apdoroti ir vizualizuoti naudojant GraphPad Prism programinės įrangos (9.3.1 versija) nelinijinės regresijos pagal Michaelis-Menten kinetikos lygtis funkciją. Pateiktuose duomenyse po \pm ženklo pateiktos standartinės paklaidos reikšmės.

Buferių pH skirtumas tarp 20 ir 37 °C temperatūrų buvo suskaičiuotas, naudojant van 't Hoff lygties išraišką:

$$d(\text{pK}_a^0)/dt = - \Delta H^0 / (2.3RT^2)$$

čia: R – universalioji dujų konstanta, 8,314 J/(mol K);

ΔH^0 – buferių disociacijos reakcijos molinė entalpija 298,25K temperatūroje, J/mol;

T – temperatūra, šiame skaičiavime 298,25 K.

Atliekant skaičiavimus, padaryta prielaida, kad $d(\text{pK}_a)/dt$ dydis šiame intervale yra konstanta. $d(\text{pK}_a)/dt$ dydis kiekvienam buferiui buvo apskaičiuotas remiantis buferių disociacijos molinės entalpijos dydžiais iš literatūros (Goldberg ir kt., 2002), gauta $d(\text{pK}_a)/dt$ reikšmė Tris-HCl buferiui lygi -0.028 , kalio fosfatiniam buferiui lygi -0.0022 , Hepes-KOH buferiui lygi -0.012 .

3. REZULTATAI

FJS yra nuo α -ketoglutatarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių superšeimos fermentas, atrastas vykdant fermentų, dalyvaujančių 2'-O-metilcitolidino biodegradacijoje, paiešką. Ši paieška buvo atlikta ankstesnio darbo metu, naudojant metagenomines bibliotekas ir mutantinį *E. coli* DH10B Δ pyrFEC kamieną (Stonkus Justas. Genų, koduojančių 2'-O-metilcitolidino biodegradacijos fermentus, paieška metagenominėse bibliotekose [bakalauro darbas]. Vilnius: Vilniaus universitetas; 2020). Neturintis uracilo sintezei *de novo* reikalingų genų *E. coli* DH10B Δ pyrFEC kamienas gali augti tik tada, kai aplinkoje yra uracilo šaltinis arba kai į ląstelę patenka komplementarus genas, kurio koduojamas baltymas leidžia ląstelei transformuoti kokį nors mitybinėje terpėje esantį junginį iki uracilo. Tokiu būdu vienoje iš bibliotekų pavyko identifikuoti nežinomą geną, koduojantį 2'-O-metilcitolidino katabolizme dalyvaujantį fermentą. Gavus šio geno sekoskaitos rezultatus, jo koduojamo baltymo sekos bioinformatinė analizė parodė, kad tai yra 32,04 kDa molekulinės masės nuo α -ketoglutatarato ir geležies(II) jonų priklausoma oksigenazė. Kaip aprašyta literatūrinėje dalyje, nuo α -ketoglutatarato ir geležies(II) jonų priklausomos oksigenazės katalizuoja organinių molekulių oksidaciją molekulinio deguonimi, kaip papildomą substratą reakcijos metu naudodamos α -ketoglutataratą. Reakcijos metu α -ketoglutataratas dekarboksilinamas, susidarant sukcinatui bei anglies dioksidui. Demetilazių atveju, kai hidroksilinamas substrato anglies atomas būna sudaręs ryšį su azoto ar deguonies heteroatomu, pirminis reakcijos produktas degraduoja, susidarant papildomam produktui – formaldehidui.

3.1. FJS oksigenazės aktyvumo tyrimai

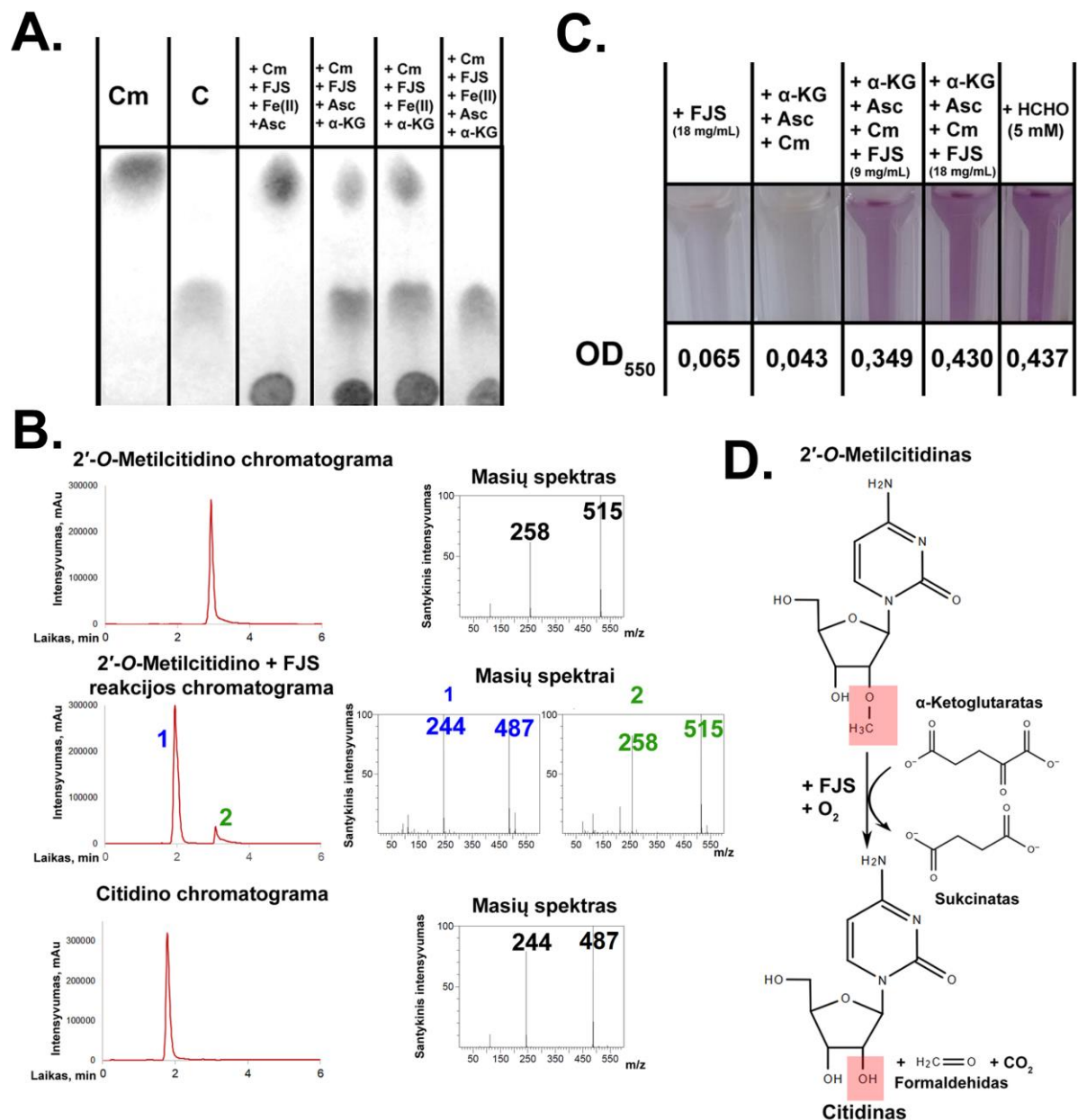
Ankstesnių darbų metu, FJS oksigenazę koduojantis genas buvo sėkmingai klonuotas į pLATE31 raiškos vektorių, nustatytos optimalios baltymo biosintezės ir gryninimo sąlygos. Išgryninus rekombinantinę FJS oksigenazę, buvo nustatytas jos aktyvumas *in vitro*, reakcijos mišinius po inkubacijos su fermentu analizuojant TLC ir HPLC-MS metodais. Žinant, kad FJS oksigenazė priklauso nuo α -ketoglutatarato ir geležies(II) jonų priklausomai oksigenazių šeimai, kurios atstovams katalizuojant reakcijas be tikslinio substrato reikalingi papildomi kosubstratai ir kofermentai, pirmiausia buvo patikrinta, ar FJS oksigenazės aktyvumui turi įtakos α -ketoglutatarato (10 mM), Fe(II) jonų (0,5 mM) ar askorbato (1 mM) buvimas reakcijos mišinyje. Reakcijos buvo vykdomos 2 h 37 °C temperatūroje Tris-HCl pH 8,0 buferyje su 5 mM 2'-O-metilcitolidino ir 2 mg/mL FJS oksigenazės fermentinio preparato. Kaip matyti iš **3.1 pav.** A dalies, FJS yra nuo α -KG ir Fe(II) jonų priklausoma oksigenazė – nevykdo reakcijos nesant

α -ketoglutarato bei, kaip ir dauguma kitų šios superšeimos oksigenazių, pasižymi žemesniu aktyvumu, kai reakcijos mišinyje nėra papildomo Fe(II) jonų šaltinio ir askorbato.

Siekiant įsitikinti, kad reakcijos metu tikrai susidaro citidinas, o ne deoksicitidinas, citozinas ar kitas produktas, reakcijos mišinys buvo patikrintas tandeminės aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos metodu, kaip kontrolę naudojant reakcijos mišinį be fermento. **3.1 pav. B** dalyje pateikta reakcijos mišinio analizė rodo, kad FJS oksigenazė katalizuoja 2'-*O*-metilcitidino demetilinimo reakciją susidarant citidinui – chromatogramoje matomos dvi smailės, junginio eliucijos laikais sutampančios su kontrolinių 2'-*O*-metilcitidino ir citidino smailėmis, o teigiamos jonizacijos masių spektrogramoje matyti, kad reakcijos metu 2'-*O*-metilcitidino masė (masės/krūvio santykis 258, dimero m/z santykis 515) sumažėja per 14 vienetų, o tai atitinka metilo grupės praradimą.

Kaip minėta, nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių superšeimos fermentams vykdant demetilinimo reakcijas, kartu su demetilintu produktu, sukcinatu ir anglies dioksidu, kaip vienas iš produktų turėtų susidaryti ir formaldehidas. Siekiant nustatyti, ar formaldehidus susidaro ir FJS demetilazės katalizuojamo 2'-*O*-metilcitidino demetilinimo reakcijos metu, buvo atliktas formaldehido nustatymas reakcijos mišinyje, naudojant *Purpald* reagentą (**3.1 pav. C**). *Purpald* reagente esantis junginys 4-amino-3-hidrazino-5-merkaptio-1,2,4-triazolis reaguoja su aldehydines grupes turinčiais junginiais, tarp jų ir su formaldehidu. Reakcijos su formaldehidu metu susidaro oksiduotas violetinės spalvos produktas, kuris gali būti nustatomas matuojant optinį tankį, esant 550 nm bangos ilgiui (OD_{550}). Reakcijos, prieš pridedant *Purpald* reagento, buvo vykdytos Tris-HCl pH 8,0 buferyje, esant dviem skirtingoms fermento koncentracijoms (9 ir 18 mg/mL), 5 mM 2'-*O*-metilcitidino, 10 mM α -KG ir 1 mM askorbato. Dėl šalutinės sąveikos ir gaunamo teigiamo signalo į reakcijos mišinį nebuvo papildomai dedamas $FeSO_4$, todėl, žinant, kad be papildomo Fe(II) jonų šaltinio FJS katalitinis aktyvumas nėra optimalus, reakcijos vykdytos ilgesnį laiką, t. y. 4 h 30 °C temperatūroje. Reakcijos analizė vykdoma lyginant neigiamas kontroles (reakcijos mišinį be fermento bei tirpalą su fermentu) bei teigiamą kontrolę (5 mM formaldehido tirpalą).

FJS demetilazės katalizuojamos reakcijos lygtis su 2'-*O*-metilcitidinu, sudaryta remiantis pateiktais fermentinio aktyvumo tyrimais *in vitro* ir bendromis nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių superšeimos fermentų savybėmis, pateikta **3.1 pav. D** dalyje.



3.1 pav. FJS demetilazės katalizuojamos reakcijos schema ir reakcijos produktų nustatymas:

A. FJS aktyvumo analizė TLC metodu. Cm – 2'-O-metilcitolinas, Asc – askorbatas, α -KG – α -ketoglutaratas;

B. FJS aktyvumo nustatymas HPLC-MS metodu. Pateiktose chromatogramose sugertis matuota esant 279 nm bangos ilgiui, pateikti masių spektrai matuoti esant teigiamai jonizacijai.

C. Formaldehido nustatymas FJS demetilazės katalizuojamos reakcijos mišinyje *Purpald* reagentu. OD₅₅₀ – optinis tankis, esant 550 nm bangos ilgiui.

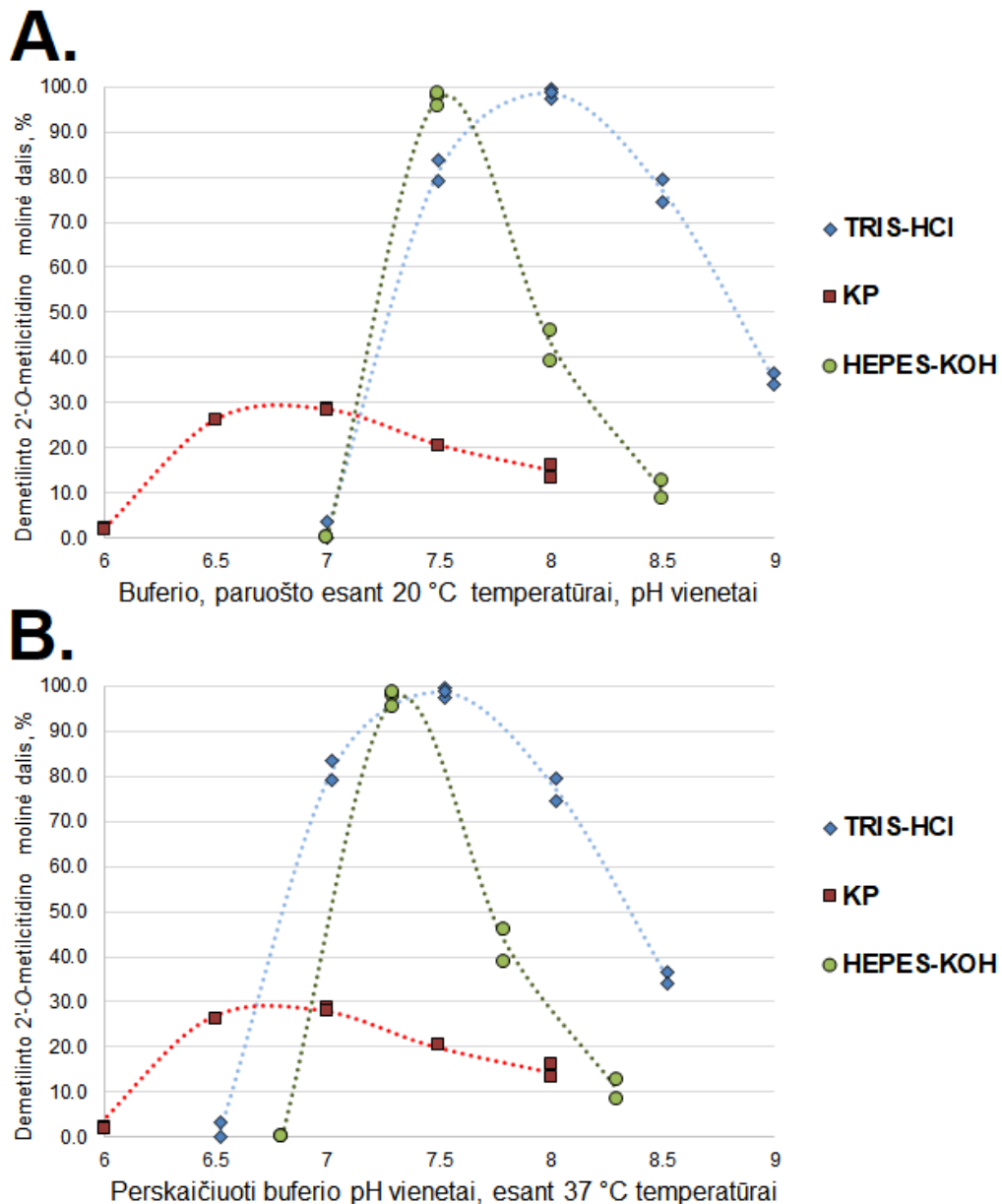
D. FJS demetilazės katalizuojamos reakcijos schema. Schema sudaryta remiantis nuo α -KG ir Fe(II) jonų priklausomų oksigenazių katalizuojamų reakcijų bendrais bruožais ir **3.1 pav. A, B** ir **C** dalyse pateiktais FJS demetilazės aktyvumo tyrimais.

Kaip minėta literatūrinėje dalyje, 2'-*O*-metilnukleozidų katabolizmas nėra plačiai išnagrinėtas – yra žinomos tik kelios šių modifikuotų nukleozidų hidrolazės, kurių katalizuojamų reakcijų metu susidaro heterociklinė bazė ir ribozė. Taigi, FJS demetilazė yra unikalus fermentas, turintis anksčiau literatūroje neaprašytą aktyvumą, todėl tolesnio darbo metu buvo tiriamos tiek potencialiam biotechnologiniam pritaikymui reikšmingos fermentinės savybės, tiek savybės, svarbios plečiant fundamentines žinias apie 2'-*O*-metilnukleozidų katabolizmą ir 2'-*O*-metilnukleozidų demetilinimą katalizuojančių fermentų biologinę funkciją.

3.1.1. Dvivalenčių metalo jonų, buferio prigimties ir pH įtaka FJS demetilazės aktyvumui

Charakterizuojant nuo α -KG ir Fe(II) jonų priklausomą demetilazę FJS, buvo patikrinta skirtingų divalenčių metalų jonų įtaka FJS demetilazės aktyvumui – fermentas valandą buvo inkubuojamas lede su 5 mM Fe²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ ir be papildomų divalenčių metalo katijonų, tada, mišinį papildžius 1 mM askorbato bei 5 mM substrato 2'-*O*-metilцитидино, vykdyta fermentinė reakcija (1 h 37 °C), po kurios reakcijos mišiniai analizuoti HPLC-MS metodu. Kaip ir buvo galima tikėtis, po inkubavimo lede FJS aktyvumas stebėtas tik su Fe²⁺ jonais – kiti divalenčiai metalų jonai nuo α -KG ir Fe(II) jonų priklausomų oksigenazių fermentinį aktyvumą įprastai slopina (Rose ir kt., 2011). Reakcijos išeiga taip pat sumažėjo apie 90 % α -ketoglutaratą reakcijos mišinyje pakeitus vienu anglies atomu trumpesniu piruvatu.

Toliau charakterizuojant FJS demetilazę, matuota šio fermento priklausomybė nuo buferio prigimties ir jo pH vertės. Iš literatūros žinoma, kad nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių optimalaus pH veikimo intervalas dažniausiai būna tarp 7,0 ir 8,0 (McNeill ir kt., 2005). Todėl buvo pasirinkti buferiai, kurių pK_a reikšmės yra maždaug 8,0: TRIS-HCl (20 °C pK_a = 8,30), kalio fosfato (20 °C pK_a = 7,21) ir HEPES-KOH (20 °C pK_a = 7,55). Reakcijos mišinys buvo sudarytas iš 100 mM atitinkamo buferio, 0,5 mg/mL FJS demetilazės, 5 mM 2'-*O*-metilцитидино, 1 mM askorbato ir 0,5 mM FeSO₄. Reakcijos vykdytos 1,5 h 37 °C temperatūroje, po reakcijos sustabdymo acetonitrilu gautas supernatantas analizuotas HPLC-MS metodu. Gauti duomenys pateikti grafike (3.2 pav. A).



3.2 pav. FJS demetilazės aktyvumo priklausomybės nuo buferio prigimties ir pH vertės tyrimas:

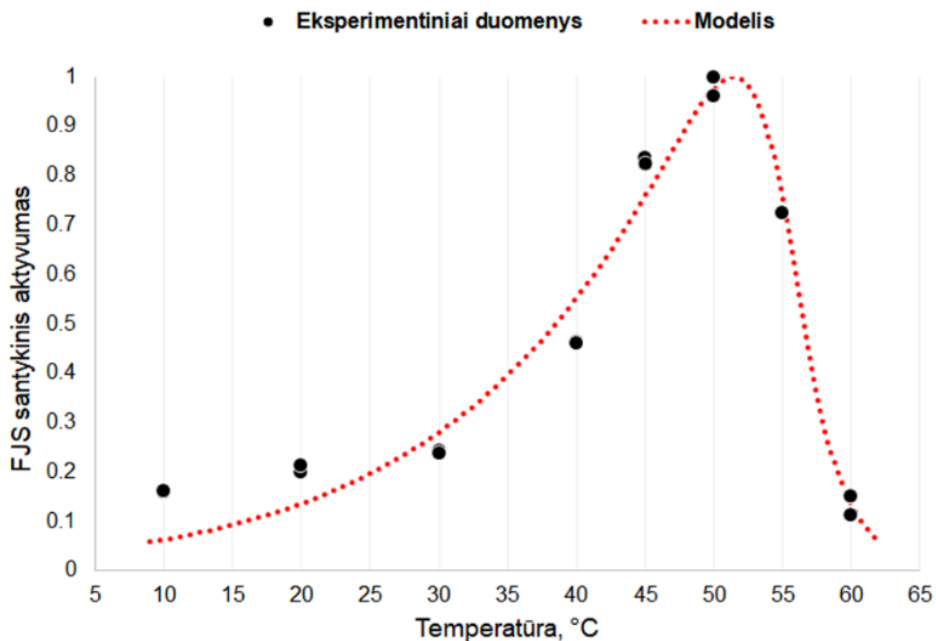
A. FJS aktyvumo priklausomybė nuo buferio prigimties ir pH, X ašyje atidedant buferių pH vertes 20 °C temperatūroje;

B. Modifikuotas FJS priklausomybės nuo buferio prigimties ir pH vertės grafikas, X ašyje atidedant perskaičiuotas teorines pH vertes 37°C temperatūroje.

Didžiausias FJS aktyvumas stebėtas TRIS-HCl pH 8,0 (esant 20 °C) ir HEPES-KOH pH 7,5 (esant 20 °C) buferiuose. Perskaičiuavus buferių pH ir patikslinus, koks jis iš tiesų būtų reakciją vykdant 37 °C temperatūroje, buvo gauta, kad FJS demetilazės optimalus aktyvumas yra TRIS-HCl ar HEPES-KOH buferyje, kai buferio pH reikšmė apytiksliai lygi 7,5 (**3.2 pav. B dalis**).

3.1.2. FJS optimalios veikimo temperatūros ir termostabilumo matavimas

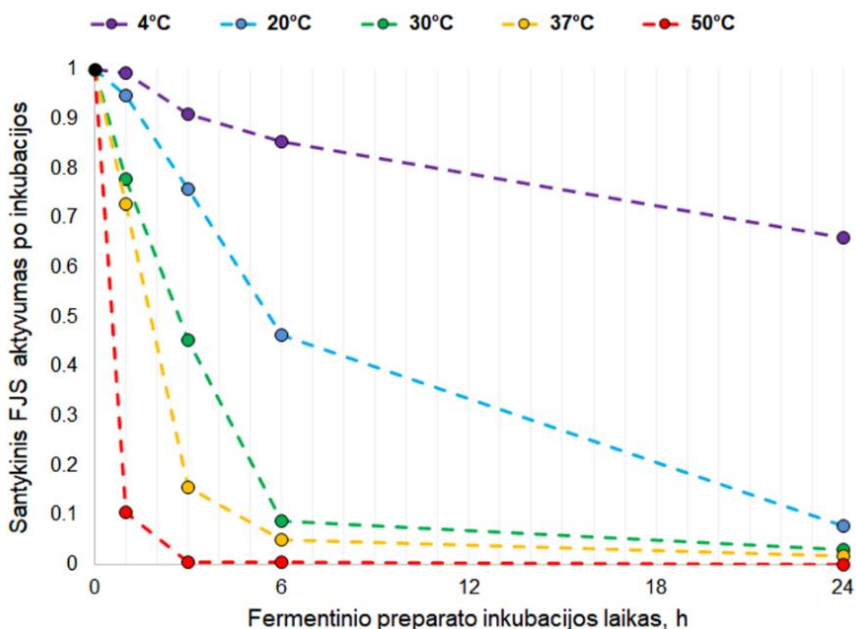
Norint išsiaiškinti, kokioje temperatūroje vykdant 2'-*O*-metilnukleozidų biokonversiją FJS oksigenaze metu gaunamas didžiausias demetilinto (dealilinto) produkto kiekis, buvo tiriama optimali fermentinio aktyvumo temperatūra ir termostabilumas. Optimali FJS veikimo temperatūra buvo nustatoma vykdant reakcijas 30 min 10–60 °C temperatūroje 10 °C intervalais (**3.3 pav.**). Bandyto metu stebėta daugeliui fermentų būdingos varpo formos aktyvumo priklausomybės nuo temperatūros kreivė, o didžiausias aktyvumas nustatytas 50 °C temperatūroje. Toliau analizuojant duomenis, gautiems eksperimentiniams rezultatams buvo panaudotas Wojcik ir Miłek (2016) aprašytas matematinis modelis, kurį pritaikius gauta 51,3 °C fermento veikimo optimalios temperatūros vertė. Žinoma, dėl riboto fermentų termostabilumo, norint gauti kuo didesnę kiekį produkto, tokioje temperatūroje vykdyti reakcijas nėra optimalu, todėl toliau buvo matuotas FJS oksigenazės termostabilumas.



3.3 pav. FJS demetilazės optimalios veikimo temperatūros nustatymas.

Jau iš ankstesnių tyrimų metu padarytų empirinių įžvalgų buvo pastebėta, kad FJS oksigenazė yra labilus fermentas. Išgrynintą baltymą pakartotinai užšaldant ir atšildant, dializuojant 4 °C temperatūroje per nakt ar tiesiog ilgesnį laiko tarpą išgrynintą fermentą saugant –20 °C temperatūros šaldiklyje, stebimas fermentinio aktyvumo praradimas, o ilgai (pvz., 4 h ar per nakt) vykdant reakcijas 37 °C temperatūroje susidaro baltos nuosėdos – baltymas agreguoja. Siekiant kvantifikuoti šį pastebėjimą, temperatūrinis FJS stabilumas buvo

tiriamas inkubuojant fermentinį preparatą 4, 20, 30, 37 ir 50 °C temperatūrose. Fermentą inkubavus atitinkamoje temperatūroje 1, 3, 6 ir 24 valandas, į mėginį buvo pridama 2'-*O*-metilcitolino, askorbato bei FeSO₄, gautas reakcijos mišinys buvo inkubuojamas 30 min 50 °C temperatūroje. Iš šio bandymo rezultatų, pateiktų **3.4 pav.**, matyti, kad empiriniai pastebėjimai pasitvirtino – FJS demetilazė nėra termiškai stabilus fermentas. Išlaikius fermentą 6 valandas 4 °C temperatūroje, FJS demetilazės aktyvumas sumažėjo 14,5 %, 20 °C – 53,8 %, 30 °C – 91,3%, 37 °C – 95,0 %. Po inkubacijos 50 °C temperatūroje, kurioje buvo išmatuotas didžiausias FJS demetilazės veikimo greitis, fermentinis aktyvumas krito labiausiai: po vienos valandos inkubacijos stebėtas 89,5 % mažesnis fermentinis aktyvumas, o po trijų valandų aktyvumas sumažėjo 99,6 %.



3.4 pav. FJS demetilazės termostabilumo tyrimas. Tyrimas atliktas 50 mM Tris HCl pH 8,0 buferyje su 10 % glicerolio, prieš reakciją skirtingose temperatūrose inkubuojant 4 mg/mL FJS demetilazės.

Tai, kad FJS demetilazė yra nestabilus fermentas rodo ir sekos analizė ProtParam bioinformatiniu įrankiu: šio įrankio apskaičiuotas rekombinantinio FJS nestabilumo indeksas yra 41,40 (be His₆ fragmento nestabilumo indeksas dar didesnis – jo reikšmė lygi 42,05), o didesnė nei 40 nestabilumo indekso reikšmė rodo, kad baltymas yra termodinamiškai nestabilus (Gasteiger ir kt., 2005).

3.1.3. FJS substratinio specifiškumo kiekybinis įvertinimas

Viena iš svarbiausių fermento savybių yra jo substratinis specifiškumas, dar vadinamas savitumu. Kadangi ankstesnių tyrimų metu FJS demetilazės substratinis specifiškumas buvo nustatytas tik kokybiškai, todėl šio darbo metu buvo nuspręsta HPLC-MS metodu kiekybiškai (skaičiuojant integruotą plotą po chromatogramų smailėmis ir lyginant jį su substratų ir produktų kalibracinėmis kreivėmis) įvertinti, su kuriais modifikuotais nukleozidais rekombinantinės FJS demetilazės fermentinis aktyvumas yra didžiausias, o su kuriais – mažiausias. Iš viso buvo patikrinti aštuoni 2'-*O* pozicijoje metilinti, po vieną 2'-*O*-alilintą, 3'-*O*-metilintą ir 3'-*O*-alilintą uridino junginį (**3.1 lentelė**). Taip pat buvo patikrintas ir FJS fermentinis aktyvumas su 2'-*O*-metilnukleozidų trifosfatais bei naudojant Dm-dNK nukleozidų kinazę ir 2'-*O*-metil-5-metilcitidiną (m5Cm) susintetintu 2'-*O*-metil-5-metilcitidino monofosfatu (m5CmMP) – po sintezės buvo gautas ~19 % grynumo m5Cm ir m5CmMP mišinys.

Substratas	Suskaidyto substrato molinis kiekis, %	Produktas
2'- <i>O</i> -Metil-5-metilcitidinas	100	5-Metilcitidnas
2'- <i>O</i> -Metiluridinas	90,3 ± 2,5	Uridinas
2'- <i>O</i> -Metil-5-metiluridinas	85,7 ± 5,0	5-Metiluridinas
2'- <i>O</i> -Metilcitidinas	84,7 ± 0,9	Citidinas
2'- <i>O</i> -Metiladenozinas	83,3 ± 1,7	Adenozinas
2'- <i>O</i> -Metil-5-fluoruridinas	82,0 ± 2,9	Fluoruridinas
2'- <i>O</i> -Metilguanozinas	69,3 ± 6,6	Guanozinas
2'- <i>O</i> -Metilinozinas	63,3 ± 2,6	Inozinas
2'- <i>O</i> -Aliluridinas	69,7 ± 2,1	Uridinas
3'- <i>O</i> -Metiluridinas	0	–
3'- <i>O</i> -Aliluridinas	0	–
2'- <i>O</i> -Metiladenozino 5'-trifosfatas	0	–
2'- <i>O</i> -Metilguanozino 5'-trifosfatas	0	–
2'- <i>O</i> -Metilcitidino 5'-trifosfatas	0	–
2'- <i>O</i> -Metiluridino 5'-trifosfatas	0	–
2'- <i>O</i> -Metil-5-metilcitidino 5'-monofosfatas*	0	–

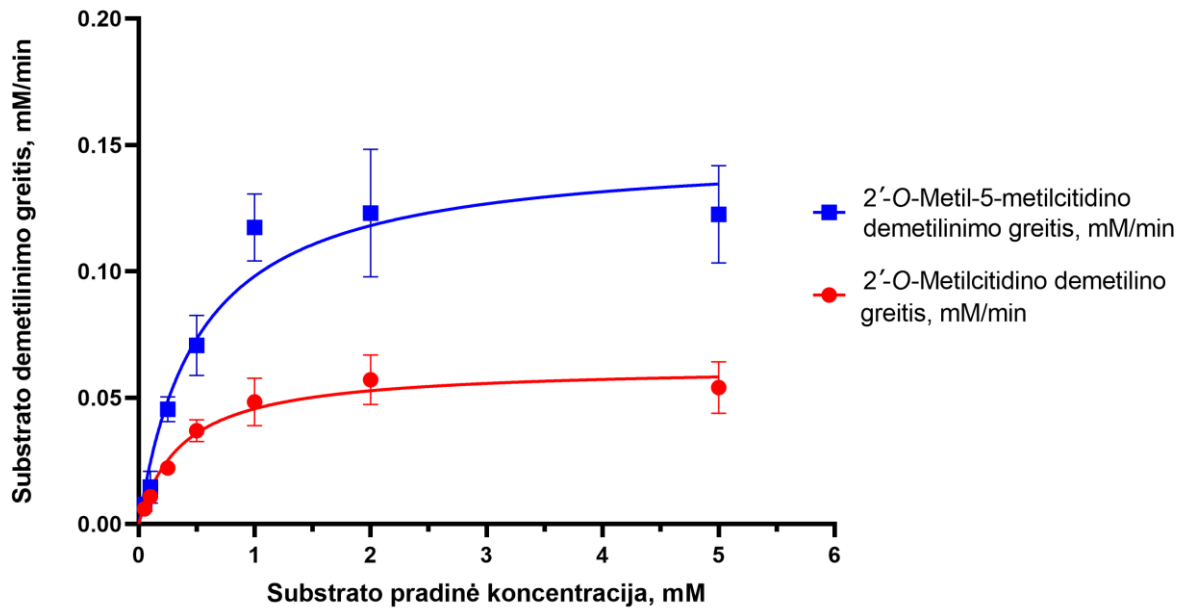
3.1 lentelė. FJS demetilazės substratinis specifiškumas. Suskaidyto substrato kiekis pateiktas procentais su šalia nurodytu standartiniu nuokrypiu (atlikti 3 pakartojimai), * žymi naudotą negryną substratą. Reakcijos buvo vykdytos 1 h 37 °C standartinėmis sąlygomis su 0,5 mg/mL FJS.

Iš rezultatų, pateiktų **3.1 lentelėje**, matyti, kad fermentas demetilavimo reakcijas vykde su visais išbandytais 2'-*O*-metilnukleozidais. Su 2'-*O*-metilnukleozidų trifosfatais FJS demetilazės fermentinis aktyvumas nebuvo stebėtas, o vykdant reakciją su m5CmMP ir m5Cm mišiniu aktyvumas stebėtas tik su 2'-*O*-metilintu nukleozidu – demetilinto monofosfato produktas nesudarė. FJS fermentinis aktyvumas taip pat nebuvo užfiksuotas ir su 3'-*O* pozicijoje modifikuotais nukleozidais. Išanalizavus rekombinantinio FJS substratinį specifiškumą, galima teigti, kad FJS geba katalizuoti 2'-*O*-metilnukleozidų demetilimą 2'-*O* pozicijoje, jei šie nukleozidai nėra fosforilinti, bei 2'-*O* aliluridino dealilinimą. Didžiausias fermentinis aktyvumas stebėtas su m5Cm (visų 3 pakartojimų metu suskaidyta 100 % substrato), o mažiausias – su 2'-*O*-metilguanozinu, 2'-*O*-aliluridinu bei 2'-*O*-metilinozinu.

3.1.4. FJS demetilazės kinetiniai tyrimai

Norint įvertinti fermento vykdomą katalizę, svarbu įvertinti ne vien substratinį specifiškumą, bet ir Michaelis-Menten kinetines konstantas. Nustačius, kad nukleozidų ir 2'-*O*-metilnukleozidų UV spektrai yra identiški, FJS demetilazės kinetiniai matavimai vykdyti HPLC-MS metodu, reakcijas stabdant acetonitrilu. Šio darbo metu FJS demetilazės katalizuojamos reakcijos kinetiniai parametrai buvo nustatyti su dviem substratais – 2'-*O*-metilcitudinu, kurį naudojant matuotos ir kitos FJS demetilazės charakteristikos, bei 2'-*O*-metil-5-metilcitudinu, su kuriuo stebėtas didžiausias fermentinis aktyvumas. Reakcijos vykdytos 30 °C temperatūroje standartiniuose reakcijos mišiniuose, pridedant 1 mg/mL FJS demetilazės. Pradinis reakcijos greitis įvertintas bent iš trijų atliktų bandymų (N = 3), Michaelis-Menten kinetiniai parametrai buvo apskaičiuoti vykdant nelinijinę regresiją, naudojant GraphPad Prism programinės įrangos 9.3.1 versiją, analizės vizualizacija pateikta **3.5 pav.**

Kaip matome iš **3.5 pav.**, gautos fermentams tipinės formos reakcijos greičio priklausomybės nuo pradinio greičio kreivės, stebimas fermento įsotinimas substratu. Eksperimentiniams taškams pritaikius nelinijinę regresiją, reakcijai su 2'-*O*-metilcitudinu gauta teorinė maksimalaus greičio vertė $V_{\max} = 0,063 \pm 0,003$ mM/min ($k_{\text{cat}} = 250 \pm 12$ s⁻¹), Michaelis konstantos vertė $K_m = 0,370 \pm 0,070$ mM. Kaip buvo galima tikėtis iš substratinio specifiškumo tyrimo, reakcijai su 2'-*O*-metil-5-metilcitudinu gauta didesnė maksimalaus greičio vertė: $V_{\max} = 0,148 \pm 0,010$ mM/min ($k_{\text{cat}} = 586 \pm 40$ s⁻¹), reakcijos Michaelis konstanta $K_m = 0,513 \pm 0,101$ mM.



3.5 pav. FJS demetilazės reakcijos su 2'-*O*-metilcitolinu ir 2'-*O*-metil-5-metilcitolinu kinetinių parametru nustatymas. Reakcijos vykdytos 30 °C, reakcijos mišiniai (40 μL) sudaryti iš 1 mg/mL FJS demetilazės, 10 mM α-KG, 1 mM askorbato ir 0,5 mM FeSO₄.

3.2. FJS demetilazės homologų atranka ir tyrimas

Kadangi daugiau fermentų, pasižyminčiu tokiu katalitiniu aktyvumu kaip FJS demetilazė, literatūroje nėra aprašyta, buvo nuspręsta praplėsti žinomų nuo α-ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomos oksigenazių, demetilinančių 2'-*O*-metilnukleozidus, biblioteką. Tai buvo atlikta vykdant baltymų sekų paiešką, naudojant NCBI pBLAST (Altschul ir kt., 1990) bioinformatinį įrankį, kaip paieškos užklausa naudojant FJS seką, paieška vykdyta visų nepasikartojančių baltymų sekų duomenų bazėje. Taip buvo atrinktos dvi artimos FJS demetilazei homologinės sekos: viena iš neklasifikuotų *Acidosoma* bakterijų (RefSeq ID: WP_158801103.1, šiame darbe baltymas vadinamas **PHYA**), kita iš *Candidatus Poribacteria* bakterijos (GenBank ID: MYC78019.1, šiame darbe baltymas vadinamas **PHYP**). Baltymų sekų paieška naudojant pBLAST taip pat buvo vykdyta ir tarp virusų (taxid:10239) koduojamų baltymų, taip atrinktas artimiausias FJS virusinis homologas, kurio seka rasta 1,5 Mb dydžio 1452 baltymų koduojančiame (Andreani ir kt., 2021) amebų viruso *Fadolivirus 1* (GenBank ID: QKF94680.1, šiame darbe baltymas vadinamas **PHYF**). Įdomu tai, kad visi trys šie baltymai dėl savo sekos panašumo į žmogaus fitanoil-KoA dioksigenazės PHYH seką NCBI GenBank (Clark ir kt., 2016) ir RefSeq (O'Leary ir kt., 2016) duomenų bazėse įvardyti kaip

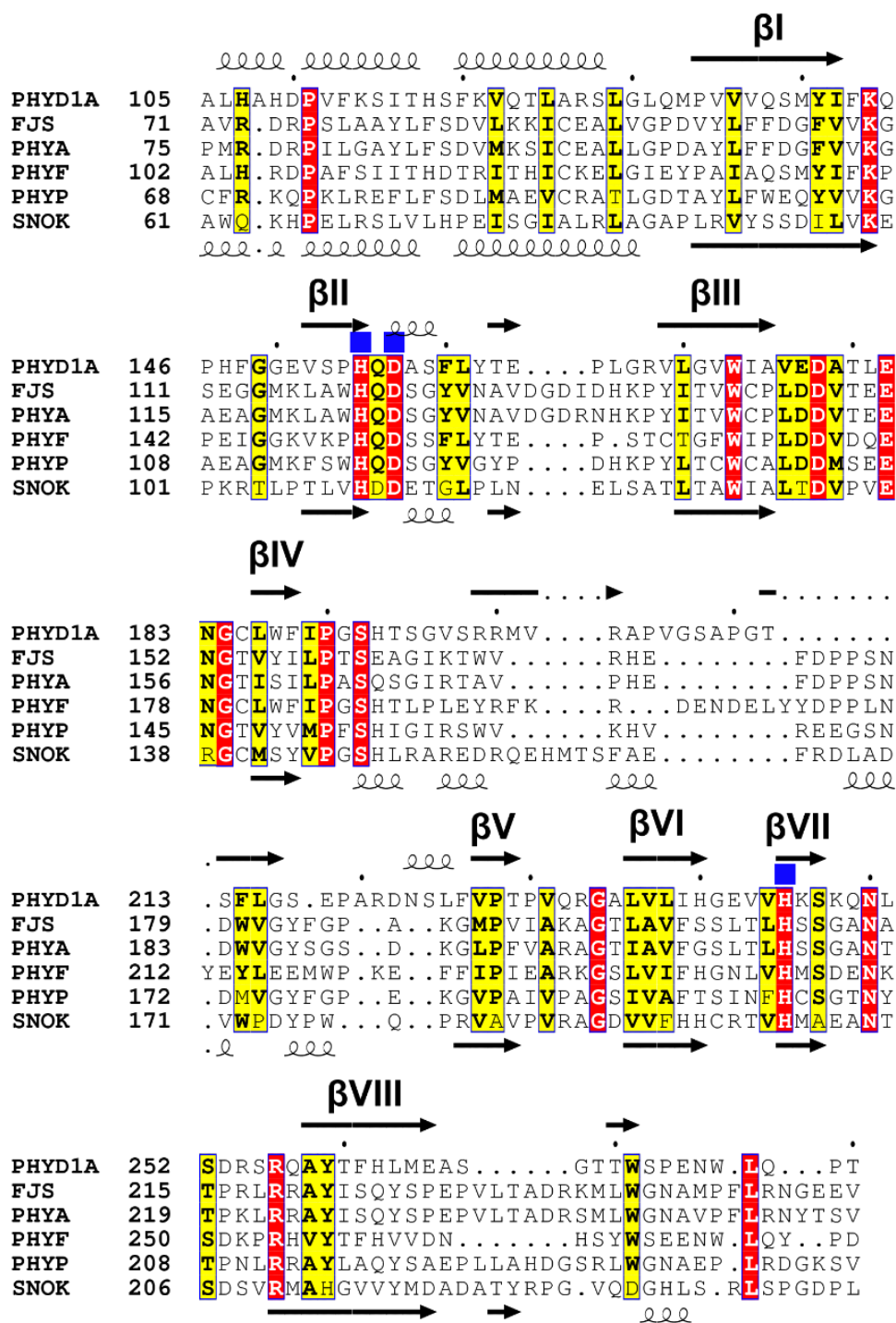
fitanoil-KoA dioksigenazės. Atrinkus sekas, buvo atlikta FJS demetilazės ir atrinktų jos homologų sekų palyginamoji analizė (3.6 pav.). Lyginant sekas poromis, artimiausia rasta homologinė seka yra PHYA, kurios sutapimas su FJS demetilazės seka yra 76,43 %, PHYP su FJS – 52,71 %, PHYF su FJS – 22,50 %.

	1																		
FJS	---	MSDFEV	IREQINQFRN	EGYALFDNAI	SSEELLEMLRE	DCAFPIRR	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PHYA	---	MLEKMSDFDV	SETERRRFRD	DGYAVPENAV	SPDLLAMLRE	ECAYFVRR	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PHYP	---	MKI	IDAQKQFQE	EGYFILENVI	PESLLELLRG	ECGTFISQ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PHYP	---	MSYL	TEBEIDFYNA	NGFLIENFF	NYADVRLMKM	RM DYILKNTF	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	71																		
FJS	---	EDEK	MDRLGVDQIG	ITHRNKR	---	YHAAFV	DRPSLAAYLF	SDVLKKTCEA	LVGPDVYLFF										
PHYA	---	EDEK	MDRMGVDQIG	ITHRNKR	---	YHAAFPMR	DRPILGAYLF	SDVMKSTCEA	LLGPDAYLFF										
PHYP	---	MDAD	MDRQDIDVLG	INHRNKR	---	YFVSNCFR	KQPKLREFLF	SDLMAEVCRA	LLGDAYLFF										
PHYP	---	YYFLDSADQI	KVFLEEKAIT	DGHLNRPLEM	---	AINKVAHALH	RDPAFSIITH	DTRITHICKE	LGIEYPAIAQ										
	141																		
FJS	---	DGFVVKGSEG	GMKLAWHQDS	GYVNAV DGD I	DHKPYITVWC	PLDDVTEENG	TVYILPTSEA	GIRTVRHEF											
PHYA	---	DGFVVKGAEA	GMKLAWHQDS	GYVNAV DGD R	NHKPYITVWC	PLDDVTEENG	TISILPASQS	GIRTVRHEF											
PHYP	---	EQYVVKGAEA	GMKFSWHQDS	GYVG	---	YF	DHKPYITCWC	ALDDMS EENG	TVYVMPFHSI	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PHYP	---	SMYIFKPPBI	GGKVKPHQDS	SPLY	---	R	EPSTCTGFWI	PLDDVDQENG	CLWFI PGSHT	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	211																		
FJS	---	DPPSNDWVG	---	---	YFGPAKGMF	VIAKAGTLAV	FSSLTLHSSG	ANATPRLRRA	YISQYSPEPV										
PHYA	---	DPPSNDWVG	---	---	YSGSDKGLP	FVARAGTIAV	FGSLTLHSSG	ANTTPKLRRA	YISQYSPEPV										
PHYP	---	EEGNSDMVG	---	---	YFGPEKGVF	AIVPAGSIVA	FTSINFHCSG	TNYPNLRRA	YLAQYSAEPL										
PHYP	---	KRDENDELYY	---	---	DPPLNVEYLE	EMWPKEFFIF	LEARKGSLVI	FHGNLVHMSD	ENKSDKPRHV	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	281																		
FJS	---	LTADRRKMLWG	NAMPFLRNGE	EVVGPVVDL	---	PYRIDRLSHG	NEQLSDVAKA	EKQAG											
PHYA	---	LTADRSMLWG	NAVFPFLRNYT	SVLGEPVVDL	---	PYRIDRLSHG	NEQLKSANG	---											
PHYP	---	LAHDGSRLLWG	NAEP	---	---	SVVGYPPPDI	ESRFD	---											
PHYP	---	DNHSYWS	EENW	---	---	CYPDD	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

3.6 pav. FJS, PHYA, PHYF ir PHYP baltymų aminorūgščių sekų palyginimas, atliktas naudojant Clustal Omega algoritmą (Sievers ir kt., 2011) ir SeaView programinę įrangą (Gouy ir kt., 2010).

3.2.1. FJS, PHYA, PHYF ir PHYP sekų palyginimas su žinomos struktūros baltymais

Vykdamas tolesnę FJS, PHYA, PHYF ir PHYP sekų analizę ir siekiant nustatyti oksigenazių katalitinės triados ir struktūrinių elementų pozicijas, naudojant Espresso algoritmą (Armougom ir kt., 2006) buvo atliktas šių baltymų sekų palyginimas su nustatytos struktūros panašios sekos nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomomis oksigenazėmis PHYD1A (PDB ID: 3OBZ, struktūriniai elementai identifikuoti remiantis Zhang ir kt., 2011) ir SNOK (PDB ID: 5EPA, struktūriniai elementai identifikuoti remiantis Siitonen ir kt., 2016). PHYD1A, FJS, PHYA, PHYF, PHYP ir SnoK konservatyvaus *DSBH* domeno sekų palyginimas pateiktas **3.7 pav.** – didžiausi skirtumai tarp sekų matyti β II– β III bei β IV– β V intarpuose, kurie gali būti skirtingų substratinių specifiškumą priežastimi.



3.7. pav. Žmogaus PHYD1A, FJS, PHYA, PHYF, PHYP ir SnoK (*Streptomyces nogalater*) amino rūgščių sekų palyginimas, atliktas naudojant Expresso algoritmą (Armougom ir kt., 2006) ir vizualizuotas naudojant ESPript programinę įrangą (Robert & Gouet, 2014). Viršuje nurodyti PHYD1A, apačioje – SnoK struktūriniai elementai, iš kurių raidėmis nurodytos konservatyviam *DSBH* domeniui priklausančios β klostės, mėlynais kvadratais pažymėtos His-X-Asp/Glu...His katalitinės triados aminorūgštys. Geltonai pažymėtos dideliu panašumu pasižyminčios, o raudonai – sutampančios aminorūgštys.

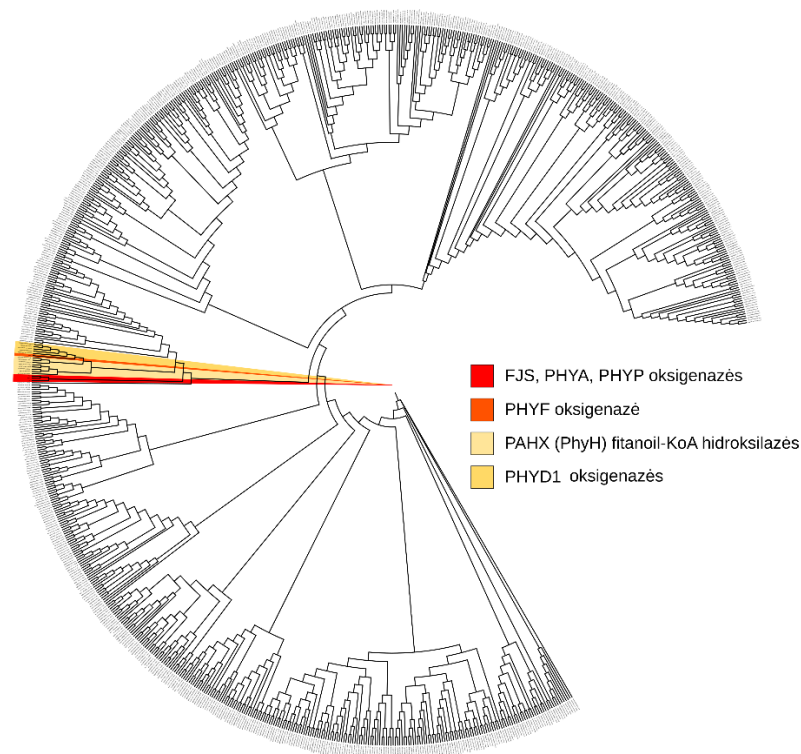
3.2.2. Charakterizuotų nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių filogenetinis medis

Toliau vykdant nuo 2'-*O*-metilnukleozidų demetilazės FJS ir jai homologinių sekų analizę, buvo atlikta filogenetinė šių ir kitų duomenų bazėje patikrintų (*reviewed*) α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių superšeimos baltymų sekų, rastų UniProtKB duomenų bazėje (The UniProt Consortium, 2021), analizė. Taip iš viso buvo atsirinktos 808 unikalios baltymų sekos, jų palyginys atliktas naudojant Clustal Omega algoritmą (Sievers ir kt., 2011), o filogenetinis medis konstruotas naudojant PhyML Maximum Likelihood algoritmą (Guindon & Gascuel, 2003) ir MEGA X programinę įrangą (Kumar ir kt., 2018), o gautas filogenetinis medis atvaizduotas pasitelkiant iTOL bioinformatinį įrankį (Letunic ir Bork, 2021), gauta filogenetinio medžio kladograma (**3.8 pav.**), prieinama internete, adresu: <https://itol.embl.de/tree/7863697304671653558748>.

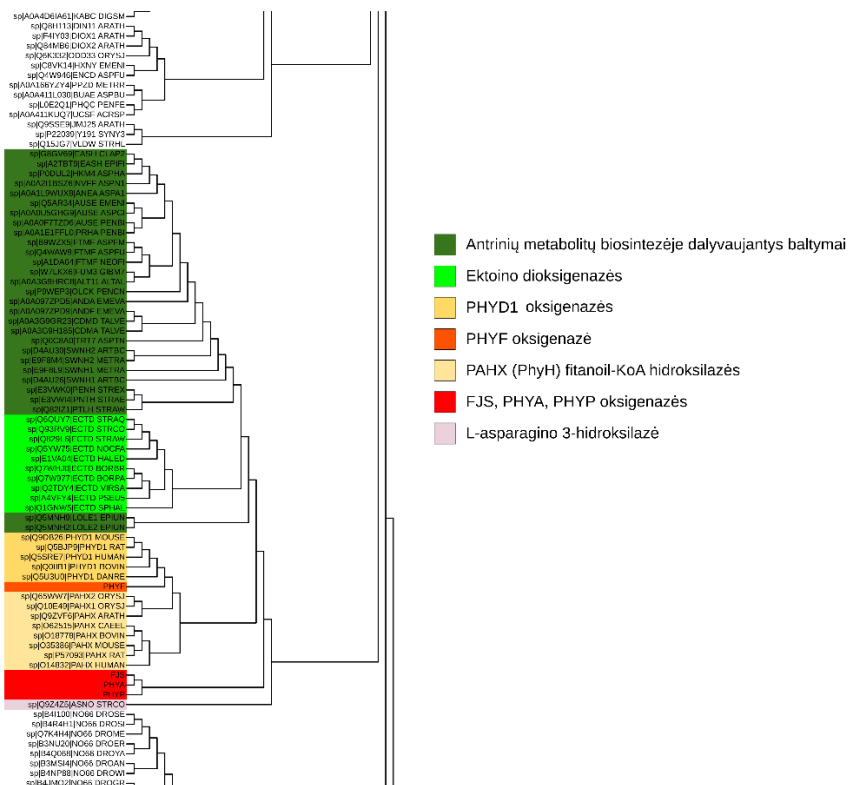
Remiantis filogenetinės analizės rezultatais galima teigti, kad FJS oksigenazės ir jos homologų PHYA, PHYF ir PHYH sekos yra artimos nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų fitanoil-KoA hidrosilazių PAHX (PhyH) sekoms, o didžiausiu panašumu fitanoil-KoA hidrosilazėms pasižymi PHYF seka. Atliekant filogenetinę analizę, PHYF oksigenazė buvo sugrupuota su PHYD1 oksigenazėmis. Todėl nenuostabu, kad PHYA, PHYF ir PHYH duomenų bazėse buvo automatiškai anotuotos kaip fitanoil-KoA hidrosilazės. Tiesa, nors PHYD1 oksigenazės priskiriamos fitanoil-KoA hidrosilazėms, tiriant išgrynintą rekombinantinę žmogaus PHYD1 baltymo A izoformą (PHYHD1A), šis fermento aktyvumas tiesiogiai nustatytas nebuvo, tai yra, po fermento inkubacijos su fitanoil-KoA reakcijos mišinyje nerasta susidariusių hidrosilintų produktų (Zhang ir kt., 2011). Įdomu tai, kad, tikrinant FJS demetilazės aktyvumą su fitanoil-KoA, po reakcijos stebėtas hidrolizuotas junginys (**1 priedas**), tačiau šiam aktyvumui patvirtinti reikalingi tolesni tyrimai.

FJS demetilazė bei jos homologai taip pat dalinasi ta pačia monofiletine grupe su antrinių metabolitų alkaloidų (pvz., loleinų, svainsonino) sintezėje dalyvaujančiais fermentais bei ektoino dioksinazėmis (EctD), kurios fiziologinėmis sąlygomis katalizuoja ektoino hidrolizę, tačiau gali katalizuoti ir prolino hidrosilinimo reakciją, kurios metu gaunamas *trans*-3-hidroksiprolinas (Hara ir kt., 2019). Tai rodo, kad ta pati nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausoma oksigenazė gali pasižymėti gan įvairiu substratiniu specifiskumu.

A.



B.



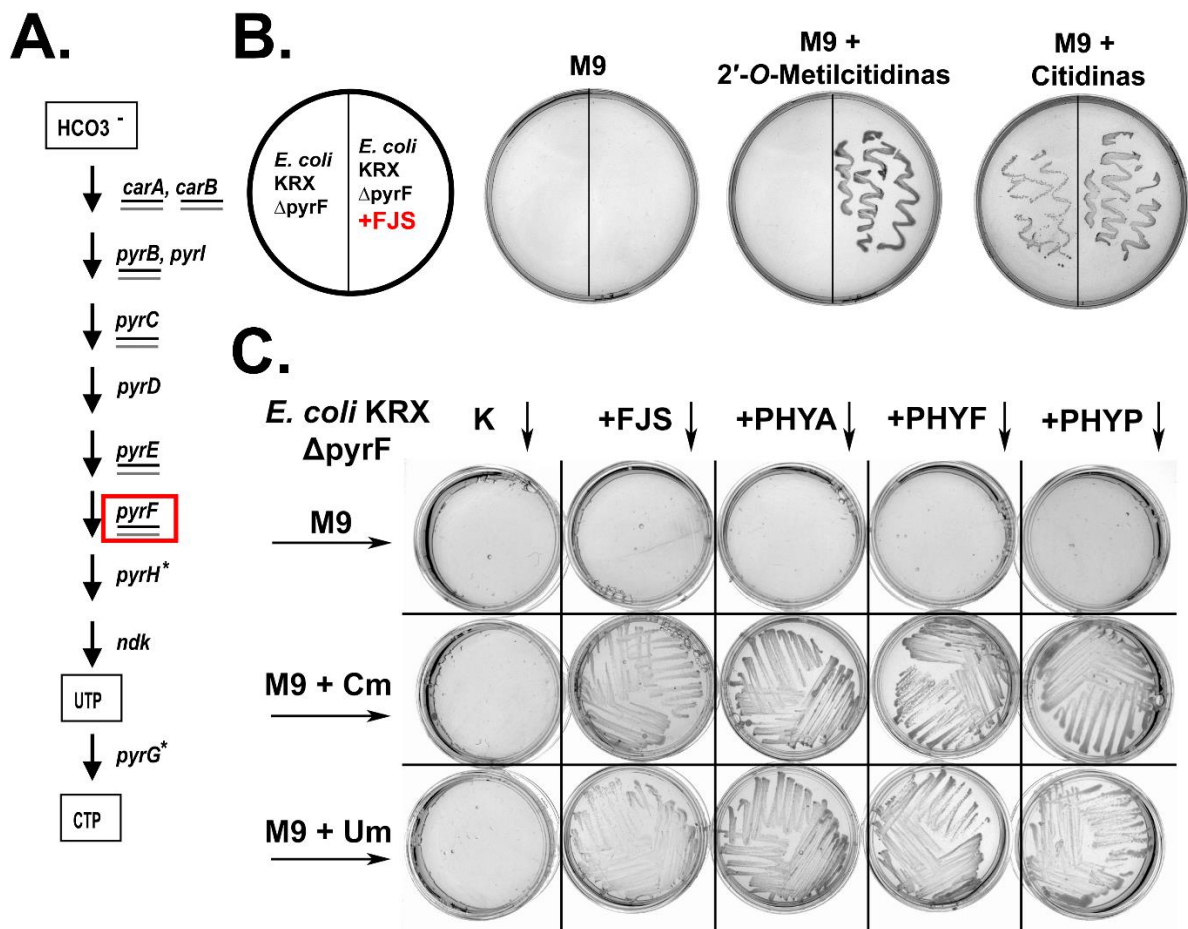
3.8. pav. FJS, PHYA, PHYP ir PHYF oksigenazių filogenetinė analizė:

A. FJS, PHYA, PHYP ir PHYF palyginio su žinomos funkcijos žinomų nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) priklausomų oksigenazių filogenetinio medžio kladograma.

B. Kladogramos šaka, kurioje yra FJS, PHYA, PHYP ir PHYF oksigenazės, šalia esantys baltymai grupėmis suskirstyti pagal UniProtKB duomenų bazėje pateiktus duomenis.

3.2.3. PHYA, PHYF ir PHYP fermentų aktyvumo tyrimas *in vivo*

Kadangi nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių superšeimos fermentai pasižymi didele katalizuojamų reakcijų įvairove, tai, kad PHYA, PHYF ir PHYP baltymų sekos yra artimos FJS demetilazės sekai, dar nereiškia, jog jos būtinai pasižymės tokiu pačiu aktyvumu. Siekiant nustatyti, ar PHYA, PHYF ir PHYP baltymai tikrai gali vykdyti 2'-O-metilnukleozidų biodegradaciją *in vivo*, buvo pasirinktas *E. coli* KRX Δ pyrF auktrofinis kamienas, neturintis pirimidino nukleotidų biosintezėje dalyvaujančio pyrF geno (3.9 pav. A), kuris yra būtinas ląstelių augimui (Samant ir kt., 2008).



3.9 pav. Oksigenazių aktyvumo nustatymas *in vivo*, naudojant auktrofinę *E. coli* KRX Δ pyrF kamieną:

A. *E. coli* pirimidinų biosintezėi reikalingi genai (Samant ir kt., 2008). Genai, reikalingi ląstelių gyvybingumui, pabraukti dviem brūkšniais, pyrF genas apibrauktas raudonai.

B. FJS demetilazę koduojančio geno komplimentarumas *E. coli* KRX Δ pyrF kamienui.

C. PHYA, PHYF ir PHYP oksigenazių aktyvumo nustatymas *in vivo*. Cm – 2'-O-metilcitridinas, Um – 2'-O-metiluridinas.

FJS demetilazę koduojančio geno komplimentarumas *E. coli* KRX Δ pyrF kamienui buvo patikrintas vykdant FJS aktyvumo nustatymą *in vivo*. Transformavus *E. coli* KRX Δ pyrF ląsteles pLATE-FJS plazmide, bakterijos buvo išsėjamos ant LB terpės. Užaugus transformantams, atrinkta viena kolonija, kuri lygiagrečiai persėjama ant trijų skirtingų Petri lėkštelių su agarizuota M9 minimalia terpe: be jokio pirimidinų šaltinio, su 1 μ g/mL 2'-*O*-metilцитидино ar 1 μ g/mL citidino. Kaip matyti iš **3.9. pav. B** dalies, kontrolinės KRX Δ pyrF ląstelės gali augti vieninteliu atveju – kai terpėje yra citidino. Tuo tarpu KRX Δ pyrF bakterijos, vykdančios FJS sintezę, gali augti tiek terpėje su citidinu, tiek ir su 2'-*O*-metilцитидину.

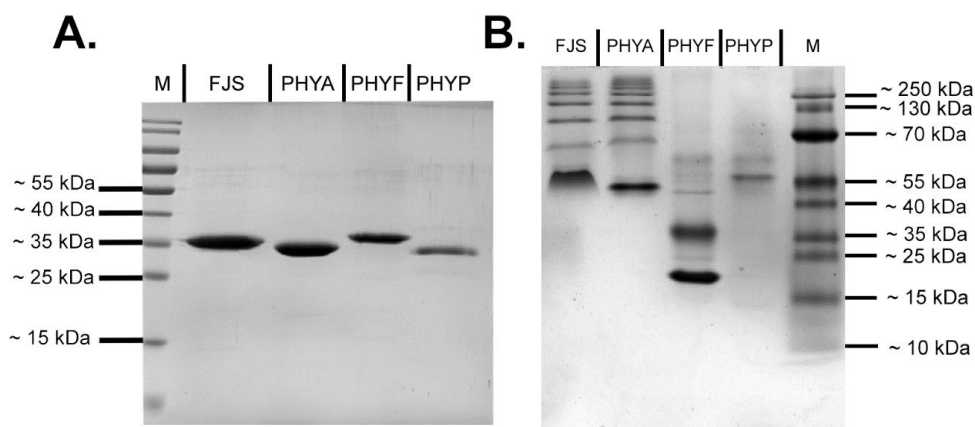
Įsitikinus *E. coli* KRX Δ pyrF kamieno auksotrofinėmis savybėmis, toks pats eksperimentas buvo atliktas *E. coli* KRX Δ pyrF ląsteles transformuojant į pET-21a vektorių įterptais PHYA, PHYF ir PHYP baltymus koduojančiais genais ir kontroline plazmide – pET-21a vektoriumi. Transformuotos *E. coli* KRX Δ pyrF ląstelės buvo persėtos ant M9 terpės su 2'-*O*-metilцитидину (**Cm**) ir 2'-*O*-metiluridinu (**Um**). Rezultatas, pateiktas **3.9 pav. C** dalyje, rodo, kad tiek PHYA, tiek PHYF, tiek PHYP, kaip ir FJS, yra aktyvūs fermentai *in vivo* – visais atvejais, kai *E. coli* KRX Δ pyrF ląstelės vykdė šių baltymų sintezę, vyko ir 2'-*O*-metilцитидино bei 2'-*O*-metiluridino biodegradacija. Tačiau šiuo metodu neparodoma, ar PHYA, PHYF ir PHYP oksigenazių katalizinis aktyvumas sutampa su FJS oksigenazės demetilaziniu aktyvumu – šiam tikslui turėjo būti išgryninti visi homologai ir jų aktyvumas nustatytas *in vitro*.

3.2.4. Rekombinantinių PHYA, PHYF ir PHYP fermentų gryninimas ir aktyvumo tyrimas *in vitro*

Siekiant nustatyti, ar pagal sekas atrinktos nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomos oksigenazės yra aktyvios *in vitro* ir palyginti jų katalizinį aktyvumą su FJS demetilaze, buvo atlikta šių fermentų biosintezės optimizacija ir rekombinantinių PHYA, PHYF ir PHYP baltymų su His₆ fragmentu C gale gryninimas iš *E. coli* ląstelių. PHYF rekombinantinio baltymo sintezė buvo vykdoma *E. coli* BL21(DE3) kamiene, indukuojant su 0,5 mM IPTG ir toliau ląsteles auginant 4 h 30 °C temperatūroje. Dėl mažo baltymų tirpumo auginant šiomis sąlygomis PHYA ir PHYP sintezės buvo vykdomos žemesnėse temperatūrose ilgesnį laiką: PHYA – *E. coli* BL21(DE3) kamiene, indukuojama su 0,2 mM IPTG ir po indukcijos auginant 16 °C temperatūroje pernakt, PHYP – *E. coli* ArcticExpress (DE3) kamiene, indukuojant 0,05 mM IPTG ir po indukcijos bakterijas auginant 12 °C temperatūroje pernakt. Maža PHYA ir PHYP baltymų dalis supernatante ir didelė nuosėdose gali būti

paiškinta mažu šių baltymų stabilumu – pagal sekų analizę ProtParam bioinformatiniu įrankiu, rekombinantinio PHYA nestabilumo indeksas yra 48,94, rekombinantinio PHYP – 42,67. Teoriniu stabilumu iš šiame darbe tirtų oksigenazių pasižymi tik PHYF – šio baltymo nestabilumo indekso reikšmė yra 38,53 (baltymas klasifikuojamas kaip stabilus).

Rekombinantiniai baltymai su His₆ fragmentu C gale buvo gryninti iš belastelinio ekstrakto Ni²⁺ giminingumo chromatografijos būdu, KCl ir imidazolas iš mėginių buvo pašalinami mėginius su tiksliniais baltymais leidžiant per HiTrap Desalting kolonėlę, naudojant 50 mM Tris-HCl pH 8,0 buferį su 10 % glicerolio. Po nudruskinimo PHYA ir PHYP fermentiniai preparatai buvo papildomai gryninami jonų mainų chromatografijos metodu ir dar kartą nudruskinami. Gryninimo etapų analizė pateikta **2 priede**. Po koncentravimo vykdyta PHYA, PHYF ir PHYP fermentinių preparatų analizė PAGE metodu su ir be natrio dodecilsulfato (NDS) pateikta **3.10 pav.**, rekombinantinių baltymų molekulinės masės (MW) ir izoelektrinio taško pI vertės apskaičiuotos pagal aminorūgščių sudėtį: FJS – 32,87 kDa, pI = 5,70; PHYA – 32,60 kDa, pI = 6,00; PHYF – 34,44 kDa, pI = 4,97, PHYP – 30,15 kDa, pI = 5,68. Kaip matome iš **3.10 pav A** dalies, pasiektas pakankamai didelis fermentinių preparatų grynumas, o baltymų pasiskirstymas denatūruojančiame gelyje atitinka pagal aminorūgščių seką apskaičiuotas vertes. Kadangi ankstesnių tyrimų metu gelfiltracine chromatografija nustatyta, kad FJS yra dimerinis baltymas, o FJS, PHYA ir PHYP baltymų pI vertės yra panašios ir juda gelyje panašiai, iš **3.10 pav B** dalyje pateikto rezultato galima numanyti, kad PHYA ir PHYP taip pat yra dimeriniai baltymai.

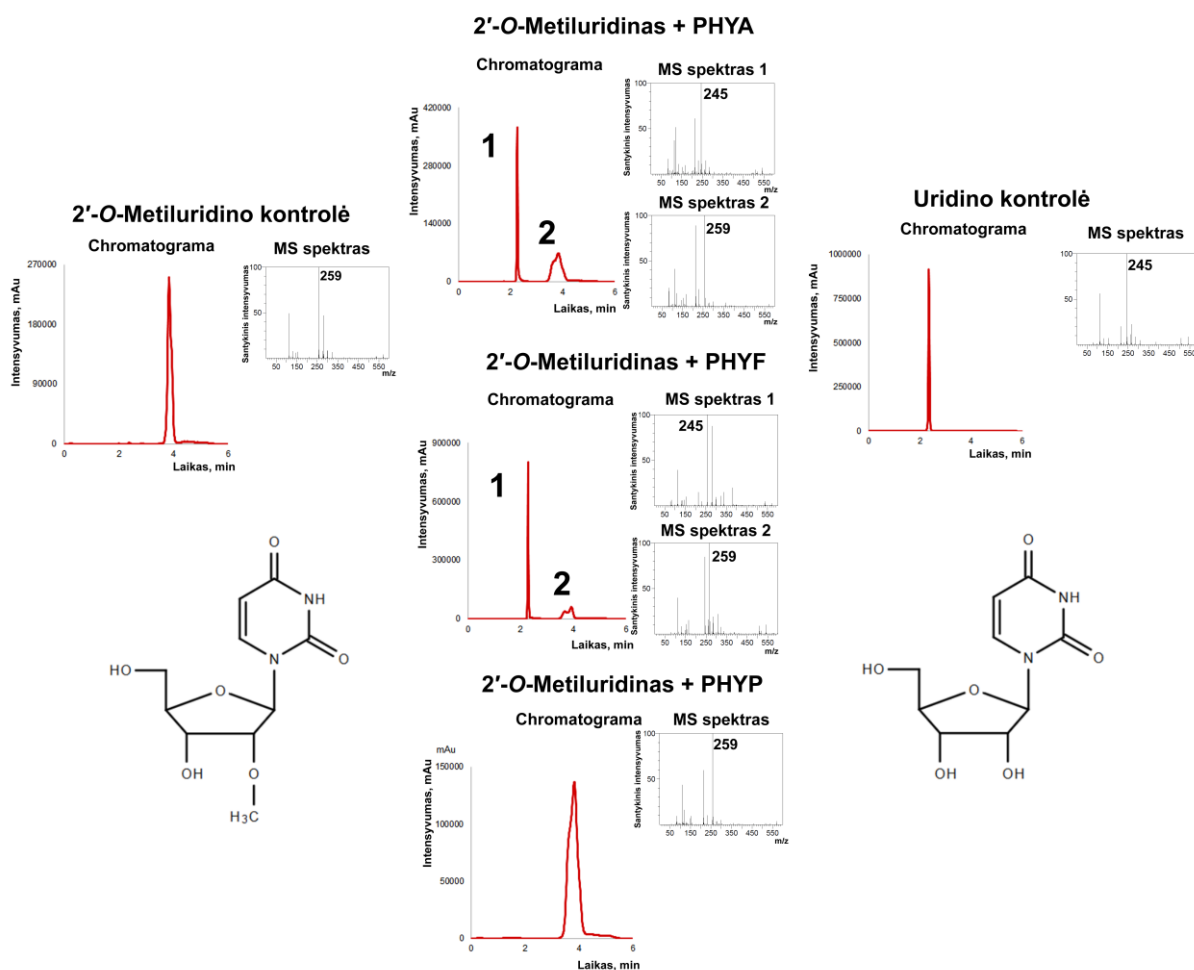


3.10 pav. Išgrynintų FJS, PHYA, PHYF ir PHYP fermentinių preparatų analizė PAGE metodu 14 % poliakrilamido gelyje:

A. Denatūruojančiomis sąlygomis (su NDS). M – molekulinės masės žymuo.

B. Natyviomis sąlygomis.

Išgryninus PHYA, PHYF ir PHYP baltymus, buvo nustatomas jų aktyvumas *in vitro*, vykdamant standartines reakcijas su 2'-O ir 3'-O pozicijose modifikuotais nukleozidais. Po 2 valandų (PHYP atveju, 2 ir 20 h) inkubacijos 37 °C temperatūroje, reakcijos mišinių sudėtis tikrinta HPLC-MS metodu. Pavyzdinės reakcijų analizės su 2'-O-metiluridinu pateiktos **3.11 pav.** Kaip matyti iš šio paveikslėlio, aktyvumas stebėtas, 2'-O-metiluridiną inkubuojant su FJS, PHYA bei PHYF oksigenazėmis, reakcijos metu gauto junginio m/z santykis 14 vienetų mažesnis už 2'-O-metiluridiną, tai indikuoja metilo grupės atskilimą.



3.11 pav. Išgrynintų PHYA, PHYF ir PHYP fermentų aktyvumo nustatymas *in vitro* HPLC-MS metodu, kai substratu buvo 2'-O-metiluridinas. Reakcijos su FJS, PHYA ir PHYF vykdytos 2 h 37 °C temperatūroje, su PHYP – 20 h 30 °C.

Atlikus kokybinę PHYA ir PHYF oksigenazių substratinio specifiškumo analizę paaiškėjo, kad abiejų oksigenazių aktyvumai sutapo su FJS demetilazės aktyvumu *in vitro* – buvo demetilinti 2'-O-metilnukleozidai bei 2'-O-aliluridinas ir, kaip ir FJS demetilazės atveju, aktyvumas nebuvo stebėtas su 3'-O-metiluridinu, 3'-O-aliluridinu, 2',3'-O-izopropilidenuridinu

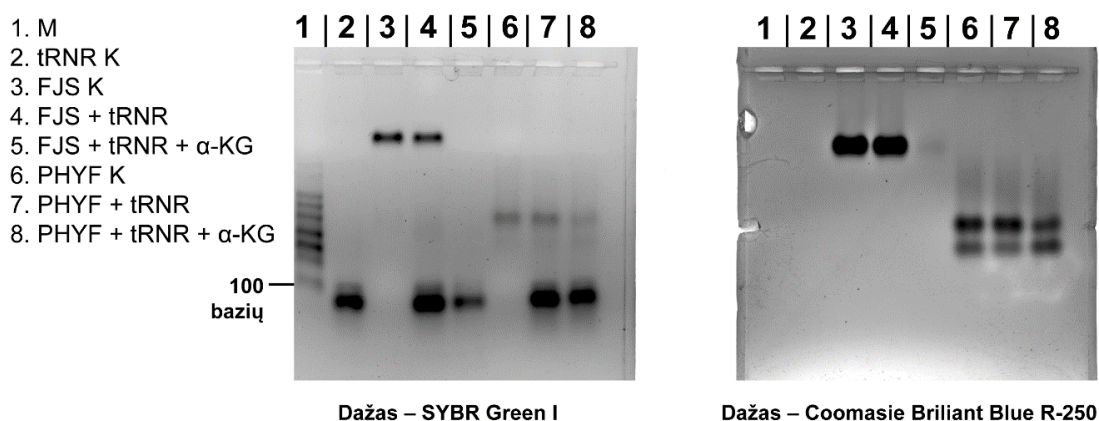
bei 2'-*O*-metil-5-metilcitidino monofosfatu. Tačiau jokio fermentinio aktyvumo su išgrynintu PHYP preparatu nepavyko užfiksuoti *in vitro*: aktyvumas nebuvo stebėtas nei su vienu tikrintu substratu, net ir po 20 valandų reakcijos laiko.

3.3. 2'-*O*-metilnukleozidų demetilazių sąveikos su nukleorūgštimis tyrimas

Kadangi šiame darbe aprašytos nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomos oksigenazės skaido 2'-*O*-metilnukleozidus, kurie randami įvairiose ląstelių RNR, buvo nuspręsta analizuoti, ar šios oksigenazės sąveikauja su *E. coli* tRNR, turinčia tris skirtingas 2'-*O*-metilintas pozicijas. *E. coli* tRNR taip pat buvo pasirinkta, nes visas tris 2'-*O*-metilo grupės modifikacijas atlieka skirtingos metiltransferazės. Dėl šios priežasties galima sukonstruoti mutantinius *E. coli* kamienus, kuriuose tRNR nėra 2'-*O*-metilinta kurioje nors vienoje, dviejose ar visose trijose pozicijose. Taip pat, ieškant galimo FJS ar kitų 2'-*O*-metilnukleozidų demetilazių biotechnologinio pritaikymo, svarbu nustatyti, ar ribonukleorūgštys yra šių fermentų substratai.

3.3.1. FJS ir PHYF sąveikos su *E. coli* tRNR tyrimas 2 % agarozės gelyje

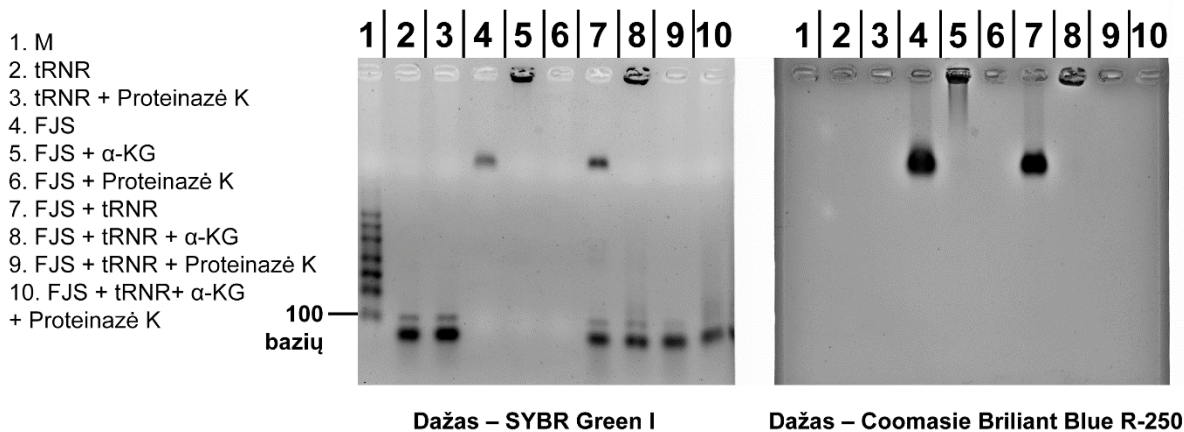
Didžiausiu stabilumu ir aktyvumu pasižyminčių nuo α -KG ir Fe(II) jonų priklausomų FJS ir PHYF demetilazių ir *E. coli* tRNR sąveikos tyrimas pirmiausia buvo atliekamas taikant elektroforezinio judrumo poslinkio analizę 2 % agarozės gelyje.



3.12 pav. FJS ir PHYF oksigenazių su *E. coli* tRNR sąveikos tyrimas 2 % agarozės gelyje. M – RNR molekulinės masės žymuo, α -KG – α -ketoglutaratas.

Ši poslinkio analizė buvo atlikta FJS ir PHYF demetilazes inkubuojant 10 min 30 °C temperatūroje su komercine *E. coli* tRNR, į reakcijos mišinį pridedant arba nededant α -ketoglutarato. Po inkubacijos į sąveikos tyrimo mišinį pridėjus RNR elektroforezės dažo

vykdoma gauto mišinio elektroforezė agarozės gelyje, dažant SYBR Green I nukleorūgščių dažu, o po to su Coomassie Brilliant Blue R-250 baltymų dažu (3.12 pav.). Kaip matyti iš 3.12 pav. pateikto rezultato, kuriame gelis dažytas SYBR Green I dažu, trečiame ir šeštame takeliuose su kontroliniais FJS ir PHYF mėginiais, matyti juostelės, kurių vieta gelyje sutampa su FJS ir PHYF demetilazių, dažytų Coomassie dažais. Todėl tikėtina, kad išgrynintos FJS ir PHYF demetilazės yra prisijungusios DNR arba RNR fragmentą (-us), tačiau teigti, kad šios oksigenazės sąveikauja su tRNR, negalima. Taip pat svarbu tai, jog gelio, dažyto SYBR Green I dažu penktame takelyje (FJS + tRNR + α -KG) nematyti viršutinės juostelės, o gelio, dažyto Coomassie brilliantiniu mėliu, penktame takelyje baltymo koncentracija yra žymiai mažesnė nei trečiame ir ketvirtame. Tai gali būti paaiškinta tuo, kad su α -ketoglutaratu inkubuojama FJS oksigenazė agreguoja ir užstringa šulinėlyje (3.13 pav.).

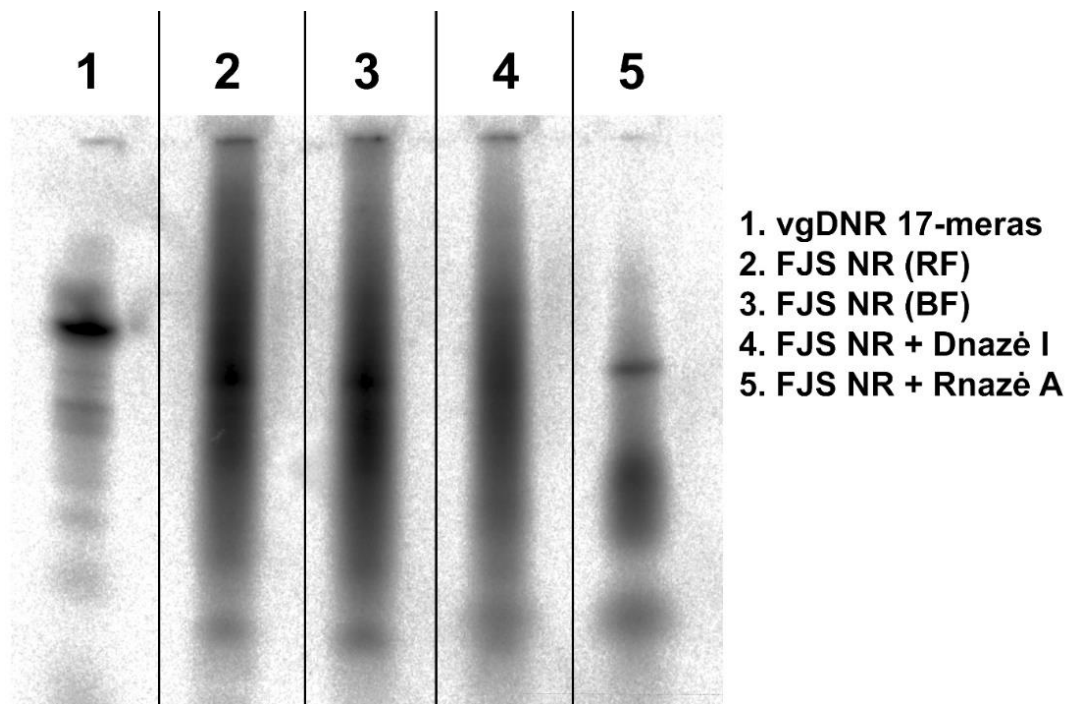


3.13 pav. FJS ir PHYF demetilazių sąveikos su nukleorūgštimis tyrimas, inkubuojant šiuos baltymus su proteinaze K. M – RNR molekulinės masės žymuo, α -KG – α -ketoglutaratas.

3.13 pav. pateiktoje gelio nuotraukoje taip pat matyti, kad mėginių, kuriuose FJS ir PHYF demetilazės buvo inkubuotos su proteinaze K (40 min 37 °C), takeliuose nematyti nei DNR/RNR nei baltymų juostelių. Padarius prielaidą, kad FJS ir PHYF fermentai gryninasi su prisijungusiais nukleorūgščių fragmentais, tokį rezultatą paaiškintų tai, kad šie DNR ir/arba RNR fragmentai yra arba labai trumpi, arba stabilizuojami sąveikos su šiais baltymais.

3.3.2. Nukleorūgčių skyrimas iš FJS demetilazės fermentinio preparato

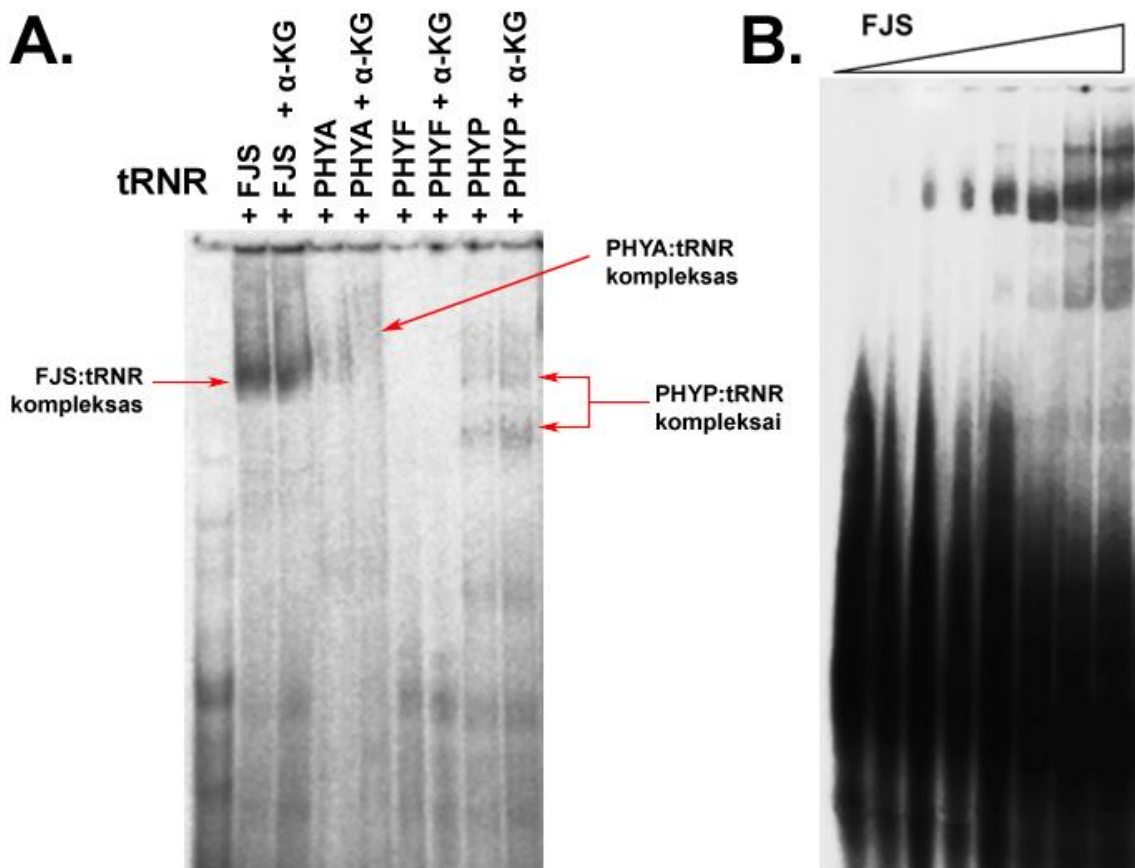
Dėl ankstesniame poskyryje aprašytos priežasties buvo atliktas nukleorūgščių (NR) skyrimas iš FJS demetilazės fermentinio preparato, fermentą reakcijos buferyje (30 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) veikiant proteinaze K, toliau vykdant nukleorūgščių ekstrahciją rūgštiniu (pH ~ 4,5) arba baziniu (pH ~ 7,5–8,0) fenolio:chloroformo:izoamilo alkoholio tirpalu. Siekiant nustatyti išskirtų nukleorūgščių prigimtį, rūgštiniu fenolio tirpalu skirtos NR toliau buvo veikiamos Dnaze I, o baziniu fenolio tirpalu – Rnaze A. Reakcijos laikui pasibaigus iš mėginių dar kartą buvo ekstrahuojamos nukleorūgštys, naudojant tokį pat fenolio:chloroformo:izoamilo alkoholio tirpalą. Tada vykdytas gautų nukleorūgščių žymėjimas [γ -³²P]-ATP ir analizė, vykdant elektroforezę poliakrilamido gelyje TBE buferyje denatūruojančiomis sąlygomis su 8 M karbamido. Kaip matyti iš **3.14 pav.** FJS demetilazė tikrai gryninasi kartu su mažesniu nei 17 nukleotidų ilgio DNR fragmentu. Penktame takelyje, kuriame buvo tirtas šis mėginys, matoma aiški juostelė. Taip pat tikėtina, kad FJS demetilazė gryninasi ir su ribonukleorūgštimis, tačiau tikėtina, kad stebima RNR degradacija.



3.14 pav. Iš FJS išskirtų γ -³²P žymėtų nukleorūgščių mėginių TBE-PAGE analizė denatūruojančiomis sąlygomis, kaip molekulinės masės žymenį naudojant 17 nukleotidų ilgio DNR grandinę. NR – iš baltyminio preparato išskirtos nukleorūgštys, RF – nukleorūgštys, skirtos rūgštiniu (pH ~ 4,5) fenolio tirpalu, BF – nukleorūgštys, skirtos baziniu (pH ~ 7,5–8,0) fenolio tirpalu.

3.3.3. FJS, PHYA, PHYF ir PHYP elektroforezinio judrumo poslinkio analizė su žymėtomis tRNR

3.3.1. poskyryje aprašyto tyrimo metu FJS ir PHYF oksigenazių sąveikos su tRNR, tolesniems bandymams buvo pasirinktas jautresnis metodas – poslinkio analizė su radioaktyviu ^{32}P izotopu pažymėtomis tRNR molekulėmis, elektroforezę vykdant 15 % poliakrilamido gelyje nedenaatūruojančiomis sąlygomis, TBE buferyje. Prieš elektroforezę baltymai su tRNR inkubuoti 10 min 30 °C temperatūroje (**3.15 pav. A**). Šio bandymo metu stebėta FJS, PHYA ir PHYP sąveika su tRNR. Šie baltymai sąveikavo su tRNR nepriklausomai nuo to, ar į mišinį buvo pridėta α -ketoglutarato. Tačiau sąveika tarp tRNR ir PHYF užfiksuota nebuvo. Toliau tiriant FJS oksigenazės sąveiką su tRNR, šis bandymas buvo pakartotas išlaikant tą pačią tRNR (1nM) ir varijuojant FJS koncentraciją mėginyje nuo 0 iki 100 μM (**3.13 pav. B**). Kaip ir buvo galima tikėtis, nustatyta, kad didėjant FJS koncentracijai surišama vis daugiau tRNR.

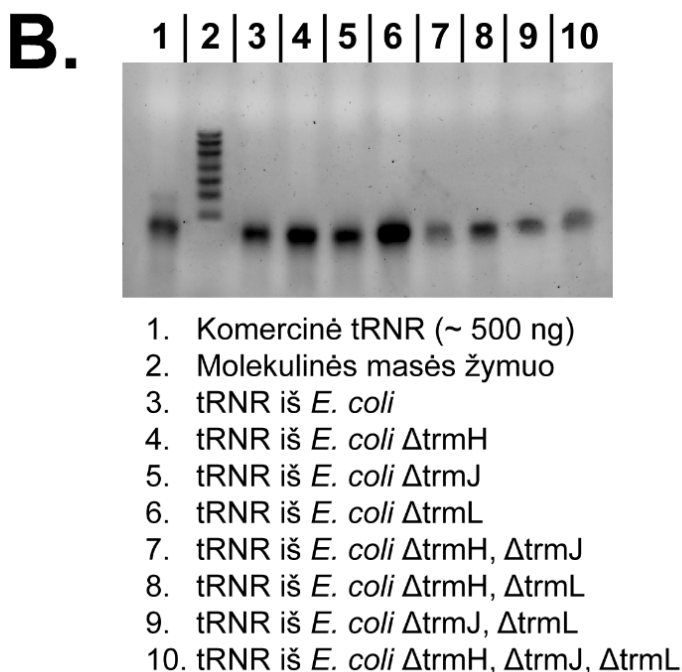
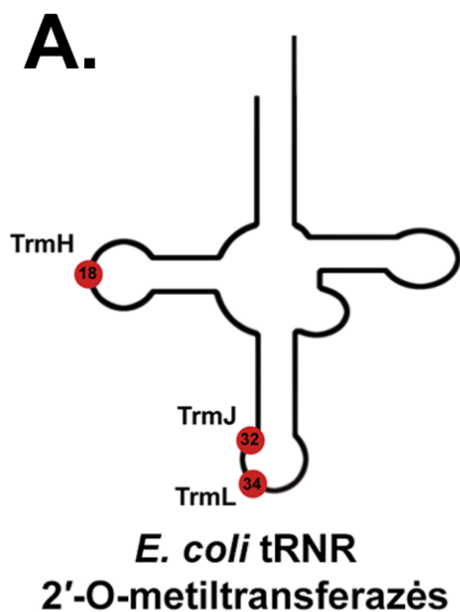


3.15 pav. FJS oksigenazės bei jos homologų sąveikos su *E. coli* tRNR elektroforetinio poslinkio analizės tyrimai. tRNR koncentracija mėginyje buvo 1 nM.

A. 15 % poliakrilamido gelyje su ^{32}P -tRNR (1 nM), α -KG – α -ketoglutaratas.

B. 15 % poliakrilamido gelyje su ^{32}P -tRNR, didinant FJS demetilazės koncentraciją mėginyje. FJS koncentracijos: 0, 2, 4, 10, 20, 80, 100 μM .

Siekiant patvirtinti, kad FJS demetilazė tikrai sąveikauja su tRNR ir nustatyti, ar ši sąveika yra susijusi su tRNR esančiais 2'-*O*-metilnukleozidais, buvo atlikta FJS elektroforetinio poslinkio analizė su ^{32}P -tRNR, išskirtomis iš *E. coli* mutantų su skirtingose 2'-OH pozicijose tRNR metilinančias 2'-*O*-metiltransferazes (3.14 pav. A) koduojančių genų delecijomis. Prieš vykdant žymėjimą [γ - ^{32}P]-ATP, išgrynintų tRNR kokybė buvo patikrinta 2 % agarozės gelyje, lyginant su komercine tRNR (3.14 pav. B).

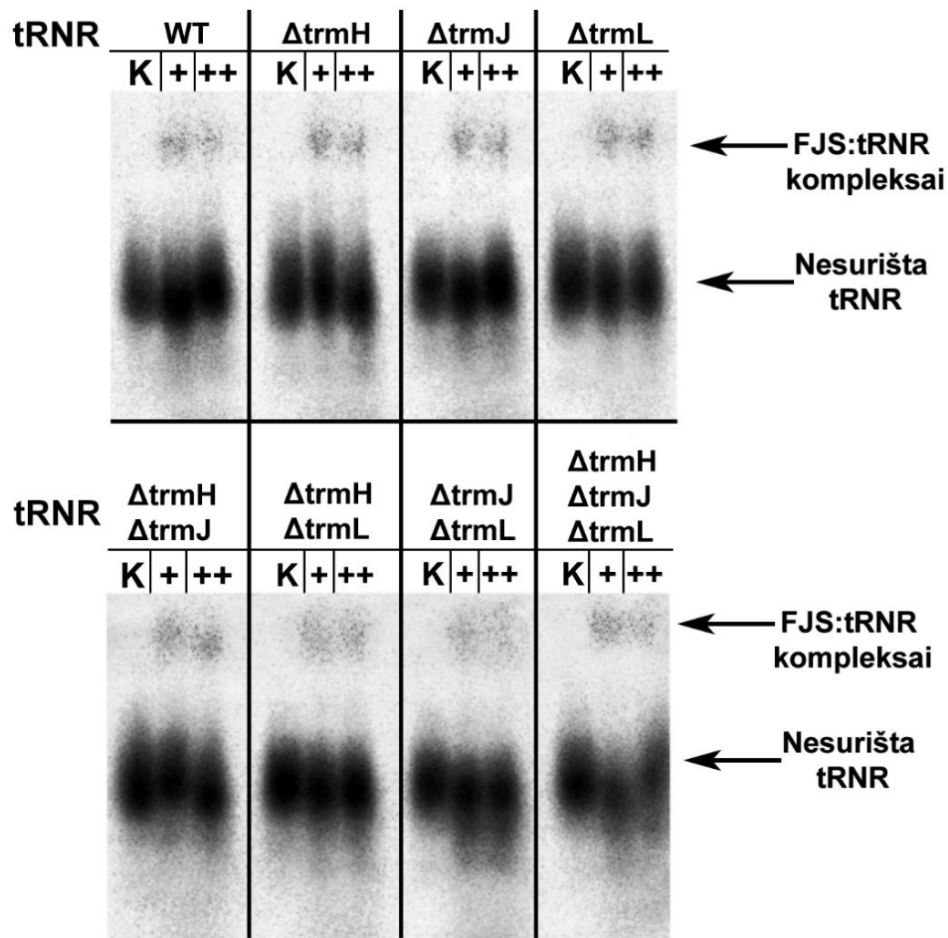


3.14 pav. *E. coli* tRNR 2'-*O*-metiltransferazės ir skyrimo rezultatas:

A. *E. coli* tRNR 2'-OH pozicijas metilinančios 2'-*O*-metiltransferazės.

B. Iš skirtingas 2'-*O*-metiltransferazes koduojančių genų delecijas turinčių *E. coli* kamienų išskirtų tRNR analizė 2 % agarozės gelyje.

Kad būtų gautas aiškesnis FJS demetilazės ir tRNR sąveikos rezultatas, elektroforetinio poslinkio analizė (3.15 pav.) vykdyta naudojant 8 % poliakrilamido gelį, mėginius prieš analizę inkubuojant 10 min 30 °C temperatūroje su 0,2 nM ^{32}P -tRNR nespecifinę baltymų ir nukleorūgščių sąveiką mažinančiame (50 mM Tris-HCl pH 8,0, papildytame 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10% glicerolio ir 0,2 mg/ml BSA) buferyje. Gautame gelyje stebima FJS sąveika su visomis tirtomis tRNR. Tai rodo, kad FJS oksigenazės sąveika su tRNR nėra susijusi su tRNR esančių 2'-*O*-metilnukleozidų buvimu.



3.15 pav. FJS ir tRNA iš skirtingas 2'-O-metiltransferazes koduojančių genų delecijas turinčių *E. coli* kamienų sąveikos tyrimas, vykdant elektroforetinio mobilumo poslinkio analizę.

3.3.4. FJS, PHYA ir PHYF demetilazių aktyvumo tyrimas su tRNA

Nustačius, kad FJS demetilazė sąveikauja su tRNA, toliau buvo tikrinama, ar FJS demetilazė ir jos *in vitro* aktyvūs homologai PHYA ir PHYF gali demetilinti tRNA. Reakcijos mišinių analizė atlikta naudojant *Purpald* reagentą (**3 priedas**). Deja, bet aktyvumas nebuvo stebėtas. Įdomu tai, kad sugertis, esant 550 nm bangos ilgiui, buvo didesnė kontroliniuose baltymų mėginiuose, nei ten, kur baltymai inkubuoti su tRNA, – tai gali būti paaiškinta *Purpald* reagento ir tRNA sąveika su mėginyje esančių oksigenazių katalitiniuose centrų geležies(II) katijonais. Tai, kad demetilimas nestebimas vykdant reakciją su *Purpald*, dar nepatvirtina, kad ši reakcija nevyksta, – tam reikalingi jautresni 2'-O-metilnukleozidų tRNA nustatymo būdai. Taip pat galimai yra nepakankamas 2'-O-metilnukleozidų kiekis tRNA: žinoma, kad tRNA metilinimas bakterijose yra dinamiškas procesas ir priklauso nuo bakterijų auginimo sąlygų (Galvanin ir kt., 2020).

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame darbe tiriamos nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų oksigenazių superšeimai priklausančios 2'-O-metilnukleozidų demetilazės pasižymi mokslinėje literatūroje iki šiol dar neaprašytu aktyvumu – tai patvirtina šių fermentų aktyvumo tyrimai *in vivo* ir *in vitro*. Tai, kad atrinkti FJS demetilazės homologai, duomenų bazėse įvardyti kaip fitanoil-KoA hidroksilazės, pasižymi visai kitu aktyvumu, reiškia, kad ir daugiau tokio tipo fermentų galėtų pasižymėti panašiu aktyvumu. Taip pat tai rodo didžiausią automatinių anotacijų duomenų bazėse trūkumą – šie algoritmai fermentus gali kategorizuoti tik į nuosekliausiai kategorizuotas fermentų grupes, todėl, dar neištobulėjus šiai technologijai, anotacijos gali būti arba klaidinančios, arba nepakankamai informatyvios. Tai rodo ir kiti literatūroje aprašyti tyrimai, kurių metu vykdant reakcijas su rekombinantine žmogaus PHYD1 oksigenazės A izoforma nebuvo stebimas 2-hidroksilfitanoil-KoA susidarymas (Zhang ir kt., 2011).

Šis darbas neatsakė į klausimą, ar 2'-O-metilnukleozidų demetilazės sąveikauja su nukleorūgštimis todėl, kad gali demetilinti šias modifikacijas turinčias RNR 2'-O pozicijas. Bandant atsakyti į šį klausimą ir 2'-O-metilnukleozidų demetilazėms atrasti biotechnologinį pritaikymą, buvo bendradarbiaujama su VU GMC DNR modifikacijos tyrimų skyriumi. Šiame skyriuje buvo atlikti tyrimai, kurių metu analizuota, ar 2'-O-metilnukleozidų demetilazės FJS ir PHYF gali nuskelti viengrandininės RNR (miR173), dvigrandininės RNR (miR173/miR173*) ar RNR/DNR heteroduplekso (turinčio 2 nt RNR grandinės 3'-išsikišimą ir 2 nt DNR grandinės 3'-išsikišimą) 3'-galų citidino ar guanozino nukleotiduose esančias 2'-O-metilo grupes. Šiuos darbus atliko dr. Aleksandr Osipenko. Deja, šių eksperimentų metu nebuvo gautas teigiamas rezultatas.

Nors pirmųjų nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų demetilazių aktyvumo nustatymo su 2'-O-metilnukleozidų turinčiomis RNR tyrimų rezultatai yra neigiami, tai, kad FJS demetilazė gryninasi prisijungusi nukleorūgščių fragmentus, ir gauti EMSA analizės rezultatai gali būti nuoroda į šių fermentų atrankumą specifiniam taikiniui. Tiksliai atpažinus šio taikinio seką, tolesnių tyrimų metu būtų galima nustatyti ir tikslią 2'-O-metilnukleozidų demetilazių funkciją, tai yra, kam šie fermentai reikalingi prokariotiniams organizmams ar, PHYF oksigenazės atveju, virusui.

Dalis šiame darbe aprašytų rezultatų buvo pristatyta 2022 m. balandžio 28–29 dienomis vykusioje konferencijoje „Mikrobiologija 2022“.

DARBO IŠVADOS

1. Nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausoma oskigenazė FJS yra aktyvi *in vivo* ir *in vitro*. Fermentas katalizavo visų tirtų 2'-O pozicijoje modifikuotų nukleozidų demetilimą ir dealilinimą 2'-O pozicijoje, susidarant atitinkamam nukleozidui ir formaldehidui. Fermentinis aktyvumas nestebėtas su fosforilintais 2'-O-metilnukleozidais bei 3'-O pozicijoje modifikuotais nukleozidais.

2. Rekombinantinė FJS demetilazė yra termolabilus fermentas, kurio didžiausias aktyvumas stebėtas 7,5 pH reikšmės TRIS-HCl ir HEPES KOH buferiniuose tirpaluose bei esant 50 °C temperatūrai. Iš tikrintų substratų FJS demetilazė efektyviausiai demetilino 2'-O-metil-5-metilcitidiną, nustatyta katalazinės konstantos reikšmė $k_{cat} = 586 \pm 40 \text{ s}^{-1}$.

3. Pagal FJS demetilazės aminorūgščių seką atrinkti homologai PHYA, PHYP ir PHYF yra 2'-O-metilnukleozidus *in vivo* skaidantys fermentai. Nustatytas PHYA ir PHYP oksigenazių substratinis specifiškumas *in vitro* sutampa su FJS demetilazės – vyksta 2'-O pozicijoje modifikuotų nukleozidų metilo ir alilo grupių pašalinimas.

4. FJS demetilazė sąveikauja su nukleorūgštimis – gryninasi prisijungusi RNR ir DNR fragmentus, o vykdant elektroforetinio mobilumo poslinkio analizę stebėti FJS:tRNR kompleksai. Baltymo:tRNR sąveika taip pat stebėta tiriant PHYA ir PHYP oksigenazes.

Nuo α -ketoglutarato ir geležies(II) jonų priklausomų 2'-*O*-metilnukleozidų demetilazių tyrimas

SANTRAUKA

Fe(II) katijoną aktyviajame centre turinčios ir nuo α -ketoglutarato priklausančios oksigenazės katalizuoja daugybę skirtingų reakcijų ir dalyvauja ląstelėje vykstančiuose biosintezės, katabolizmo bei reguliaciniuose procesuose. Šiame darbe nagrinėta prieš tai neaprašytą aktyvumą turinti nuo α -KG ir Fe(II) jonų priklausoma 2'-*O*-metilnukleozidų demetilazė FJS ir jos homologai. Darbo metu įvertintos FJS demetilazės savybės: optimalus veikimo pH, aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros ir termostabilumas, substratinis specifiskumas, su dviem substratais išmatuotos katalizinės konstantos. Taip pat buvo nustatyta, kad FJS demetilazė sąveikauja su nukleorūgštimis – gryninasi prisijungusi RNR ir DNR fragmentus, o vykdant elektroforetinio mobilumo poslinkio analizę stebėti FJS:tRNR kompleksai. Šio tyrimo metu visos trys FJS demetilazei homologiškos oksigenazės, atrinktos pagal aminorūgščių sekos panašumą, buvo aktyvios *in vivo*, dvi iš jų aktyvios ir *in vitro*, stebėta homologinių oksigenazių katalizuojama reakcija sutapo su FJS demetilazės.

Investigation of 2-Oxoglutarate and Iron(II) Dependent 2'-O-Methylnucleoside Demethylases

SUMMARY

2-Oxoglutarate and Fe(II) dependent oxygenases catalyze a wide array of reactions that play a role in the biosynthesis of new compounds, catabolism, and regulation of cellular processes. This thesis delves into a metagenomic-derived 2OG/Fe(II) oxygenase with a novel activity of 2'-O-methylated nucleoside demethylation at the 2'-O position. During this study, pH and thermal optimum, thermal stability, substrate specificity, and kinetic parameters of FJS demethylase were measured. Also, interaction between FJS demethylase and nucleic acids is investigated. Small nucleic acid fragments, bound to FJS, are extracted, moreover, EMSA results showed FJS-tRNA complexes. In addition to this, oxygenases with sequences homologous to that of FJS demethylase were studied. It is shown, that all three selected homologous 2OG/Fe(II) oxygenases are active *in vivo* and two of them are shown to catalyze the demethylation of 2'-O-methylated nucleosides *in vitro*.

Padėka

Už nuoseklų vadovavimą, rūpestį ir skatinimą tobulėti norėčiau padėkoti savo vadovei **dr. Rasai Rutkienei**. Už suteiktą galimybę atlikti darbą Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje, idėjas ir puikius patarimus, tikslias bei motyvuojančias išvalgas dėkoju skyriaus vadovui **prof. Rolandui Meškiui**. Dėkoju ir visam šauniam Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijų skyriaus kolektyvui, o ypač **dokt. Robertai Statkevičiūtei** už pagalbą su elektroforetinio poslinkio analizės tyrimais, **dr. Agotai Aučynaitei** už sukonstruotus mutantinius kamienus, **Justui Vaitekūnui** ir **dr. Jonitai Stankevičiūtei** už pagalbą su HPLC-MS analizėmis, **dokt. Martynai Koplūnaitei** už vykdytą 2'-*O*-metil-5-metilцитидино monofosfato biosintezę, **dr. Daivai Tauraitei** už susintetintus fluorintus junginius.

Literatūros sąrašas

1. Abou Assi, H., Rangadurai, A. K., Shi, H., Liu, B., Clay, M. C., Erharter, K., Kreutz, C., Holley, C. L., & Al-Hashimi, H. M. (2020). 2'-O-Methylation can increase the abundance and lifetime of alternative RNA conformational states. *Nucleic Acids Research*, *48*(21), 12365–12379. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa928>
2. Aguilo, F., Zhang, F., Sancho, A., Fidalgo, M., Di Cecilia, S., Vashisht, A., Lee, D.-F., Chen, C.-H., Rengasamy, M., Andino, B., Jahouh, F., Roman, A., Krig, S. R., Wang, R., Zhang, W., Wohlschlegel, J. A., Wang, J., & Walsh, M. J. (2015). Coordination of m(6)A mRNA Methylation and Gene Transcription by ZFP217 Regulates Pluripotency and Reprogramming. *Cell Stem Cell*, *17*(6), 689–704. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.005>
3. Ayadi, L., Galvanin, A., Pichot, F., Marchand, V., & Motorin, Y. (2019). RNA ribose methylation (2'-O-methylation): Occurrence, biosynthesis and biological functions. *Biochimica Et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, *1862*(3), 253–269. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.11.009>
4. Aik, W. S., Chowdhury, R., Clifton, I. J., Hopkinson, R. J., Leissing, T., McDonough, M., Nowak, R., Schofield, C. J., & Walport, L. (2015). *Introduction to structural studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes* (p. 59–94). <https://doi.org/10.1039/9781782621959-00059>
5. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
6. Andreani, J., Schulz, F., Di Pinto, F., Levasseur, A., Woyke, T., & La Scola, B. (2021). Morphological and Genomic Features of the New Klosneuvirinae Isolate Fadolivirus IHUMI-VV54. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 719703. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.719703>
7. Armougom, F., Moretti, S., Poirot, O., Audic, S., Dumas, P., Schaeli, B., Keduas, V., & Notredame, C. (2006). Espresso: Automatic incorporation of structural information in multiple sequence alignments using 3D-Coffee. *Nucleic Acids Research*, *34*(Web Server issue), W604–608. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl092>
8. Aučynaitė, A., Rutkienė, R., Tauraitė, D., Meškys, R., & Urbonavičius, J. (2018). Identification of a 2'-O-Methyluridine Nucleoside Hydrolase Using the Metagenomic Libraries. *Molecules*, *23*(11), 2904. <https://doi.org/10.3390/molecules23112904>
9. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular Systems Biology*, *2*, 2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
10. Batista, P. J. (2017). The RNA Modification N6-methyladenosine and Its Implications in Human Disease. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *15*(3), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2017.03.002>
11. Biswas, S., & Rao, C. M. (2018). Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*, *837*, 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.021>
12. Blasiak, L. C., & Drennan, C. L. (2008). Nonheme Iron Halogenases. A. Messerschmidt (Sud.), *Handbook of Metalloproteins* (p. met228). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470028637.met228>
13. Blum, M., Chang, H.-Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., ... Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D344–D354. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977>
14. Boccaletto, P., Machnicka, M. A., Purta, E., Piątkowski, P., Bagiński, B., Wirecki, T. K., de Crécy-Lagard, V., Ross, R., Limbach, P. A., Kotter, A., Helm, M., & Bujnicki, J. M. (2018). MODOMICS: A database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D303–D307. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1030>
15. Chang, Y. M., Donovan, M. J., & Tan, W. (2013). Using Aptamers for Cancer Biomarker Discovery. *Journal of Nucleic Acids*, *2013*, e817350. <https://doi.org/10.1155/2013/817350>
16. Chaudhary, N., Weissman, D., & Whitehead, K. A. (2021). mRNA vaccines for infectious diseases: Principles, delivery and clinical translation. *Nature Reviews Drug Discovery*, *20*(11), 817–838. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00283-5>
17. Choi, J., Indrisiunaite, G., DeMirici, H., Jeong, K.-W., Wang, J., Petrov, A., Prabhakar, A., Rechavi, G., Dominissini, D., He, C., Ehrenberg, M., & Puglisi, J. D. (2018). 2'-O-methylation in mRNA disrupts tRNA decoding during translation elongation. *Nature structural & molecular biology*, *25*(3), 208–216. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0030-z>
18. Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D67–D72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>

19. Clifton, I. J., McDonough, M. A., Ehrismann, D., Kershaw, N. J., Granatino, N., & Schofield, C. J. (2006). Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded β -helix fold proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *100*(4), 644–669. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.024>
20. Daffis, S., Szretter, K. J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Lin, T.-Y., Schneller, S., Züst, R., Dong, H., Thiel, V., Sen, G. C., Fensterl, V., Klimstra, W. B., Pierson, T. C., Buller, R. M., Gale, M., Shi, P.-Y., & Diamond, M. S. (2010). 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*, *468*(7322), 452–456. <https://doi.org/10.1038/nature09489>
21. Dai, Q., Moshitch-Moshkovitz, S., Han, D., Kol, N., Amariglio, N., Rechavi, G., Dominissini, D., & He, C. (2017). Nm-seq maps 2'-O-methylation sites in human mRNA with base precision. *Nature Methods*, *14*(7), 695–698. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4294>
22. Diafa, S., & Hollenstein, M. (2015). Generation of Aptamers with an Expanded Chemical Repertoire. *Molecules*, *20*(9), 16643–16671. <https://doi.org/10.3390/molecules200916643>
23. Dimitrova, D. G., Teyssset, L., & Carré, C. (2019). RNA 2'-O-Methylation (Nm) Modification in Human Diseases. *Genes*, *10*(2). <https://doi.org/10.3390/genes10020117>
24. Edmonds, C. G., Crain, P. F., Gupta, R., Hashizume, T., Hocart, C. H., Kowalak, J. A., Pomerantz, S. C., Stetter, K. O., & McCloskey, J. A. (1991). Posttranscriptional modification of tRNA in thermophilic archaea (Archaeobacteria). *Journal of Bacteriology*, *173*(10), 3138–3148. <https://doi.org/10.1128/jb.173.10.3138-3148.1991>
25. Galvanin, A., Vogt, L.-M., Grober, A., Freund, I., Ayadi, L., Bourguignon-Igel, V., Bessler, L., Jacob, D., Eigenbrod, T., Marchand, V., Dalpke, A., Helm, M., & Motorin, Y. (2020). Bacterial tRNA 2'-O-methylation is dynamically regulated under stress conditions and modulates innate immune response. *Nucleic Acids Research*, *48*(22), 12833–12844. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1123>
26. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. J. M. Walker (Sud.), *The Proteomics Protocols Handbook* (p. 571–607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
27. Goldberg, R. N., Kishore, N., & Lennen, R. M. (2002). Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, *31*(2), 231–370. <https://doi.org/10.1063/1.1416902>
28. Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution*, *27*(2), 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
29. Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*, *52*(5), 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
30. Hanauske-Abel, H. M., & Günzler, V. (1982). A stereochemical concept for the catalytic mechanism of prolylhydroxylase: Applicability to classification and design of inhibitors. *Journal of Theoretical Biology*, *94*(2), 421–455. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(82\)90320-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(82)90320-4)
31. Hara, R., Nishikawa, T., Okuhara, T., Koketsu, K., & Kino, K. (2019). Ectoine hydroxylase displays selective trans-3-hydroxylation activity towards l-proline. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(14), 5689–5698. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09868-y>
32. Hausinger, R. P. (2015). CHAPTER 1. Biochemical Diversity of 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases. C. Schofield & R. Hausinger (Sud.), *Metallobiology* (p. 1–58). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781782621959-00001>
33. He, L., Li, H., Wu, A., Peng, Y., Shu, G., & Yin, G. (2019). Functions of N6-methyladenosine and its role in cancer. *Molecular Cancer*, *18*(1), 176. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1109-9>
34. Henshaw, T. F., Feig, M., & Hausinger, R. P. (2004). Aberrant activity of the DNA repair enzyme AlkB. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *98*(5), 856–861. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2003.10.021>
35. Herr, C. Q., & Hausinger, R. P. (2018). Amazing Diversity in Biochemical Roles of Fe(II)/2-Oxoglutarate Oxygenases. *Trends in Biochemical Sciences*, *43*(7), 517–532. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.04.002>
36. Hyde, J. L., & Diamond, M. S. (2015). Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2'-O methylation. *Virology*, *479*, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.019>
37. Huang, C., Karijolich, J., & Yu, Y.-T. (2016). Detection and quantification of RNA 2'-O-methylation and pseudouridylation. *Methods (San Diego, Calif.)*, *103*, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.02.003>
38. Islam, Md. S., Leissing, T. M., Chowdhury, R., Hopkinson, R. J., & Schofield, C. J. (2018). 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases. *Annual Review of Biochemistry*, *87*(1), 585–620. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044724>
39. Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R. W., Steward, R., & Chen, X. (2005). Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5711), 932–935. <https://doi.org/10.1126/science.1107130>

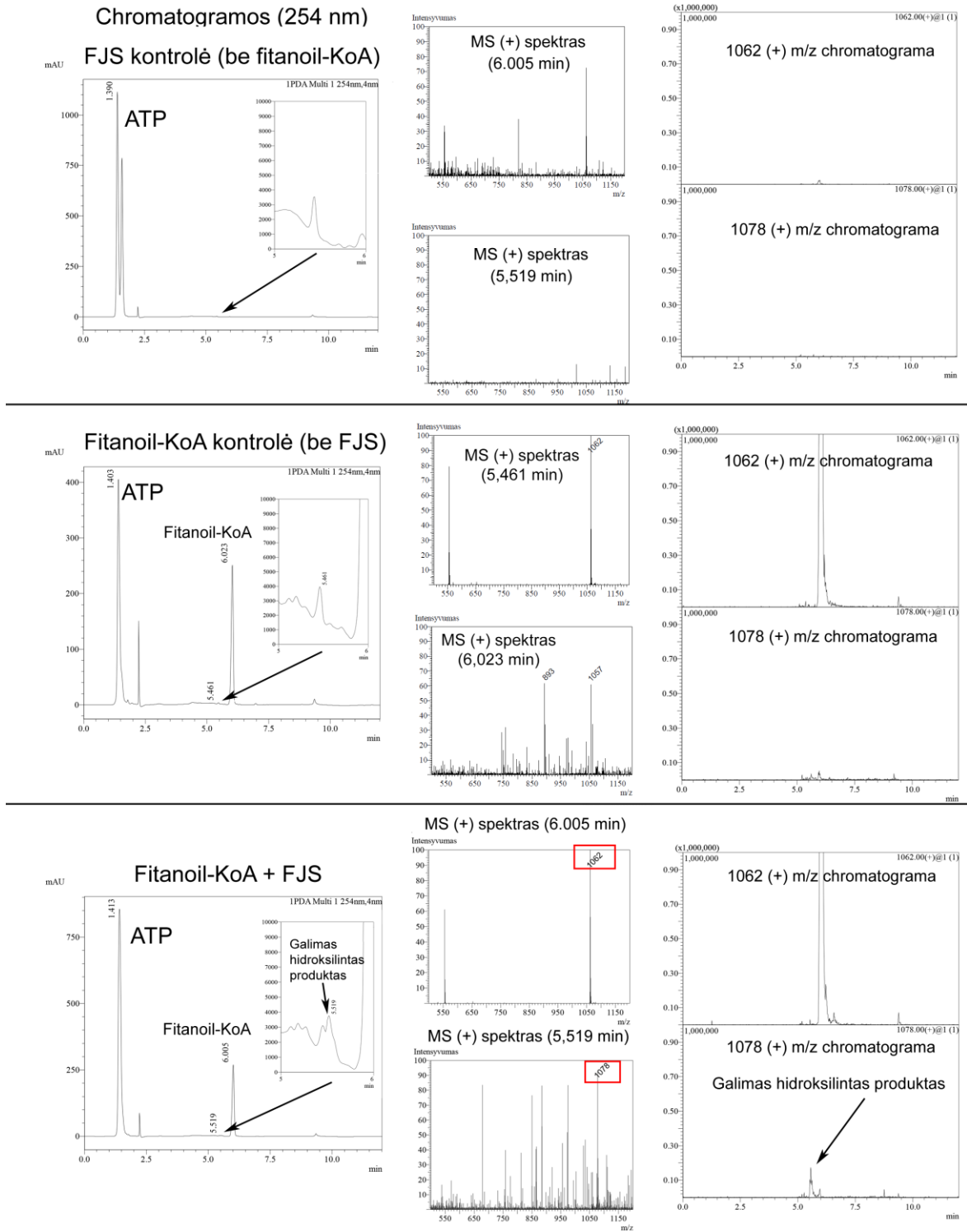
40. Jain, R., & Shuman, S. (2010). Bacterial Hen1 is a 3' terminal RNA ribose 2'-O-methyltransferase component of a bacterial RNA repair cassette. *RNA*, *16*(2), 316–323. <https://doi.org/10.1261/rna.1926510>
41. Ji, L., & Chen, X. (2012). Regulation of small RNA stability: Methylation and beyond. *Cell Research*, *22*(4), 624–636. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.36>
42. Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.-G., & He, C. (2011). N6-Methyladenosine in Nuclear RNA is a Major Substrate of the Obesity-Associated FTO. *Nature chemical biology*, *7*(12), 885–887. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>
43. Jordheim, L. P., Durantel, D., Zoulim, F., & Dumontet, C. (2013). Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*(6), 447–464. <https://doi.org/10.1038/nrd4010>
44. Jr, J. M. B., Chang, W., Matthews, M. L., Martinie, R. J., Boal, A. K., & Krebs, C. (2015). CHAPTER 3: Mechanisms of 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases: The Hydroxylation Paradigm and Beyond. *2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases* (p. 95–122). <https://doi.org/10.1039/9781782621959-00095>
45. Kal, S., & Que, L. (2017). Dioxygen activation by nonheme iron enzymes with the 2-His-1-carboxylate facial triad that generate high-valent oxoiron oxidants. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *22*(2), 339–365. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1431-2>
46. Kawai, Y., Ono, E., & Mizutani, M. (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *The Plant Journal*, *78*(2), 328–343. <https://doi.org/10.1111/tpj.12479>
47. Kehrenberg, C., Schwarz, S., Jacobsen, L., Hansen, L. H., & Vester, B. (2005). A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: Methylation of 23S ribosomal RNA at A2503: Drug resistance by methylation of A2503 in 23S rRNA. *Molecular Microbiology*, *57*(4), 1064–1073. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04754.x>
48. Khan, A., Schofield, C. J., & Claridge, T. D. W. (2020). Reducing Agent-Mediated Nonenzymatic Conversion of 2-Oxoglutarate to Succinate: Implications for Oxygenase Assays. *ChemBioChem*, *21*(20), 2898–2902. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000185>
49. Kiilerich-Pedersen, K., Daprà, J., Cherré, S., & Rozlosnik, N. (2013). High sensitivity point-of-care device for direct virus diagnostics. *Biosensors & Bioelectronics*, *49*, 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.05.046>
50. Kowalak, J. A., Dalluge, J. J., McCloskey, J. A., & Stetter, K. O. (1994). The Role of Posttranscriptional Modification in Stabilization of Transfer RNA from Hyperthermophiles. *Biochemistry*, *33*(25), 7869–7876. <https://doi.org/10.1021/bi00191a014>
51. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
52. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
53. Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
54. Lewis, C. J. T., Pan, T., & Kalsotra, A. (2017). RNA modifications and structures cooperate to guide RNA–protein interactions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(3), 202–210. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.163>
55. Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., Jia, G., Yu, M., Lu, Z., Deng, X., Dai, Q., Chen, W., & He, C. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature chemical biology*, *10*(2), 93–95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>
56. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*, 265–275.
57. Luo, L., Pappalardi, M. B., Tummino, P. J., Copeland, R. A., Fraser, M. E., Grzyska, P. K., & Hausinger, R. P. (2006). An assay for Fe(II)/2-oxoglutarate-dependent dioxygenases by enzyme-coupled detection of succinate formation. *Analytical Biochemistry*, *353*(1), 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.033>
58. Mantri, M., Zhang, Z., McDonough, M. A., & Schofield, C. J. (2012). Autocatalysed oxidative modifications to 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *The FEBS Journal*, *279*(9), 1563–1575. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08496.x>
59. McDonough, M. A., Kavanagh, K. L., Butler, D., Searls, T., Oppermann, U., & Schofield, C. J. (2005). Structure of Human Phytanoyl-CoA 2-Hydroxylase Identifies Molecular Mechanisms of Refsum Disease *. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(49), 41101–41110. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507528200>
60. McDonough, M. A., Loenarz, C., Chowdhury, R., Clifton, I. J., & Schofield, C. J. (2010). Structural studies on human 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, *20*(6), 659–672. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.08.006>

61. McNeill, L. A., Bethge, L., Hewitson, K. S., & Schofield, C. J. (2005). A fluorescence-based assay for 2-oxoglutarate-dependent oxygenases. *Analytical Biochemistry*, 336(1), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.09.019>
62. Myllylä, R., Kuutti-Savolainen, E.-R., & Kivirikko, K. I. (1978). The role of ascorbate in the prolyl hydroxylase reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 83(2), 441–448. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(78\)91010-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(78)91010-0)
63. Mitsukawa, Y., Hibi, M., Matsutani, N., Horinouchi, N., Takahashi, S., & Ogawa, J. (2016). A novel nucleoside hydrolase from *Lactobacillus buchneri* LBK78 catalyzing hydrolysis of 2'-O-methylribonucleosides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(8), 1568–1576. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1182853>
64. Mitsukawa, Y., Hibi, M., Matsutani, N., Horinouchi, N., Takahashi, S., & Ogawa, J. (2017). Enzymatic synthesis of 2'-O-methylribonucleosides with a nucleoside hydrolase family enzyme from *Lactobacillus buchneri* LBK78. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(6), 659–664. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.01.005>
65. Mitsukawa, Y., Hibi, M., Matsutani, N., Horinouchi, N., Takahashi, S., & Ogawa, J. (2018). New nucleoside hydrolase with transribosylation activity from *Agromyces* sp. MM-1 and its application for enzymatic synthesis of 2'-O-methylribonucleosides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.07.016>
66. Motorin, Y., & Helm, M. (2011). RNA nucleotide methylation: RNA nucleotide methylation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(5), 611–631. <https://doi.org/10.1002/wrna.79>
67. Motorin, Y., & Marchand, V. (2018). Detection and Analysis of RNA Ribose 2'-O-Methylations: Challenges and Solutions. *Genes*, 9(12), 642. <https://doi.org/10.3390/genes9120642>
68. Mukherji, M., Chien, W., Kershaw, N. J., Clifton, I. J., Schofield, C. J., Wierzbicki, A. S., & Lloyd, M. D. (2001). Structure–function analysis of phytanoyl-CoA 2-hydroxylase mutations causing Refsum's disease. *Human Molecular Genetics*, 10(18), 1971–1982. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.18.1971>
69. O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvermin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., ... Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D733–745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
70. Patel, D. J., & Suri, A. K. (2000). Structure, recognition and discrimination in RNA aptamer complexes with cofactors, amino acids, drugs and aminoglycoside antibiotics. *Journal of Biotechnology*, 74(1), 39–60. [https://doi.org/10.1016/s1389-0352\(99\)00003-3](https://doi.org/10.1016/s1389-0352(99)00003-3)
71. Patil, D. P., Chen, C.-K., Pickering, B. F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M., & Jaffrey, S. R. (2016). M6A RNA methylation promotes XiST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537(7620), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature19342>
72. Peters, C., & Buller, R. M. (2019). Industrial Application of 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases. *Catalysts*, 9(3), 221. <https://doi.org/10.3390/catal9030221>
73. Ping, X.-L., Sun, B.-F., Wang, L., Xiao, W., Yang, X., Wang, W.-J., Adhikari, S., Shi, Y., Lv, Y., Chen, Y.-S., Zhao, X., Li, A., Yang, Y., Dahal, U., Lou, X.-M., Liu, X., Huang, J., Yuan, W.-P., Zhu, X.-F., ... Yang, Y.-G. (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Research*, 24(2), 177–189. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.3>
74. Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W320–W324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>
75. Roduner, E., Kaim, W., Sarkar, B., Urlacher, V. B., Pleiss, J., Gläser, R., Einicke, W.-D., Sprenger, G. A., Beifuß, U., Klemm, E., Liebner, C., Hieronymus, H., Hsu, S.-F., Plietker, B., & Laschat, S. (2013). Selective Catalytic Oxidation of C–H Bonds with Molecular Oxygen. *ChemCatChem*, 5(1), 82–112. <https://doi.org/10.1002/cctc.201200266>
76. Rose, N. R., McDonough, M. A., King, O. N. F., Kawamura, A., & Schofield, C. J. (2011). Inhibition of 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Chemical Society Reviews*, 40(8), 4364–4397. <https://doi.org/10.1039/c0cs00203h>
77. Rotherham, L. S., Maserumule, C., Dheda, K., Theron, J., & Khati, M. (2012). Selection and Application of ssDNA Aptamers to Detect Active TB from Sputum Samples. *PLoS ONE*, 7(10), e46862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046862>
78. Samant, S., Lee, H., Ghassemi, M., Chen, J., Cook, J. L., Mankin, A. S., & Neyfakh, A. A. (2008). Nucleotide Biosynthesis Is Critical for Growth of Bacteria in Human Blood. *PLOS Pathogens*, 4(2), e37. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040037>
79. Schwartz, S., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Wang, T., Maciag, K., Bushkin, G. G., Mertins, P., Ter-Ovanesyan, D., Habib, N., Cacchiarelli, D., Sanjana, N. E., Freinkman, E., Pacold, M. E., Satija, R., Mikkelsen,

- T. S., Hacoheh, N., Zhang, F., Carr, S. A., Lander, E. S., & Regev, A. (2014). Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Reports*, 8(1), 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.048>
80. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
81. Siitonen, V., Selvaraj, B., Niiranen, L., Lindqvist, Y., Schneider, G., & Metsä-Ketelä, M. (2016). Divergent non-heme iron enzymes in the nogalamycin biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(19), 5251–5256. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525034113>
82. Slobodin, B., Han, R., Calderone, V., Vrieling, J. A. F. O., Loayza-Puch, F., Elkon, R., & Agami, R. (2017). Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N6-adenosine Methylation. *Cell*, 169(2), 326–337.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.031>
83. Sun, H., & Zu, Y. (2015). A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(7), 11959–11980. <https://doi.org/10.3390/molecules200711959>
84. The UniProt Consortium. (2021). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>
85. Thomson, J. M., & Lamont, I. L. (2019). Nucleoside Analogues as Antibacterial Agents. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00952>
86. Wojcik, M., & Milek, J. (2016). A new method to determine optimum temperature and activation energies for enzymatic reactions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39, 1319–1323. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1596-7>
87. Xiang, Y., Laurent, B., Hsu, C.-H., Nachtergaele, S., Lu, Z., Sheng, W., Xu, C., Chen, H., Ouyang, J., Wang, S., Ling, D., Hsu, P.-H., Zou, L., Jambhekar, A., He, C., & Shi, Y. (2017). RNA m6A methylation regulates the ultraviolet-induced DNA damage response. *Nature*, 543(7646), 573–576. <https://doi.org/10.1038/nature21671>
88. Zhang, Z., Kochan, G. T., Ng, S. S., Kavanagh, K. L., Oppermann, U., Schofield, C. J., & McDonough, M. A. (2011). Crystal structure of PHYHD1A, a 2OG oxygenase related to phytanoyl-CoA hydroxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408(4), 553–558. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.059>
89. Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C.-M., Li, C. J., Vågbø, C. B., Shi, Y., Wang, W.-L., Song, S.-H., Lu, Z., Bosmans, R. P. G., Dai, Q., Hao, Y.-J., Yang, X., Zhao, W.-M., Tong, W.-M., Wang, X.-J., Bogdan, F., ... He, C. (2013). ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Molecular Cell*, 49(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>

1 priedas.

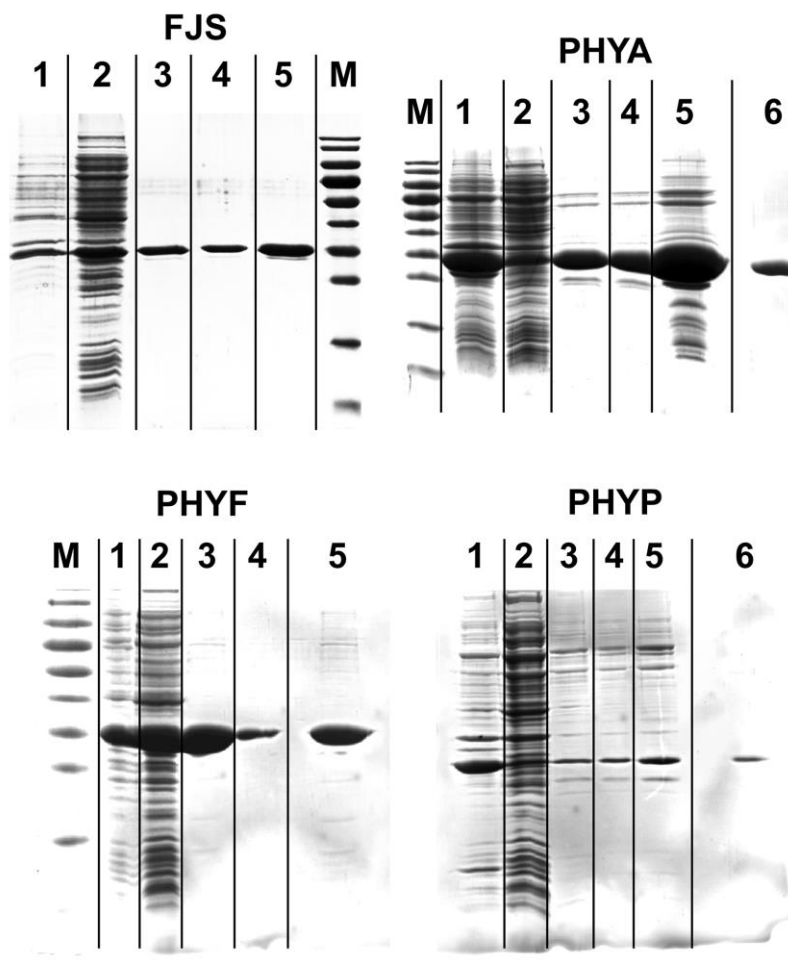
FJS oksigenazės reakcijos su fitanoil-KoA analizė HPLC-MS metodu



1 priedo pav. FJS oksigenazės reakcijos su fitanoil-KoA HPLC-MS analizė. Reakcijos metu susidaręs junginys (teigiamos jonizacijos $m/z = 1078$) 16 m/z vienetų didesnis už fitanoil-KoA.

2 priedas

FJS, PHYA, PHYF ir PHYP baltymų gryninimo žingsnių analizė NDS-PAGE metodu















- 1 – beląstelinio ekstrakto nuosėdos;
- 2 – beląstelinio ekstrakto supernatantas;
- 3 – mėginys po Ni^{2+} chelatinio gryninimo;
- 4 – mėginys po nudruskinimo;
- 5 – mėginys po koncentravimo;
- 6 – mėginys, po papildomo gryninimo jonų mainų kolonėle (atliktas PHYA ir PHYP atveju).

2 priedo pav. FJS, PHYA, PHYF ir PHYP baltymų gryninimo etapai.

3 priedas

FJS, PHYA ir PHYF demetilazių reakcijos mišinių su tRNR analizė, naudojant *Purpald* reagentą

	+ FJS	+ PHYA	+ PHYF	
Baltymų kontrolė be substrato				
OD₅₅₀	0,038	0,083	0,145	
+ Cm				 Cm kontrolė OD ₅₅₀ = 0,077
OD₅₅₀	0,152	0,196	0,279	
+ tRNR				 tRNR kontrolė OD ₅₅₀ = 0,027
OD₅₅₀	0,024	0,028	0,045	
				 Formaldehido (teigiama) kontrolė OD ₅₅₀ = 0,462

3 priedo pav. 2'-*O*-metilnukleozidų demetilazių fermentinio aktyvumo su tRNR tyrimas, naudojant *Purpald* reagentą. Reakcijos buvo vykdytos 17 h 30 °C temperatūroje, TRIS-HCl pH 8,0 buferyje, reakcijos mišiniuose (200 μL) buvo 2 mM tRNR iš *E. coli* MRE 600 kamieno (*Roche*) arba 2 mM 2'-*O*-metilcitolino (teigiama kontrolė), 3 mg/mL FJS, 2,5 mg/mL PHYA arba 2,3 mg/mL PHYF baltymų, po reakcijos į mišinį buvo pridedama 50 μL 30 mM *Purpald* reagento. Cm – 2'-*O*-metilcitolinas, OD₅₅₀ – optinis tankis, esant 550 nm ilgio šviesos bangai.