

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Aleksandr
OSIPENKO

Metodų, skirtų mažųjų
nekoduojančiųjų RNR žymėjimui,
kūrimas

DAKTARO DISERTACIJA

Fiziniai mokslai,
Biochemija 04P

VILNIUS 2019

Disertacija rengta 2011 – 2015 metais studijuojant doktorantūroje Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos institute ir ginama eksternu.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Mokslinis konsultantas:

prof. dr. Giedrius Vilkaitis (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Edita Sužiedėlienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

Nariai:

dr. Rūta Gerasimaitė (Makso Planko Biofizinės chemijos institutas, Vokietija, fiziniai mokslai, biochemija – 04P),

dr. Arūnas Lagunavičius (UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“, fiziniai mokslai, biochemija – 04P),

prof. habil. dr. Kęstutis Sasnauskas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P),

dr. Mindaugas Zaremba (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2019 m. kovo 6 d. 13 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R101 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, R101, Vilnius, Lietuva, tel. +37067646349; el. paštas: aleksandr.osipenko@bti.vu.lt, aleks.o@inbox.ru.

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

VILNIUS UNIVERSITY

Aleksandr
OSIPENKO

Development of new methods for small RNA labeling

DOCTORAL DISSERTATION

Physical sciences,
Biochemistry 04P

VILNIUS 2019

This dissertation was prepared between 2011 and 2015 during the studies at Vilnius University Life Sciences Centre Institute of Biotechnology and is defended on an external basis.

The research was supported by the Research Council of Lithuania.

Academic consultant:

Prof. Dr. Giedrius Vilkaitis (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04P).

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

Chairman – Prof. Dr. Edita Sužiedėlienė (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04P).

Members:

Dr. Rūta Gerasimaitė (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, physical sciences, biochemistry – 04 P),

Dr. Arūnas Lagunavičius (Thermo Fisher Scientific Baltics, physical sciences, biochemistry – 04 P),

Prof. Habil. Dr. Kęstutis Sasnauskas (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P),

Dr. Mindaugas Zaremba (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 1 a.m. on 6th March 2019 in auditorium R101 of the Life Sciences Centre of Vilnius University.

Address: Saulėtekio Ave. 7, R101, Vilnius, Lithuania

Tel. +37067646349; e-mail: aleksandr.osipenko@bti.vu.lt, aleks.o@inbox.ru.

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

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

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	8
ĮVADAS	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1 Nekoduojančios RNR	14
1.1.1 Mažosios nekoduojančios RNR	15
1.1.2 miRNR ir jų svarba	17
1.1.2.1 miRNR molekulių struktūra ir biogenezę	19
1.1.2.2 miRISC kompleksai ir jų susidarymas	21
1.1.2.3 miRISC-iRNR sąveikos ir nutildymo mechanizmai	23
1.2 Metiltransferazė HEN1	28
1.2.1 HEN1 struktūra	29
1.2.2 HEN1 sąveika su RNR ir baltymais	30
1.2.3 HEN1 substratinis specifiskumas	33
1.2.4 HEN1 metiltransferazės biologinis vaidmuo	34
1.3 mTAG technologija	35
1.3.1 mTAG pritaikymas DNR žymėjimui	36
1.3.2 mTAG pritaikymas RNR žymėjimui	39
1.3.3 mTAG pritaikymas kitų biomolekulių žymėjimui ir šio darbo reikšmė ..	44
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	46
2.1 Medžiagos	46
2.1.1 Cheminiai reagentai	46
2.1.2 Buferiniai tirpalai	46
2.1.3 Nukleotidai ir nukleorūgštys	47
2.1.4 AdoMet ir jo sintetiniai analogai	49
2.1.5 Radioaktyvios ir reporterinės žymės, dažai	49
2.1.6 Fermentai ir kiti baltymų preparatai	49
2.1.7 Molekulinės biologijos ir genų inžinerijos rinkiniai, reagentai	49
2.1.8 Mikroorganizmai ir ląstelių linijos	49
2.2 Prietaisai ir priemonės	50
2.3 Kompiuterinės programos	51
2.4 Darbo metodai	51
2.4.1 Oligonukleotidų ir nukleino rūgščių paruošimas	51
2.4.2 Denatūruojančio poliakrilamidinio gelio elektroforezė (dPAGE)	51
2.4.3 Modifikacijų reakcijų kinetinė analizė	52
2.4.4 Tričio inkorporacijos analizė	53
2.4.5 Skysčio chromatografinė-masių spektrometrinė (HPLC-MS) analizė ..	53

2.4.6 Vieno žingsnio žymėjimas biotinu	54
2.4.7 Dviejų žingsnių žymėjimas biotinu	55
2.4.8 Dviejų žingsnių žymėjimas fluoroforu	55
2.4.9 Selektyvus miRNR žymėjimas fluoroforu įvairių RNR mišinyje.....	56
2.4.11 Selektyvus FAM-DNR nukreiptas miRNR alkilinimas mišinyje su U2OS totaline RNR.....	57
2.4.12 Selektyvus DNR nukreiptas miRNR alkilinimas įvairių RNR mišinyje	57
2.4.13 miRNR/SA-DNR modifikacijos analizė.....	57
2.4.14 miRNR/SA-DNR ištraukimo analizė.....	58
2.4.16 Försterio resonansinė energijos pernaša (FRET) tirpale.....	59
2.4.17 Försterio resonansinė energijos pernaša (FRET) gelyje	59
3. TYRIMŲ REZULTATAI	61
3.1 HEN1 katalizuojamo miRNR/miRNR* metilinimo mechanizmo tyrimas...	61
3.1.1 Duplekso grandinių metilinimo prioriteto tyrimas.....	61
3.1.2 Metilinimo, priklausomai nuo 3'-galinio nukleotido, tyrimas	67
3.1.3 Metilinimo, priklausomai nuo erdvinės struktūros, tyrimas	69
3.2 HEN1 taikymas miRNR/miRNR* žymėjimui.....	70
3.2.1 Alkilinimo sintetiniiais kofaktoriais tyrimas.....	72
3.2.1.1 Alkilinimo produktų analizė PAGE metodu	72
3.2.1.2 Alkilinimo produktų analizė HPLC-MS metodu	73
3.2.2 miRNR/miRNR* dupleksų žymėjimo technologijos ir jų pritaikymas ...	78
3.2.2.1 Dviejų žingsnių žymėjimas fluoroforais	79
3.2.2.2 Dviejų žingsnių žymėjimas biotinu.....	82
3.2.2.3 Vieno žingsnio žymėjimas biotinu.....	85
3.3 HEN1 taikymas miRNR/DNR žymėjimui	87
3.3.1 miRNR/DNR heterodupleksų su išsikišusiais galais modifikacija	88
3.3.1.1 miRNR/DNR substratų, turinčių 2 nt išsikišusius 3'-galus, metilinimo tyrimas.....	88
3.3.1.2 miRNR/DNR substratų, turinčių 2 nt išsikišusius 3'-galus, alkilinimo tyrimas	91
3.3.1.3 miRNR/DNR substratų, turinčių skirtingas 3'-galines bazines, alkilinimo tyrimas	94
3.3.1.4 miRNR/DNR substratų alkilinimo įvairių RNR mišinyje tyrimas ..	95
3.3.1.5 miRNR žymėjimo biotinu technologijos ir jų panaudojimas	97
3.3.1.6 miRNR žymėjimo fluoroforais technologijos ir jų panaudojimas ..	100
3.3.2 Netipinės struktūros miRNR/DNR heterodupleksų žymėjimas.....	101

3.3.2.1 miRNR/DNR substratų, turinčių bukų galus, metilinimo tyrimas.	101
3.3.2.2 miRNR/DNR substratų, turinčių bukų galus, alkilavimo tyrimas..	104
3.3.2.3 miRNR/DNR substratų, turinčių DNR 3'-galo išsikišimą, modifikacijos tyrimas.....	105
3.3.2.4 miRNR žymėjimas fluoroforu ir praturtinimas DNR aptameru	107
3.3.3 Modifikacijos turinčių dupleksų žymėjimas	112
3.3.3.1 Substratų, turinčių uždarius nukleotidus (LNA), modifikacijos tyrimas	112
3.3.3.2 miRNR/DNR substratų, turinčių inkorporuotą fluoroforą, modifikacijos tyrimas.....	113
3.3.3.3 Dvigubai žymėto miRNR/DNR substrato FRET analizė	114
4. REZULTATŲ APITARIMAS	119
4.1 Disertacijos darbo fundamentinė reikšmė	119
4.2 Disertacijos darbo praktinė reikšmė	122
IŠVADOS	127
LITERATŪROS SĄRAŠAS	128
PRIEDAI.....	138
SUMMARY	139
LIST OF ABBREVIATIONS	139
INTRODUCTION.....	140
MATERIALS AND METHODS	145
RESULTS AND DISCUSSION.....	150
Study of HEN1 methylation mechanism	150
HEN1 application for miRNA/miRNA* labeling.....	154
DNA-based miRNA labeling with HEN1	158
CONCLUSIONS	167
REFERENCES.....	168
SANTRAUKA.....	170
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS.....	172
PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS.....	173
PEDAGOGINĖ IR MOKSLO POPULIARINIMO VEIKLA	176
DALYVAVIMAS MOKSLINIUOSE PROJEKTUOSE.....	177
CURRICULUM VITAE (<i>Lietuviškai</i>).....	178
CURRICULUM VITAE (<i>in English</i>).....	179
PUBLICATION 1.....	180
PUBLICATION 2.....	181
PUBLICATION 3.....	182
UŽRAŠAMS.....	183

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- a.r. – aminorūgštys / aminorūgščių liekanos
AdoHcy – S-adenozil-L-homocisteinas
AdoMet – S-adenozil-L-metioninas
ATP – adenziltrifosfatas
dgRNR – dvigrandinė RNR
DMSO – dimetilsulfoksidas
dPAGE – denatūruojanti poliakrilamidinio gelio elektroforezė
EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis
FRET - Försterio rezonansinė energijos pernaša
HEN1 – metiltransferazė HuaEnhancer 1
HPLC-MS – aukštos kokybės skysčių chromatografija-masių spektrometrija
JSA – jaučio serumo albuminas
miRNR – kreipiančioji mikroRNR grandinė
miRNR* – lydinčioji mikroRNR grandinė
miRNR/miRNR* – mikroRNR dupleksas
MTazė – metiltransferazė / metiltransferazinis domenas
NDS – natrio dodecilsulfatas
piRNR – su PIWI baltymais sąveikaujančios RNR
pre-miRNR – nesubrendusi miRNR
pri-miRNR – miRNR pirminis transkriptas
RISC (*RNA-induced silencing complex*) – RNR-indukuotas nutildymo kompleksas
RNazė – ribonukleazė
siRNR – mažos interferuojančios RNR
[γ -³²P]-ATP – γ padėtyje ³²P izotopu žymėtas adenzintrifostatas
[γ -³³P]-ATP – γ padėtyje ³³P izotopu žymėtas adenzintrifostatas

Čia gali būti nepaminėti kai kurie visuotinai priimti cheminių junginių arba matavimo vienetų žymėjimai, o taip pat mažai darbe naudotos santrumpos, tačiau jos paaiškintos tekste.

ĮVADAS

Eukariotinių organizmų ląstelėse aptinkamos 20-30 nt ilgio mažosios nekoduojančios RNR (Herkenhoff et al., 2018; Singh et al., 2018), kurios pagal savo atsiradimo mechanizmą, struktūrą ir vykdomas funkcijas skirstomos į tris pagrindines grupes: mikroRNR (miRNR), mažas interferuojančias RNR (siRNR) ir su PIWI baltymais sąveikaujančias RNR (piRNR) (Hirose et al., 2014). Ypatingą biologinę svarbą turi miRNR, reguliuojančios, kaip manoma, iki 50 % visų baltymus koduojančių genų žinduoliuose (Carè et al., 2018), o taip pat siRNR, kurios apsaugo eukariotų genomus nuo virusų ir judriųjų genomo elementų (Islam et al., 2018) (toliau kalbant apie mažasias RNR omenyje bus turimos būtent miRNR ir siRNR).

Kiekybiniai ir kokybiniai mažųjų RNR pokyčiai yra stebimi daugelio įvairių ligų patologijų atvejais, įskaitant neurologinius (Li et al., 2018), širdies-kraujagyslių (Liu et al., 2018) ir vėžinius susirgimus (Carvalho de Oliveira et al., 2018). Ankstyvas minėtų pokyčių nustatymas galėtų padėti diagnozuoti ligas dar pradinėse stadijose, taip ženkliai padidinant sėkmingos terapijos tikimybę. Vis dėlto, šiuo metu egzistuojantys mažųjų RNR detekcijos metodai nėra pakankamai greitai ir patogūs plačiam taikymui bei dažnai pasižymi palyginus aukšta nespecifica. Metodai, paremti polimerazės grandininė reakcija (PGR), yra jautrūs DNR priemaišoms, be to nepakankamai tiksūs, kuomet taikomi tokioms trumpoms molekulėms kaip mažosios RNR. Mikrogardelių technologijos taip pat jautrios priemaišinėms DNR, be to yra brangios, o procedūros – ilgai trunkančios, dėl ko papildomai išauga RNR mėginių degradacijos tikimybė. Be to, net ir pačių mažųjų RNR mėginių gavimas tyrimams pagrindinai remiasi išgryninimu pagal ilgį, kuris dažniausiai būna iki 200 nt ilgio RNR (nors miRNR ir siRNR yra viso labo apie 20-22 nt ilgio), kartu užteršiant mėginius kitomis trumpomis RNR, tokiomis kaip transportinės ar mažos branduolėlio RNR, o taip pat ilgesnių RNR fragmentais ir net DNR

molekulėmis (Yu et al., 2018). Galiausiai visi minėti metodai nesugeba atskirti jau subrendusių mažųjų RNR nuo šių molekulių pirmtakų, kurie dar nedalyvauja genų raiškos reguliacijoje. Tokiu atveju gauti rezultatai gali ženkliai skirtis nuo tikrovės ir praranda savo diagnostinę ar prognostinę vertę.

Disertacijos tyrimų metu buvo kuriamas mikroRNR (miRNR) ir mažųjų interferuojančių RNR (siRNR) žymėjimo metodas, tinkantis šių molekulių detekcijai arba išgryninimui. Šiam tikslui buvo bandyta pritaikyti mažųjų RNR metiltransferazę HEN1 iš *Arabidopsis thaliana* (toliau HEN1). Augalų ląstelėse minėtas fermentas yra specifiškas 20-22 nt ilgio RNR dupleksams, turintiems 1-2 nt išsikišimus 3'-galuose (Yang et al., 2006), t. y., pilnai subrendusioms miRNR ir siRNR molekulėms. HEN1 perneša metilo grupes nuo S-adenozil-L-metionino (AdoMet) kofaktoriaus ant augalų mažųjų RNR 3'-galinių nukleotidų 2'-OH pozicijos. Gyvūnų miRNR ir siRNR, skirtingai nuo augalų, paprastai nėra metilintos (Libri et al., 2013), tačiau pasižymi panašia struktūra, todėl galėtų būti panaudotos kaip substratai HEN1 katalizuojamose reakcijose. Kurto metodo esmė buvo pabandyti pritaikyti metiltransferazę HEN1 kitokių nei metilo grupių pernašai nuo sintetinių AdoMet analogų, kuriuose pernešamas metilo radikalas buvo chemiškai pakeistas į ilgesnį, turintį funkcinę arba reporterinę grupę – pagal anksčiau kitoms molekulėms pritaikytą mTAG (angl. *Methyltransferase-Directed Transfer of Activated Groups*) technologiją (Lukinavičius et al., 2007). Pažymėjus tiriamąją miRNR ar siRNR atitinkama reporterine molekule, tai padėtų šią mažąją RNR detektuoti ir/arba išgryninti. Kuriamo metodo privalumas yra lengvas ir greitas jo pritaikymas kitoms mažosioms RNR: kadangi HEN1 modifikuoja tik dvigrandines RNR molekules, o ląstelėse esančios subrendusios miRNR ir siRNR yra viengrandinės struktūros, žymėjimo reakciją galima lengvai nukreipti, tiriamąją RNR sulydžius su komplementariu sintetiniu

oligonukleotidiniu zonda. Aukšto HEN1 specifiškumo savo substratui dėka visos sukurtos technologijos turėtų būti ypač specifiškos, o taip pat, tikėtina, labai efektyvios.

Tyrimus buvo nuspręsta pradėti nuo mažųjų RNR metilinimo, panaudojant natūralų AdoMet kofaktorių, eksperimentų serijos, kuri leistų išsiaiškinti HEN1 bendras katalizines sąlygas. Minėto fermento vykdomo metilinimo mechanizmo supratimas leistų antroje tyrimų dalyje efektyviau ir kryptingiau pritaikyti metiltransferazę mažųjų RNR žymėjimui, panaudojant sintetinius AdoMet analogus. Galiausiai trečia tyrimų dalis yra paskirta išsiaiškinti ar HEN1 katalizuojama modifikacija gali būti nukreipta link taikinio mažosios RNR, panaudojant ne jai komplementarią RNR, bet DNR ir/ar įvairių cheminių modifikacijų turintį zondą, kas leistų ženkliai praplauti kuriamų technologijų panaudojimo ribas.

Šio **darbo tikslas** yra sukurti efektyvų ir specifišką miRNR bei siRNR dupleksų žymėjimo metodą, tinkantį šių molekulių detekcijai arba gryninimui, panaudojant rekombinantinę *Arabidopsis thaliana* mažųjų RNR metiltransferazę HEN1 bei sintetinius kofaktoriaus AdoMet analogus.

Uždaviniai:

1. Ištirti *Arabidopsis thaliana* metiltransferazės HEN1 mažųjų RNR metilinimo mechanizmą *in vitro* ir nustatyti šiai reakcijai įtaką darančius veiksnius.
2. Pritaikyti metiltransferazę HEN1 šoninių grandinių, turinčių funkcinę arba reporterinę grupę, pernašai nuo sintetinių AdoMet kofaktoriaus analogų ant miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleksų.

3. Nustatyti, ar metiltransferazė HEN1 geba modifikuoti netipinius miRNR/DNR dupleksus. Nustatyti, kokią įtaką metiltransferazei daro buki arba įvairaus ilgio išsikišimus turintys duplekso galai bei jame inkorporuotos kovalentinės modifikacijos.
4. Remiantis gautais rezultatais, sukurti mažųjų RNR žymėjimo technologiją(-as), tinkančią(-as) šių molekulių ištraukimui ir praturtinimui arba specifiniam žymėjimui fluoroforais.

Mokslinis naujumas

Šiame darbe buvo detalai išsiaiškintas HEN1 metiltransferazės miRNR/miRNR* metilinimo mechanizmas. Pirmą kartą buvo pademonstruota, kad HEN1 metiltransferazė yra tinkama pernešti šonines grandines nuo sintetinių AdoMet analogų (Ado-6-amino, Ado-6-azido, Ado-6-etino, Ado-11-amino, Ado-13-biotino ir Ado-18-biotino) ant dvigrandinių miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleksų. Be to, buvo parodyta, kad HEN1 geba kaip metilinti, taip ir alkilinti miRNR ar siRNR grandinę, sulydytą su komplementaria DNR grandine. Netikėtai buvo nustatyta, kad pastaroji DNR grandinė savo 3'-gale gali turėti įvairaus ilgio išsikišimus, tame tarpe sudarančius įvairias erdvinės struktūras tokias kaip funkcionalus streptavidinui specifinis DNR aptameras. Galiausiai pavyko parodyti, kad HEN1 geba modifikuoti substratus bukais galais, skirtingai nuo literatūrinių duomenų, ir kad dviejų nukleotidų išsikišimai RNR 3'-galuose pasirodė nėra būtini metiltransferazei.

Praktinė reikšmė

Atlikto darbo metu buvo sukurtas pagrindas naujiems mažųjų RNR (miRNR ir siRNR) analizės metodams. Sukurtos technologijos buvo sėkmingai pritaikytos miRNR ir siRNR žymėjimui įvairiomis reporterinėmis

molekulėmis. Žymėjimas fluoroforais (Cy5, Eterneono ir kt.) buvo pritaikytas mažųjų RNR specifinei detekcijai, tuo tarpu įvairių biotino konjugatų prijungimas leido sukurti specifinį šių molekulių išgryninimą ir sukonzentravimą iš įvairių nukleorūgščių mišinių, atskiriant nuo priemaišinių RNR ir DNR molekulių. Galiausiai buvo sukurtas dvigubo mažųjų RNR žymėjimo metodas, kurio metu tiriamasis mėginys buvo sulydomas su jam komplementariu oligonukleotidu, turinčiu inkorporuotą reporterinę molekulę (pvz., aptamerą arba fluoroforą), tuo tarpu antra žymė buvo pernešama ant substrato HEN1-katalizuojamos reakcijos pagalba.

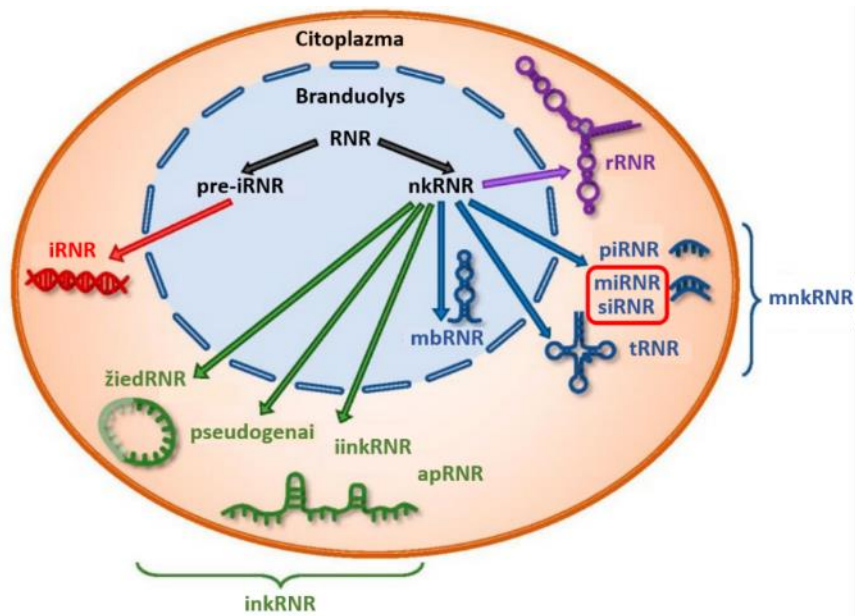
Ginamieji teiginiai:

1. Rekombinantinė *Arabidopsis thaliana* metiltransferazė HEN1 geba pernešti *in vitro* šonines grandines nuo savo kofaktoriaus S-adenozil-L-metionino (AdoMet) sintetinių analogų ant miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* duplexų.
2. HEN1 metiltransferazė geba metilinti ir alkilinti *in vitro* miRNR arba siRNR grandinę, sulydytą su DNR oligonukleotidu arba su oligonukleotidu, turinčiu chemines modifikacijas.
3. Dviejų nukleotidų išsikišimai substratinio duplexo 3'-galuose nėra būtini HEN1 vykdomam metilinimui arba alkilinimui. Metiltransferazė geba modifikuoti substratus, turinčius bukus galus arba duplexus su ilgu (bent kelių-keliolikos nukleotidų ilgio) nemodifikuojamos grandinės 3'-išsikišimu, kuris savyje gali inkorporuoti funkcinę nukleorūgštį, pavyzdžiui, aptamero seką.
4. Metiltransferazė HEN1 gali būti pritaikyta specifiniam miRNR arba siRNR žymėjimui, tinkančiam šių molekulių detekcijai arba ištraukimui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Nekoduojančios RNR

Nekoduojančioms RNR (nkRNR) yra priskiriamos visos RNR, kurių seka nėra tiesiogiai transliuojama į baltymo seką, t. y., visos, išskyrus informacines RNR (iRNR). Nekoduojančias RNR, kurios sudaro didžiąją dalį žmogaus transkriptomo, galima būtų suskirstyti į baltymų transliacijoje dalyvaujančias ribosomines RNR (rRNR) bei įvairius interferencijos procesus reguliuojančias ilgąsias (inkRNR) ir mažąsias (mnkRNR) (Pav. 1.1) (Chan and Tay, 2018).



Pav. 1.1. RNR molekulių klasifikacija. Informacinių RNR pirmtakai (pre-iRNR) duoda pradžią baltymus koduojančioms informacinėms RNR (iRNR). Savo ruožtu baltymų nekoduojančios RNR skirstomos į ribosomines RNR (rRNR) ir kitas, tokias kaip mažosios nekoduojančios RNR (mnkRNR): mikroRNR (miRNR), su PIWI-sąveikaujančios RNR (piRNR), mažos interferuojančios RNR (siRNR), transportinės RNR (tRNR); bei ilgosios nekoduojančios RNR (inkRNR): žiedinės RNR (žiedRNR), pseudogenai, ilgos intergeninės RNR (iinkRNR), antiprasminės RNR (apRNR). Šiame darbe terminas mažosios nekoduojančios RNR (mnkRNR) bus naudojamas išskirtinai miRNR ir siRNR grupėms (paryškinta raudonu stačiakampiu). Modifikuota iš Chan ir Tay, 2018.

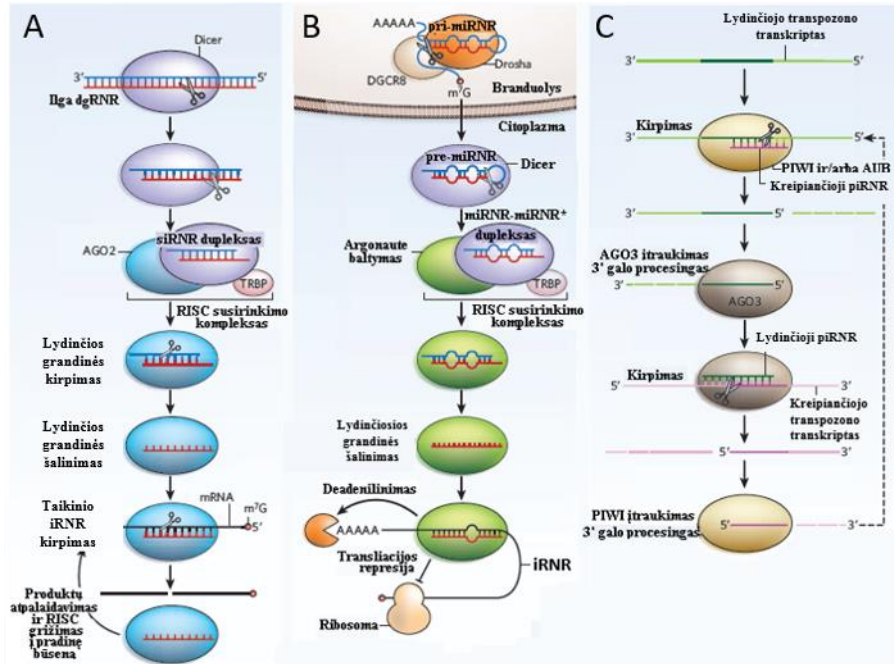
Savo ruožtu **ilgos nekoduojančios RNR** skirstomos į ilgas intergenines nekoduojančias RNR (iinkRNR), antiprasmines RNR (apRNR), pseudogenus ir žiedines RNR (žiedRNR). Vienos labiausiai studijuojamų ilgųjų nekoduojančiųjų RNR pavyzdžių yra beveik 18 kb ilgio Xist, inaktyvuojanti žmogaus X chromosomą (Fang et al., 2015), ir 2,2 kb HOTAIR, plačiai tiriamas dėl savo sąsajų su vėžiniais procesais (Deng et al., 2017).

Visos nekoduojančios interferentinės RNR, trumpesnės, nei 200 nt, vadinamos **mažosiomis nekoduojančiomis RNR**. Prie pastarųjų dažnai priskiriamos transportinės RNR (tRNR), mažos branduolio RNR (mbRNR), tačiau „tikrosiomis“ eukariotų mažosiomis nekoduojančiomis RNR yra laikomos tik trys klasės: mažosios interferentinės RNR (siRNR), mikroRNR (miRNR) ir su PIWI baltymais sąveikaujančios RNR (piRNR) (Chan and Tay, 2018; Chiyomaru et al., 2014; Kishore et al., 2013; Wang et al., 2017; Zheng et al., 2017). Šio darbo rėmuose toliau kalbant apie mažąsias nekoduojančias RNR (mnkRNR) bus kalbama būtent apie siRNR ir ypatingai apie miRNR.

1.1.1 Mažosios nekoduojančios RNR

Visos RNR, ilgesnės už 200 nt, tradiciškai yra priskiriamos ilgosioms, tuo tarpu trumpesnės – mažosioms RNR (Yu et al., 2018). Dėl tokio skirstymo pagal ilgį mnkRNR grupei, kaip buvo minėta, be miRNR, siRNR ir piRNR priskiriamos tRNR ir mbRNR (Chan and Tay, 2018). Vis dėlto pastarųjų kilmė struktūra ir funkcijos ganėtinai skiriasi. Transportinės RNR, nors ir nekoduoja baltymų sekų, dalyvauja baltymų sintezės procesuose, atnešdamos aminorūgštis į ribosomas (Chatterjee et al., 2018). Mažosios branduolio RNR yra svarbios splaisingui (sukirpimui), kadangi dalyvauja splaisosomos susidaryme ir jos funkcionavime (Bohnsack and Sloan, 2018). Šios dvi grupės priskiriamos mnkRNR tik pagal ilgį. Tuo tarpu, likusios trys eukariotų mnkRNR klasės, siRNR, miRNR ir piRNR, pasižymi panašiu ~20-30 nt ilgiu, visos rišasi su Argonaute (Ago) šeimos baltymais, sudarydamos taip

vadinamus RNR indukuotus nutildymo kompleksus (RISC), kuriuose vykdo potranskripcinius genų-taikinių nutildymo procesus (Pav. 1.2) (Arif et al., 2018; Ghildiyal and Zamore, 2009; Romano et al., 2017).



Pav. 1.2. Eukariotų mažųjų nekoduojančių RNR klasių biogenezės ir veikimo mechanizmų principai. A. siRNR kelias žmogaus ląstelėse; B. miRNR kelias vaisingėje muselėje. Visos stadijos ir jose dalyvaujantys veiksniai nurodyti paveikslėlyje yra paaiškinti tekste. dgRNR – dvigrandinė RNR; iRNR – informacinė RNR; TRBP, Drosha, DGCR8, PIWI, AUB ir AGO3 – mnkRNR biogenezės kelių baltymai. Modifikuota iš Jinek and Doudna, 2009.

siRNR susidaro ir labai iš ilgų pilnai komplementarių dvigrandinių RNR, kurias endonukleozė Dicer (gyvūnuose) arba DCL1 (augaluose) sukerpa į subrendusius pilnai komplementarius 20-22 bp siRNR/siRNR* duplexus (Pav. 1.2, a) (Jinek and Doudna, 2009; Singh et al., 2018). Šių duplexų siRNR grandinė vadinama kreipiančiąja, kadangi būtent ji dažniausiai įtraukiama į RISC kompleksus ir nukreipia juos taikinių RNR link, tuo tarpu siRNR* grandinė vadinama lydinčiąja, kadangi ji lydi kreipiančiąją iki duplexo

grandinių atsiskyrimo. Šios klasės mncRNR sąveikauja su Argonaute šeimos Ago pošeimio baltymais. Mažų interferuojančių RNR veikla svarbi apsaugant genomą nuo integracijos į jį kaip savų, taip ir svetimų nukleorūgščių fragmentų, įskaitant virusus ir transpozonus (Arif et al., 2018; Carthew and Sontheimer, 2009).

miRNR būdinga, kad jos visos atsiranda iš plaukų segtuko formos piminio transkripto, vadinamo pri-miRNR, kurio kilpa ir laisvi nesuporuoti galai nukerpami, susidarant miRNR/miRNR* dupleksui (Pav. 1.2, b). Vieną iš šių reakcijų, kaip ir siRNR atveju, vykdo Dicer (gyvūnuose) arba jam homologinė DCL1 (augaluose), tačiau kitam kirpimui reikalingi papildomos endonukleoazės ir jų pagalbiniai baltymai (Jinek and Doudna, 2009). Kadangi pirminis transkriptas yra nepilnai pats sau komplementarus, skirtingai nuo siRNR, ~20-22 nt ilgio miRNR sekose dažnai pasitaiko nesuporuotų nukleotidų (Carthew and Sontheimer, 2009; Singh et al., 2018). Vėliau taip pat kaip siRNR atveju, ta miRNR duplekso grandinė, kuri yra komplementari savo taikinio iRNR, ir vadinama kreipiančiąja, rišasi su Argonaute šeimos Ago pošeimio baltymais, o kita miRNR*, vadinama lydinčiąja, dažniausiai yra sudegraduojama (Arif et al., 2018; Carthew and Sontheimer, 2009; Singh et al., 2018).

piRNR ilgis varijuoja labiau negu siRNR ar miRNR, be to ir jos būna ilgesnės (Pav. 1.2, c). Kaip ir rodo jų pavadinimas, piRNR, skirtingai nuo miRNR ir siRNR, susiriša su Piwi pošeimio Argonaute šeimos baltymais. Kitas skirtumas tarp šių grupių molekulių yra tas, kad jų atsiradimui ląstelėse nereikia Dicer ar į Dicer panašių DCL1 ir DCL2 fermentų (Ghildiyal and Zamore, 2009; Jinek and Doudna, 2009). Be to, piRNR pirmtakai yra viengrandiniai, o ne dvigrandiniai, kaip siRNR ir miRNR, ir atsiranda iš defektyvių transpozonų bei kitų pasikartojančių sekų (Castanotto and Rossi, 2009). Šios klasės mažosios RNR yra randamos tik gyvūnų lytinėse ląstelėse.

piRNR taip pat kaip ir siRNR gali būti įtrauktos į transpozonų nutildymo procesą (Ghildiyal and Zamore, 2009; Rojas-Ríos and Simonelig, 2018).

1.1.2 miRNR ir jų svarba

miRNR yra labiausiai ištirta mncRNR klasė (Catalanotto et al., 2016). Šios RNR rastos įvairiausių taksonominių grupių eukariotiniuose organizmuose, įskaitant visus gyvūnus (žinduolius, paukščius, žuvis, vabzdžius, kirmėles, pintis, duobagyvius), grybus ir augalus, o taip pat ir kai kuriuos vienaląsčius (Christopher et al., 2016; Skalsky and Cullen, 2010). Ilgą laiką buvo manoma, jog miRNR yra būdingos tik eukariotiniams organizmams. Tačiau pastaraisiais metais nustatyta, jog miRNR genai nėra reti net DNR virusų genomuose, ypač herpesvirusų grupės, o taip pat poliomavirusuose, askovirusuose ir adenovirusuose (šiuo metu yra identifikuotos daugiau nei 200 virusinių miRNR) (Arif et al., 2018). Tyrimų duomenys rodo, jog virusai naudoja savo koduojamas miRNR kaip šeimininko ląstelinių procesų reguliacijai, taip ir pačio viruso genų raiškos reguliacijai. miRNR genai virusiniame genome gali būti jam naudingi dėl kelių aspektų: skirtingai nuo virusinių baltymų miRNR nėra imunogeniškos, o patys genai turi ženkliai trumpesnes sekas ir gali evoliucionuoti nepalyginamai greičiau, prisitaikant prie naujų šeimininko apsaugos mechanizmų (Arif et al., 2018; Skalsky and Cullen, 2010).

Eukariotuose miRNR reguliuoja genų raišką dažniausiai degraduojant taikinio iRNR arba nuslopinant jos transliaciją į baltyminį produktą. Taip pat yra žinomi ir kitokie miRNR reguliuojami procesai, tokie kaip transliacijos aktyvacija arba heterochromatino formavimas. Genų raiškos pokyčiai, sąlygoti miRNR vykdomos reguliacijos, daro įtaką įvairiausiems biologiniams procesams, įskaitant ląstelių proliferaciją, diferenciaciją, apoptozę ir vystymąsi, kas gali lemti distrofijos, diabeto ar vėžio atsiradimą

(Catalanotto et al., 2016). Kiekviena miRNR vidutiniškai reguliuoja šimtus skirtingų genų, veikiančių skirtinguose ląstelės keliuose, kurie tarpusavyje susieti į sudėtingus reguliacinius tinklus, todėl net viena miRNR kartais gali „perjungti“ ištiesą ląstelės metabolizmo programą (Christopher et al., 2016).

Bioinformatiniais metodais nustatyta, jog miRNR galėtų sudaryti iki 1 % visų transliuojamų genų, kurie, kaip manoma, reguliuoja apie pusę visų žmogaus baltymus koduojančių genų (skirtingi autoriai nurodo nuo 30 iki 60 % baltymus koduojančių genų) (Christopher et al., 2016; Friedman et al., 2009).

1.1.2.1 miRNR molekulių struktūra ir biogeneze

Genominė miRNR koduojančių genų organizacija būna labai įvairi. Šie genai gali būti autonominiai, tuomet jie turi nuosavus promotorius ir net enhancerius, arba lokalizuotis baltymus koduojančių genų intronuose, būti pavieniai arba sudaryti sankaupas, vadinamas miRNR klasteriais arba tandeminėmis sekomis (Costa et al., 2009). Tais atvejais, kai miRNR genai sudaro tandemines sekas, o visų šių genų nuskaitymas vyksta ta pačia kryptimi, iš pradžių yra sintetinamas bendras policistroninis transkriptas, kuris vėliau sukarpomasi į atskiras miRNR. Jeigu nuskaitymas vyksta priešinga kryptimi, mikroRNR transkriptai paprastai turi atskirus promotorius ir sintetinami nepriklausomai nuo kitų genų (Zhao and Srivastava, 2007). Žinduoliuose daugiau kaip 50% miRNR genų randasi baltymus koduojančių ir nekoduojančių genų introninėse sekose (Garofalo and Croce, 2011).

Dauguma miRNR genų yra autonominiai ir transkribuojami RNR polimerazės II (RP II) arba III (RP III) pagalba, susidarant pirminiam miRNR transkriptui – pri-miRNR (Winter et al., 2009). Pri-miRNR savo 5'-gale turi 7-milgvanozino „kepurę“, o 5'-gale – poli(A) uodegą. Po

transkripcijos kai kurios pri-miRNR gali patirti **redagavimo procesą**, kurio metu adenzinas yra pakeičiamas inozinu (Winter et al., 2009).

Gyvūnuose miRNR brendimas vyksta per dvi kirpimo trečios klasės endoribonukleazėmis stadijas - branduolyje ir citoplazmoje (Jinek and Doudna, 2009). Pirmos stadijos, vykstančios branduolyje, metu pirminis transkriptas, susilankstęs į plaukų segtuko su laisvais 3' ir 5' galais struktūrą, vadinama pri-miRNR, yra įkerpamas Drosha-DGCR8 kompleksu, taip pat žinomo kaip Mikroprocesorius, nukerpant laisvus viengrandinius segtuko galus (Pav. 1.2, b) (Nepal et al., 2016). Susidaro 60-70 nt ilgio segtuko formos fragmentas, vadinamas, pre-miRNR (Nepal et al., 2016). Pre-miRNR toliau yra transportuojama iš branduolio į citoplazmą Exportin 5 baltymo-transporterio pagalba, kur jos kerpamos kitos endonukleazės – Dicer, padedant baltymui-partneriui, turinčiam dgRNR-surišančią domeną – TRBP (žinduoliuose) arba LOQS (musėse). Šio proceso rezultate susidaro miRNR dupleksas, kuris gali būti įtraukiamas į RISC kompleksus (Winter et al., 2009).

Augaluose abi kirpimo reakcijas branduolyje atlieka vienas fermentas, vadinamas DCL1. Ši endonukleazė taip pat kaip ir Drosha ar Dicer, veikia kartu su savitu dgRBD turinčiu baltymu-partneriu HYL1, cinko pirštų domeno baltymu SERRATE (SE) bei kitais baltymais. DCL1, HYL1 ir SE sąveikauja branduolio procesingo centruose, vadinamuose D-kūneliais arba SmD3/SmB-kūneliais (Bologna et al., 2018; Moro et al., 2018). Neseniai mūsų buvo parodyta, kad HEN1 fiziškai sąveikauja su DCL1 ir HYL1, tuo tarpu ryšių su SE nustatyta nebuvo (Baranauskė et al., 2015). Iš branduolio miRNR dupleksai išnešami, padedant jas stabilizuojančiam baltymui-transporteriui HASTY, homologiškam gyvūnų Exportin 5 (Zhang et al., 2017).

Be aprašyto miRNR biogenezės kelio, kuris vadinamas **kanoniniu**, egzistuoja ir kiti keliai. Vienas iš tokių – taip vadinamas **mirtronų** kelias, kuomet miRNR susidaro iš iRNR intronų, vieną iš kirpimų atliekant ne Drosha, bet splaisosomai. Toliau susidaręs tarpinis laso formos produktas yra

nušakojamas DBR1 fermento vėl į linijinę struktūrą ir miRNR pirmtakas patenka į kanoninį kelią tik sąveikos su Exportin-5 metu, prieš išnešant jį iš branduolio į citoplazmą. Paprastai mirtronai nėra tokie konservatyvūs tarp biologinių rūšių, kaip kanoninės miRNR (Rorbach et al., 2018). Be kanoninio mirtronų kelio, egzistuoja **3'-uodeguotųjų**, o taip pat ir **5'-uodeguotojų mirtronų** keliai. Šie panašūs į mirtronų kelią, tačiau po tarpinio laso formos produkto nušakojimo susidariusios RNR 3' arba 5'-galas RNR egzosomos yra sutrumpinamas ir tik tuomet įvyksta sąveika su Exportin-5 (Westholm and Lai, 2011). Kitas žinomas kelias yra miRNR susidarymas iš su Ago baltymu susirišusių trumpų (80-100 nt) intronų, vadinamų **agotronais**. Šiame kelyje pre-miRNR nesiskiria nuo subrendusios miRNR ir nėra kerpama Dicer. Kai kurie agotronai yra visiškai konservatyvūs tarp žinduolių, kas rodo jų didelę biologinę svarbą (Hansen et al., 2016).

Augaluose subrendę miRNR/miRNR* (o taip pat ir siRNR/siRNR*) dupleksai stabilizuojami nuo S-adenozil-L-metionino (SAM) priklausoma metiltransferaze Hua Enhancer 1 (HEN1). Metilo grupės yra pernešamos ant kiekvienos grandinės 3'-galo 2'-OH grupės, tokiu būdu apsaugant miRNR nuo nukleotidilo RNR transferazės HEN1 Suppressor 1 (HESO1), kuri uridilina mažas nekoduojančias RNR jų 3'-galuose ir taip pažymi jas kaip taikinius degradacijai egzozonukleazėmis *in vivo* (Ren et al., 2014; Wang et al., 2018).

1.1.2.2 miRISC kompleksai ir jų susidarymas

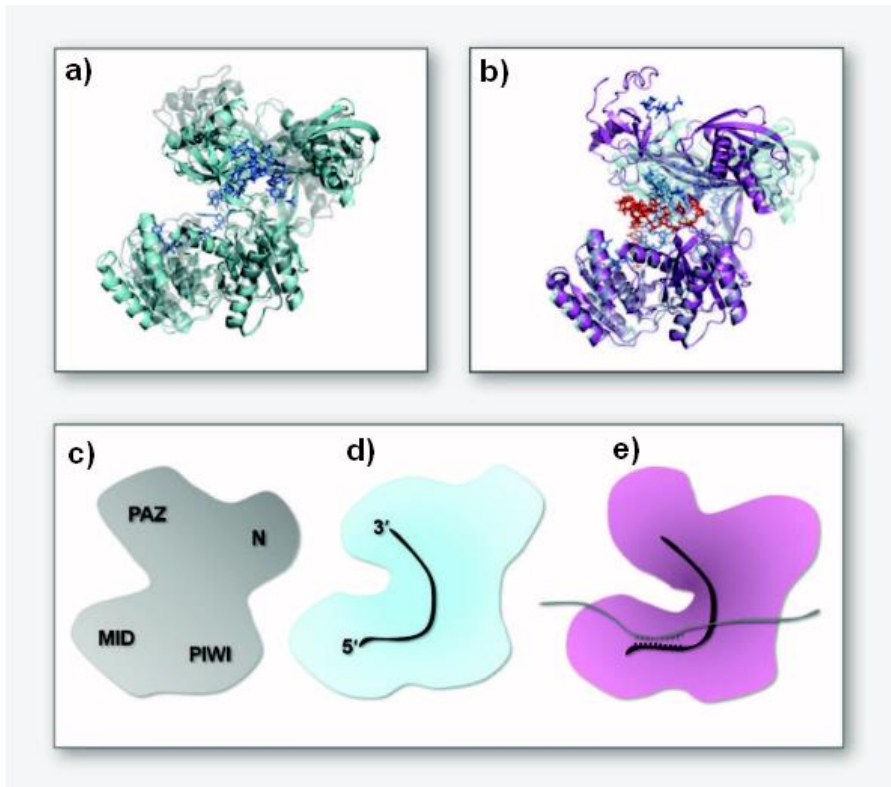
Subrendusios miRNR molekulės yra įtraukiamos į miRISC ribonukleoproteininius kompleksus. Duplekso grandines išvynioja įvairios helikazės ir viena iš grandinių patenka į RISC. Kartais abi miRNA/miRNA* duplekso grandinės įtraukiamos į du skirtingus RISC kompleksus ir abi dalyvauja RNR interferencijoje (Winter et al., 2009). Augaluose grandinės pasirinkimui įtakos gali turėti kiti baltymai: SE, DCL1 ir HYL1. Manoma, kad

HEN1 pakeičiant SE baltymą miRNR/miRNR*-HYL1-DCL1 komplekse, šis kompleksas nukreipia HEN1 vykdomą metilinimą prieš miRNR grandinę, kuri bus įtraukta į sąveiką su AGO1 kompleksu (Baranauskė et al., 2015).

RISC komplekso pagrindą be kreipiančiosios RNR sudaro Argonaute (Ago) šeimos baltymai, fermentas Dicer, RNR surišantis baltymas TRBP ir dgRNR struktūras atpažįstantis elementas PACT (Jinek and Doudna, 2009). Didžiausias vaidmuo tenka Argonaute šeimos baltymams, kurie atlieka dvi pagrindines funkcijas. Visų pirma, Ago vykdo miRNR/miRNR* duplekso lydinčiosios miRNR* grandinės įkirpimą, taip atlaisvinant kreipiančiąją miRNR, kuri iš karto įtraukiama į RISC. Be to, Ago – tai RISC komplekso efektoriai, kurie degraduoja ar destabilizuoja iRNR-taikinį (Winter et al., 2009).

Minėtos šeimos baltymai skirstomi į dvi grupes: Argonaute šeimos Ago pošeimio baltymus, kurie sąveikauja visų pirma su miRNR bei siRNR, o taip pat Argonaute šeimos PIWI pošeimio baltymus, sudarančius kompleksus su piRNR (Winter et al., 2009).

Argonaute baltymo struktūroje yra išskiriami 4 domenai: N-galinis, PAZ, MID ir PIWI (Pav. 1.3). Pirmi du sudaro vieną baltymo skiltį, tuo tarpu MID ir PIWI – kitą. N-galinis domenas, nors ir mažai konservatyvus, dalyvauja daugelyje biocheminių vyksmų. PAZ domenas primena su oligosacharidais bei oligonukleotidais sąveikaujančią klostę ir riša 3'-galinį nukleorūgščių grandinių dinukleotidinį išsikišimą. MID domenas turi 5'-galą surišančią kišenę. Galiausiai C-galinis PIWI domenas pasižymi RNazės H aktyvumu ir yra atsakingas už nukleazinį aktyvumą (Djuranovic et al., 2011).



Pav. 1.3. Argonaute baltymų konformaciniai pokyčiai. Bakterijų Apo-primenančio baltymo skirtingų konformacijų spiraliniai-klostiniai (a ir b) bei schematiniai-struktūriniai (c-e) vaizdai. c – domeninė baltymo struktūra: PAZ, MID, PIWI ir N – atitinkami Argonaute baltymo domenai. Bakterijų Apo-primenantis baltymas (c) keičia savo konformaciją, kai susiriša su miRNR oligonukleotidu (d ir a), ir vėliau keičia konformaciją susiformavus dupleksui tarp miRNR ir taikinio iRNR (e ir b) (iš Djuranovic et al., 2011).

1.1.2.3 miRISC-iRNR sąveikos ir nutildymo mechanizmai

RISC kompleksuose miRNR reikalingos taikinių atpažinimui. Taikiny yra atpažįstamas pagal Votsono-Kriko susiporavimą tarp miRNR kreipiančiosios grandinės ir jos iRNR-taikinio. Neskaitant kelių išimčių, gyvūnuose miRNR susirišimo sritys randamos iRNR molekulių 3'-galų netransliuojamuose regionuose (3'-UTR) (Feng et al., 2018). Tuo tarpu augaluose iRNR susirišimo sritys beveik visada yra koduojančioje dalyje (Kumar et al., 2018).

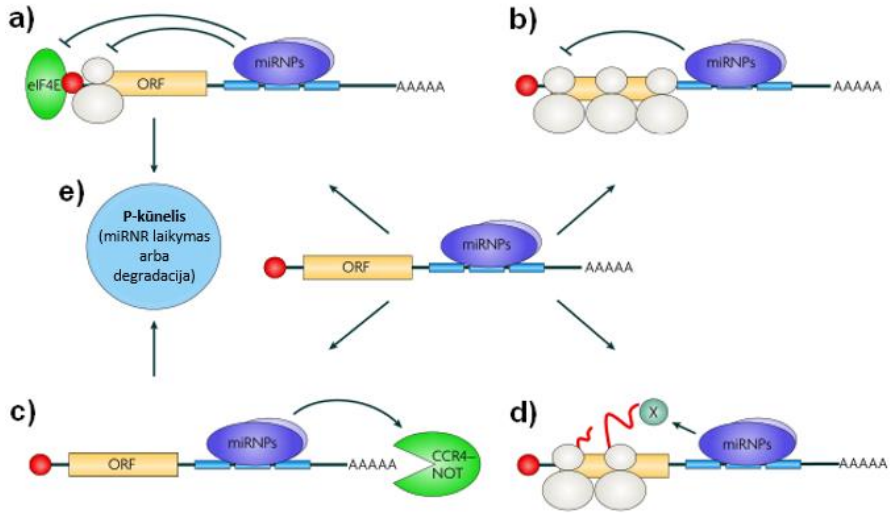
Gyvūnuose dėl nevisiško iRNR ir miRNR sekų sutapimo taikinio susirišimas su miRNR dažnai įvyksta, susidarant kilpoms tarp RNR grandinių, tuo tarpu augaluose komplementacija tarp RNR yra ideali arba arti tokios (Carthew and Sontheimer, 2009). Nustatyta, kad RISC neskaito iRNR-taikinio išilgai nuo 5'-galo ar 3'-galo, panašiai kaip tą daro ribosomos, o vietoj to atsitiktinai bando prisijungti įvairiose iRNR vietose, nespecifiškai surišdamas sekas, bei disocijuoja nuo jų, kol nesuranda teisingą taikinį (Li and M Rana, 2014; Rana, 2007).

Nežiūrint į tai, kad kartais miRNR kompleksai gali stimuliuoti genų raišką, paprastai jų poveikis yra slopinamo pobūdžio ir vadinamas genų nutildymu (Michlewski and Caceres, 2018). Skiriamos dvi šio proceso mechanizmų grupės: tiesioginė endonukleolitinė iRNR degradacija bei nutildymas be taikinio degradacijos, įvairiais būdais neleidžiant vykti iRNR transliacijai (Djuranovic et al., 2011; Filipowicz et al., 2008). Paprastai iRNR-taikinio nutildymo mechanizmas priklauso nuo jo komplementarumo lygio su kreipiančiąja miRNR.

Sąveikoms su taikinio-iRNR yra labai svarbios miRNR pozicijos nuo antros iki aštuntos nuo 5'-galo. Šis regionas vadinamas „seed“ regionu (angl. termino reikšmė „pradžia“ arba „užsėjimas“). Šios miRNA vietos sąveika su iRNR yra būtina ir privalo būti ištisinė, be nesuporuotų nukleotidų (Roberts and Borchert, 2017). Kadangi minėta sritis yra pakankamai trumpa, o miRNR dažnai patiria vieno ar kelių nukleotidų praradimą ar prijungimą jų brendimo metu, sekoskaitos duomenyse dažnai sutinkamos miRNR variantai, besiskiriantys vos vienu ar dviem nukleotidais (Liang et al., 2017). Šie miRNR izomerai vadinami **izomiRais**, kurie, nežiūrint labai panašios sekos, dažnai gali rištis prie skirtingų taikinių-iRNR, o kadangi viena miRNR gali reguliuoti šimtus genų ir tas pats genas gali būti reguliuojamas kelių miRNR, izomiRų reguliuojamų genų profilis gali drastiškai skirtis (Guo and Chen, 2014)

Judant toliau nuo šio „seed“ regiono link miRNR 3'-galo miRNR-iRNR sąveika gali būti neideali – turinti tarpusavyje nekomplementarių bazių porų intarpų. Aukštos komplementacijos išilgai viso miRNR ilgio sąlygomis iRNR-taikinys paprastai yra sudegraduojamas – tai dažnas reiškinys augaluose. Kitaip gyvūnuose, dėl mažesnio komplementarumo tarp RNR molekulių laipsnio, pagrindinis genų nutildymo mechanizmas vyksta be iRNR-taikinių degradacijos. Tačiau yra žinomos ir išimtys abiejose šių organizmų grupėse – gyvūnuose gali vykti degradacija, o augalų miRNR gali blokuoti transliaciją, nekerpant taikinių (Ghildiyal and Zamore, 2009).

Reguliuojamų genų neendonukleolitinė represija gali pasireikšti įvairiais būdais (Pav. 1.4). Visų pirma miRNR gali slopinti transliacijos iniciaciją, trikdamas iRNR kepurės atpažinimą arba ribosomos didžiojo subvieneto prisijungimą (Pav. 1.4, a) (Filipowicz et al., 2008). Taip pat galimas poiniciacinio nutildymo mechanizmas, vadinamas transliacijos elongacijos represija (Pav. 1.4, b). Šiuo atveju miRISC kompleksas gali lėtinti elongacijos greitį arba vykdyti ribosomos „numetimą“ nuo iRNR. Galimas ir dar vienas mechanizmas, vadinamas taikinio poli(A) uodegos deadenilinimu (Pav. 1.4, c). Šio proceso metu iRNR yra destabilizuojama, dėl ko gali vykti jos netiesioginė degradacija. Be to, galimas ir dar vienas nutildymo mechanizmas – proteolizė (Pav. 1.4, d). Į šį transliacijos represijos mechanizmą be RISC yra įtraukta proteazė, kuri transliacijos elongacijos metu skaldo sintetinamą baltymą. Galiausiai represuojami iRNR-taikiniai gali būti saugomi ar degraduojamos P-kūneliuose (Pav. 2.4, e) (Filipowicz et al., 2008).



Pav. 1.4. Gyvūnų miRISC indukuojami potranskripcinio genų nutildymo mechanizmai, neįtraukiantys tiesioginės endonukleolitinės iRNR degradacijos: translacijos iniciacijos etapo represija (a), elongacijos etapo represija (b), iRNR deadenilinimas (c), transliuojamo baltymo proteolizė (d), saugojimas ar degradacija P-kūneliuose (e). miRNPs (paryškinta mėlynai)– ribonukleoproteinai, į kurių sudėtį įeina miRNR (miRISC kompleksai); raudonas apskritimas – iRNR-taikinio „kepurė“; AAAAA – poli(A) „uodega“; ORF (angl. *open reading frame*) – atviras skaitymo rėmelis; žydri keturkampiai – netransliuojami regionai; eIF4E – eukariotų iniciacijos veiksnys 4E; CCR4-NOT – deadenilazės kompleksas; X – proteazė (iš Filipowicz et al., 2008).

1.1.2.4 miRNR biologinė svarba ir miRNR terapija

miRNR vykdomi potranskripcinės reguliacijos mechanizmai daro įtaką daugeliui biologinių procesų, kurie apima apoptozę, hematopoetinę diferenciaciją, kardiogenezę ir miogenezę, odos morfogenezę ir nervų vystymąsi, todėl atskirų miRNR raiškos profiliai pakinta skirtingų ligų atvejais, įskaitant įvairius vėžinius susirgimus, hepatito C infekcijų, miokardo infarkto, širdies fibrozės, aterosklerozės ir kitų širdies ir kraujagyslių ligų atvejais, esant inkstų fibrozei, metabolinių ir uždegiminių ligų atvejais. (Christopher et al., 2016; Garofalo and Croce, 2011; Szymczyk et al., 2018). Dėl šių priežasčių šiuo metu yra bandoma vystyti du pagrindinius miRNR

terapijos kelius: esant tam tikros miRNR nepakankamumui ir norint padidinti jos veikimo ląstelėse efektą į organizmą gali būti įvedami vektoriai, kurių transkripcija padidina reikiamos miRNR kieki, arba galima tiesiogiai įvesti dvigrandinę miRNR. Tokių molekulių pristatymo į norimus organus ar audinius efektyvumas gali būti padidintas, naudojant liposomas ar įvairias nanodaleles. Priešingu atveju, esant tam tikrų miRNR pertekliui, galima įvesti molekules, inhibuojančias šias miRNR (Christopher et al., 2016).

Kadangi miRNR reguliuoja ir onkogenų, ir vėžio supresorių genų raišką, vėžio atsiradimą gali sąlygoti kaip miRNR funkcijų praradimo, taip ir įgijimo mutacijos (Garofalo and Croce, 2011). Ypatinę vaidmenį miRNR terapijai gali turėti miRNR, vadinamos **metastamir**. Tai yra miRNR, kurios skatina (onkomiRai) arba slopina (vėžio supresoriai) vėžinių ląstelių migraciją ir metastazę, o jų raiška gali stipriai koreliuoti su vėžinio susirgimo prognoze. Pavyzdžiui, norint inhibuoti miRNR, kuri veikia onkogeniškai (vadinamą **onkomir**), gali būti naudojami pastarajai komplementarūs (kreipiantys) oligonukleotidai (AMO), kitaip vadinami **antagomirais** (Pradhan et al., 2017). Alternatyviai gali būti naudojami modifikuoti (pvz., 2'-O-metilinti) arba skirtingas chemines struktūras turintys sintetiniai oligonukleotidai, tokie kaip uždarnosios nukleorūgštys (LNA, angl., *locked nucleic acid*), peptidinės nukleorūgštys (PNA, angl., *peptide nucleic acid*) ir kiti junginiai, pasižymintys didesniu stabilumu bei dažnai stipresnėmis sąveikomis su taikinio molekulėmis (Quijano et al., 2017; Rupaimoole and Slack, 2017). Be to, inhibicijos efektas gali būti reguliuojamas, naudojant **miRNR kempines** (angl. miRNA sponges), žiedines RNR, turinčias daugybines vienai arba kelioms skirtingoms miRNR komplementarias sekas. Dar viena galimybė yra naudoti **miRNR maskuotę** (angl. *miRNR masking*), įvedant sekas, kurios, priešingai, yra komplementarios taikinio iRNR 3'-netransliuojamam regionui, taip konkuruojant su miRNR molekulėmis (Christopher et al., 2016).

Tokios terapijos sėkmė stipriai priklauso nuo miRNR ar siRNR pristatymo į reikalingus audinius organizme efektyvumo ir greitumo, kraujyje išsaugant terapines RNR koncentracijas. Pagrindinės šiuo metu vystomos *in vivo* pristatymo strategijos, pagerinančios oligonukleotidų patekimą į taikinio ląsteles: a) oligonukleotido įvedimas konjugatuose su cholesteroliais; b) pristatymas nanodalelėmis, turinčiomis paviršiaus ligandus, pvz., transferiną, kurie rišasi prie reikalingų ląstelių receptorių; c) oligonukleotidai gali būti pristatomi lipidiniame dvisluoksnyje, padengtame polietilenglikolio konjugatais; d) pristatymas specifiniais antikūniais, e) oligonukleotido cheminis prijungimas arba kotranskripcija su aptameriais, turinčiais specifiškumą prieš tam tikrų ląstelių receptorių ir kt. (Castanotto and Rossi, 2009).

1.2 Metiltransferazė HEN1

Metiltransferazės – tai fermentai, pasižymintys sugebėjimu pernešti metilo grupes ant savo substratų. Dauguma šios klasės fermentų kaip metilo donorą naudoja S-adenozil-L-metionino (SAM) kofaktorių. Paprastai nuo SAM priklausomos metiltransferazės turi mažą sekų panašumą tarpusavyje, tačiau suformuoja labai konservatyvią erdvinę struktūrą. Nors šių fermentų aminorūgščių liekanos, surišančios visiems bendrą kofaktorių, pasižymi labai nedideliu konservatyvumu, tačiau surišimo vieta išsidėsto toje pačioje erdvinės struktūros dalyje (Martin and McMillan, 2002).

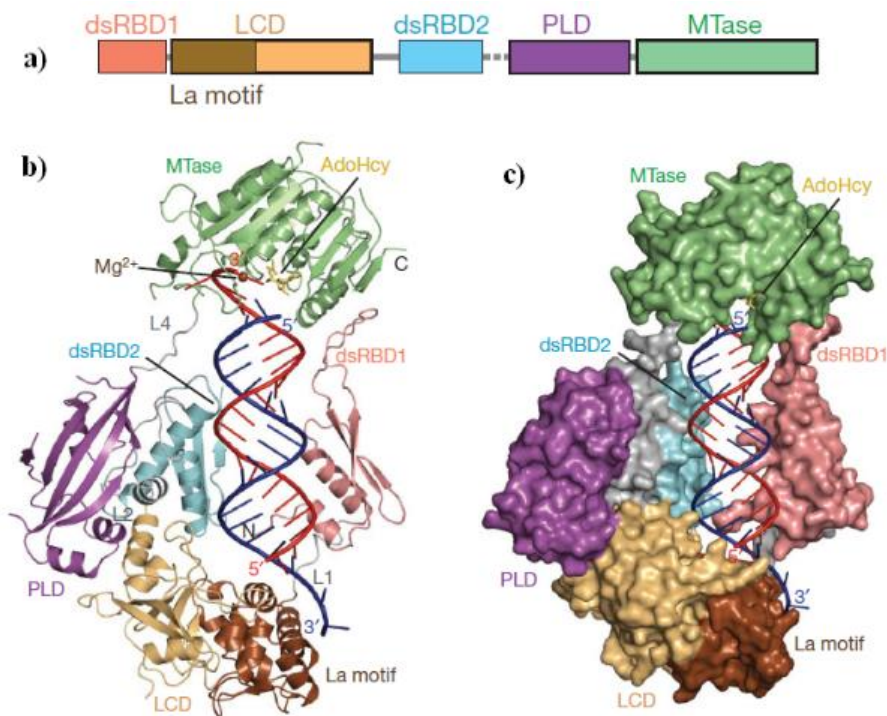
Visos mažosios RNR augaluose (miRNR ir siRNR), gyvūnų piRNR bei kai kurios *Drosophila* ir *C. elegans* siRNR yra 2'-O-metilintos 3'-galuose. Ši modifikacija yra vykdoma HEN1 metiltransferazių ir apsaugo mažąsias RNR nuo uridilinio, trumpėjimo ir degradacijos (Wang et al., 2015). HEN1 yra plačiai paplitusi RNR 2'-O-metiltransferazių šeima, kurios atstovai aptinkami skirtinguose eukariotiniuose ir prokariotiniuose organizmuose ir turi homologinį katalizinį domeną (Billi et al., 2012).

Arabidopsis thaliana metiltransferazė HEN1 dalyvauja augalų miRNR, o taip ir siRNR metilinimo reakcijose, kurios vyksta tiek branduolyje, tiek ir citoplazmoje (Lózsza et al., 2008). MiRNR modifikacijos metu metilo grupės yra pernešamos nuo S-adenozil-L-metionino (AdoMet) ant miRNR/miRNR* dupleksų abiejų grandinių 2'-OH pozicijų 3'-galuose. Kaip buvo minėta mnkRNR metilinimas atlieka svarbų vaidmenį, apsaugodamas jas nuo uridilinio ir taip užtikrindamas stabilumą (Wang et al., 2018).

1.2.1 HEN1 struktūra

Arabidopsis thaliana HEN1 fermentas – tai pakankamai ilgas, iš 942 aminorūgščių liekanų sudarytas baltymas. HEN1 ir jo homologų sekos taip stipriai skiriasi nuo kitų metiltransferazių, kad iš pradžių šis fermentas nebuvo identifikuotas kaip MTazių atstovas.

Baltymo polipeptidinėje sekoje yra išskiriami penki domenai, iš kurių tik PLD (*PPIase like domain*) nesąveikauja su RNR (Pav. 1.5). HEN1 metiltransferazės N-gale (a.r. 1-90) yra dgRNR surišantis motyvas (dsRBD1). Šalia jo randasi kitas RNR surišantis domenas – La motyvą turintis domenas (LCD) (a.r. 91–200) (Pav. 1.5, a) (Tkaczuk et al., 2006). N-galiniai domenai yra svarbūs katalizinio komplekso stabilizavimui (Vilkaitis et al., 2010). Centrinėje HEN1 metiltransferazės dalyje (a.r. 201–529) lokalizuotas antras dgRNR surišantis domenas – dsRBD2. Prieš katalizinį HEN1 domeną (a.r. ~530–680), aptiktas dar vienas, būdingas peptidil-prolino *cis-trans* superšeimai (PPIase), dėl ko jis buvo pavadintas į PPIase panašiu domenu (PLD) (Pav. 1.4, a). Baltymo C-gale randasi C-galinis domenas (CTD, a.r. ~694–911), kurio struktūra yra labai panaši į Rossmann-fold MTazių (RFM) superšėimos C-galinius domenus. Ši sritis yra atsakinga už sąveikas su S-adenozil-L-metionino kofaktoriais ir jo pernašą ant substrato (Tkaczuk et al., 2006).



Pav. 1.5. HEN1 metiltransferazės struktūra. a) HEN1 domenų schematinis pavaizdavimas; b) spiralinė-klostinė ir c) erdvinė-paviršinė HEN1-miRNR-AdoHcy komplekso schemas. AdoHcy – S-adenozil-L-homocisteinas, demetilintas kofaktoriaus metabolitas. Raudonai pažymėta metilinama miRNR duplekso grandinė, mėlynai – nemodifikuojama. dsRBD1 ir 2 – dvigrandę RNR surišantys motyvai; LCD – La motyvą turintis domenas; PLD – į peptidil-prolino *cis-trans* baltymams būdingą panašus domenas; MTase – metiltransferazinis fermento domenas. b paveiksle pavaizduota Mg²⁺ rišimosi vieta. Modifikuota pagal Huang Y. et al., 2009.

1.2.2 HEN1 sąveika su RNR ir baltymais

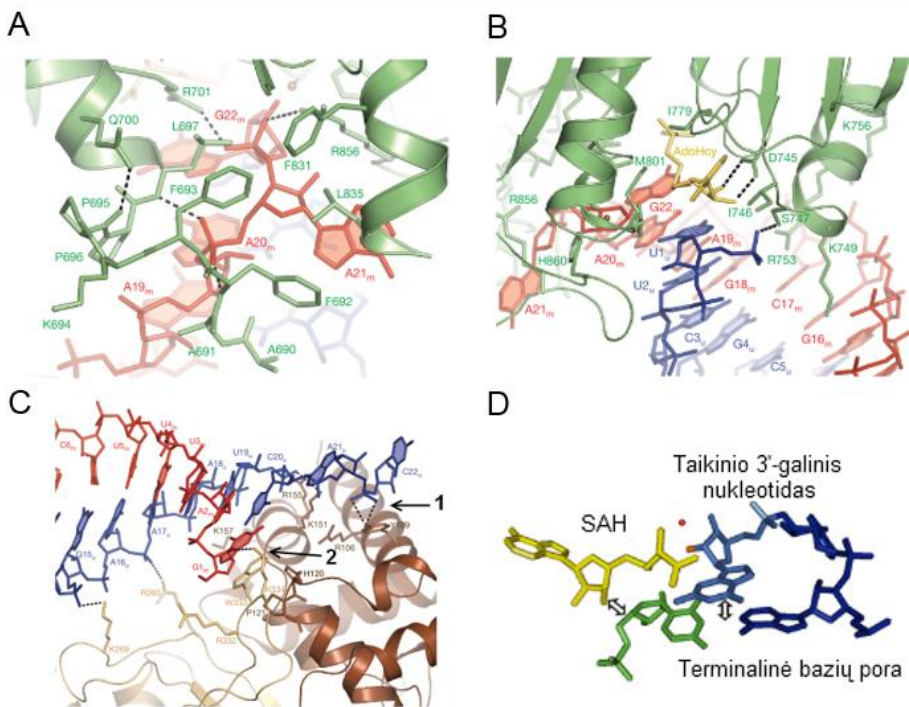
A-formos RNR dupleksas yra rišamas dviejų dvigrandinę RNR surišančių domenų – dsRBD1 ir dsRBD2 (Pav. 1.5). dsRBD1 turi 3 konservatyvius RNR surišimo motyvus, o dsRBD2 nustatyti tik 2 tokie motyvai. Dėl šio skirtumo dsRBD1 sąveikauja su didesniu substrato paviršiaus plotu (Pav. 1.5, b ir c). Būtent tai gali paaiškinti, kodėl domenas yra kritiškai svarbus RNR atpažinimui, o jo praradimas ženkliai sumažina HEN1 rišimąsi prie substrato. Savo ruožtu dsRBD2, lyginant su dsRBD1, randasi

maždaug 3 angstromais toliau nuo RNR, ir tai gali įtakoti specifiškumą substratams, turintiems nesuporuotų nukleotidų, kas kaip tik yra miRNR dupleksams būdingas požymis (Huang et al., 2009).

Dvigrandinės RNR pusė, turinti metilinos grandinės 5'-galą ir nemetilinamos grandinės 3'-galą, yra rišama La motyvą turinčio domeno (LCD) (Pav. 1.5). La motyvas, sudarantis maždaug pusę LCD domeno N gale, pasižymi specifine sąveika su RNR 3'-galais (Pav. 1.6, c, 1). Vis dėlto ši sąveika nėra kritiškai svarbi substrato atpažinimui – pakeitus nemetilinamos grandinės 3'-galo 2 nt išsikišimą į 1 ar 3 nt, nebuvo pastebėta HEN1 aktyvumo skirtumų RNR duplekso metilinos grandinėje. Sąveikai su metilinos RNR duplekso grandinės 5'-galu yra svarbi HEN1 baltymo W333 aminorūgšties liekana (Pav. 1.6, c, 2) (Huang et al., 2009).

Tuo tarpu kitoje RNR duplekso pusėje esantis metilinos grandinės 3'-galo 2 nt išsikišimas yra giliai įsiterpęs į metiltransferaziniu aktyvumu pasižyminčio MTazės domeno aktyvųjį centrą (Pav. 1.6). Su šio RNR duplekso galo dydžiuoju grioviu sąveikauja trys augaluose konservatyvios teigiamai įkrautos aminorūgščių liekanos – K749, R753 ir K756, dalyvaujančios 5'-fosfato atpažinime (Pav. 1.6, b). Fosforibozinio karkaso fosforilo liekana, jungianti 3'-galo dviejų nukleotidų išsikišimą su likusia duplekso dalimi, yra įtvirtinta kilpos, suformuotos iš F692-F697 aminorūgščių liekanų (Pav. 1.6, a).

Du RNR fosfodiesterinės jungties deguonies atomai formuoja vandenilines jungtis su F692-F697 pagrindinės grandinės amino grupėmis. Hidrofobinės sąveikos papildomai stabilizuoja šią kilpą (Pav. 1.6, a). Dauguma aminorūgščių liekanų kilpoje yra konservatyvios ir būdingos ne tik augalų HEN1 metiltransferazei, bet ir jos homologams gyvūnuose (Huang et al., 2009). Nustatyta, jog HEN1 besirišant su dvigrandinėmis miRNR, pastarosios gali padėti fermento kataliziniam centrui įgauti katalizei tinkamą orientaciją. Tai taip vadinamas substrato palaikomos katalizės reiškiny.



Pav. 1.6. Dvigrandės RNR atpažinimas ir metilinimo katalizė HEN1 aktyviajame centre. a) Metilinamos grandinės (pažymėta raudonai) fosforibozinio karkaso fosforilo liekanos, jungiančios 3'-galo dviejų nukleotidų išsikišimą su likusia duplekso dalimi, įtvirtinimas baltymo kilpoje, suformuotoje iš F692-F697 aminorūgščių liekanų. Sąveikos parodytos punktyrinėmis linijomis. Paaiškinta tekste. b) Metilinamo duplekso galo nemodifikuojamos grandinės (mėlynos) 5'-fosfatinės grupės atpažinimas konservatyvių aminorūgščių liekanų – K749, R753 ir K756. c) LCD domeno sąveika su nemodifikuojamu miRNR duplekso galu. Nemetilnamos grandinės (pažymėta mėlynai) dviejų nukleotidų 3'-galo išsikišimas atpažįstamas baltymo La motyvo (1). Metilinamos grandinės (pažymėta raudonai) 5'-galinio nukleotido heterociklinė bazė sąveikauja su W333 (2) (iš Huang et al., 2009). d) HEN1 metiltransferazės reakcijos centro reprezentacija. S-adenozil-L-homocisteinas paryškintas geltonai; taikinio 2'-hidroksilo grupė paryškinta oranžine spalva; 3'-galiniai taikinio RNR grandinės nukleotidai paryškinti mėlynai; nemetilnamos grandinės 5'-galinis nukleotidas paryškintas žaliai; katalizinis Mg^{2+} paryškintas raudonai. Supaprastinimo dėlei HEN1 katalizinio centro aminorūgščių liekanos neparodytos. Baltos rodyklės vaizduoja galinių bazių porų sąveikas, padedančias kofaktoriui ir taikinio nukleotidui priimti katalizei teisingą konformaciją (iš Vilkaitis et al., 2010).

Jo metu atskiros miRNR duplekso grandinės HEN1 kataliziniame centre gali funkcionuoti kaip vienas struktūrinis vienetas, sąveikaudamos tarpusavyje ir palaikydamos katalizei reikalingas reaktantų konformacijas (Pav. 1.6, d) (Vilkaitis et al., 2010).

Neseniai buvo parodyta, kad HEN1 *in vitro* tiesiogiai sąveikauja su Mikroprocesoriaus, kuris yra svarbus miRNR biogenezei, komponentais RNR surišančiu baltymu HYL1 bei DCL1, tačiau nesiriša prie SERRATE baltymo (Baranauskė et al., 2015).

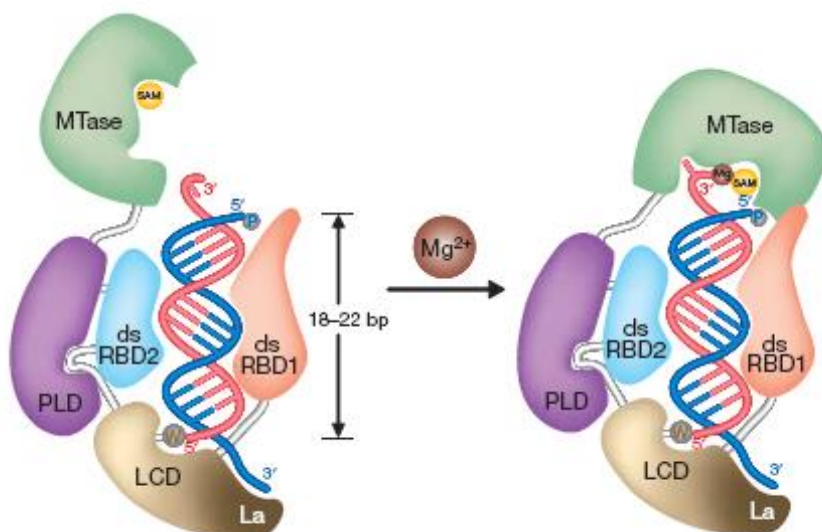
1.2.3 HEN1 substratinis specifiskumas

HEN1 metiltransferazinis aktyvumas priklauso nuo tam tikrų reikalavimų substratui patenkinimo lygio. Tam, kad substratas būtų atpažintas, jo ilgis turi būti nuo 19 iki 25 bp RNR/RNR dupleksas (Huang et al., 2009). Tai yra vienas svarbiausių reikalavimų, sąlygotas atstumo tarp baltymo MTazinio domeno aktyvaus centro, su kurio sąveikauja metilinamas RNR galas, ir LCD domeno, kuriame įsitvirtina kitas duplekso galas (Pav. 1.7) (Huang et al., 2009).

Kitas svarbus reikalavimas yra 2 nt ilgio išsikišimai duplekso 3' galuose. Didžiausiu specifiskumu HEN1 pasižymi būtent 21-24 nt ilgio dvigrandėms miRNR turinčioms 3'-išsikišimus, dupleksai su bukais galais yra silpnai HEN1 modifikuojami (Yang et al., 2006). Iš kitos pusės, nemetilinamos grandinės 3'-gale esantis išsikišimas, trumpesnis ar ilgesnis vienu nukleotidu, praktiškai neturi įtakos substrato atpažinimo efektyvumui (Huang et al., 2009).

Neseniai atlikti tyrimai paneigė anksčiau vyravusią teoriją, jog HEN1 teikia prioritetą miRNR prieš siRNR. Buvo nustatyta, kad pilnai komplementarūs siR173/siR173* ir dalinai suporuotas miR173/miR173* *in vivo* metiltransferazės yra rišami labai panašiai (Baranauskė et al., 2015). Dar

anksčiau buvo parodyta, jog siRNR ir miRNR konkuruoja dėl HEN1 katalizuojamo metilinimo *in vivo* (Yu et al., 2010).



Pav. 1.7. Siūlomas HEN1 dvigrandinių mažųjų RNR atpažinimo pagal substrato ilgi modelis ir nuo Mg²⁺-priklausomas 2'-O-metilinimo mechanizmas. MTase – metiltransferazinis domenas, PLD – į peptidil-prolil-cis/trans-izomerazę panašus domenas, dsRBD1 ir 2 – dvigrandinę RNR surišantys domenai, LCD – La motyvą turintis domenas, SAM – AdoMet (iš Huang et al., 2009).

1.2.4 HEN1 metiltransferazės biologinis vaidmuo

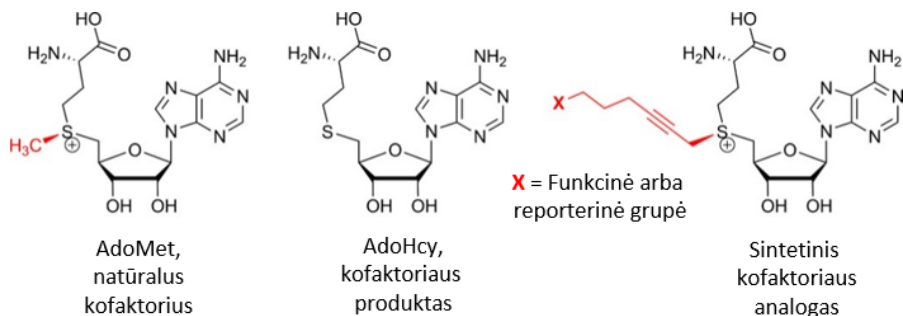
Arabidopsis thaliana hen1 mutantų ląstelės turi daug mažesnius miRNR kiekius, o šių molekulių ilgis įvairuoja. Be to, tokiems augalams visiškai sutrinka RNR interferencijos procesai, o jų fenotipas panašus į tą, kuris išsivysto praradus pagrindinių šio mechanizmo komponentų, įskaitant Dicer ir Argonautų baltymus, aktyvumą (Kurth and Mochizuki, 2009). *Hen1* augalų mutantai turi trumpesnę stiebą bei mažesnius lapus, kurių forma ryškiai skiriasi nuo laukinio tipo augalų lapų formos (Chen et al., 2002). Be to, tokie augalai formuoja mažiau žiedadulkių ir sėklų ir pasidaro sterilūs (Oliver et al., 2017). Metilinimo svarbą rodo ir faktas, kad kai kurie augaliniai virusai bandydami apsisaugoti nuo RNR interferencijos mechanizmo, šį reiškinį

slopina būtent per miRNR modifikacijos stadijos inhibiciją (Lózsza et al., 2008).

HEN1 gali atlikti ir kitokias funkcijas. Ši metiltransferazė gali dalyvauti nevisai teisingą antrinę struktūrą įgavusių dvigrandinių RNR molekulių stabilizacijoje, tokiu būdu padedant nuo RNR priklausomai RNR polimerazei (RdRP) produkuoti ilgas absoliučiai taisyklingos struktūros RNR molekules (Boutet et al., 2003).

1.3 mTAG technologija

Metiltransferazių nukreipta aktyvuotų grupių pernaša (angl., *methyltransferase-directed transfer of activated groups*, mTAG) – biomolekulių žymėjimo technologija, išnaudojanti nuo S-adenozil-L-metionino (AdoMet) priklausomų metiltransferazių specifiskumą savo substratui, pernešant ant jo norimas chemines grupes. Kadangi metiltransferazės paima pernešamą grupę nuo AdoMet ir yra specifškos savo substratui pagal tam tikrą požymį, pvz., atrenka substratą metilinimui pagal seką, substrato dydį, atpažįsta tam tikrą struktūrą ir t.t., chemiškai pakeitus pernešamą metilo grupę kofaktoriuje į mūsų norimą (Pav. 1.8), yra įmanoma sukurti įvairių biomolekulių žymėjimo pagal tą pati požymį technologijas (su sąlyga, kad fermentas panaudos tokį sintetinį kofaktorių). Pavyzdžiui, M.HhaI metiltransferazė, atpažįstanti dvigrandinių DNR molekulių GCGC seką ir modifikuojanti pabraukto citozino penktąją (C5) poziciją, gali būti panaudota tam, kad perneštų į šią poziciją įvairias ilgesnes nei metilo chemines grupes, kurios galėtų būti panaudotos, pavyzdžiui, substrato vizualizacijai arba gryninimui (Dalhoff et al., 2006; Klimašauskas and Weinhold, 2007; Lukinavičius et al., 2007; Masevičius et al., 2016). Atitinkamai galima sukurti RNR žymėjimo technologijas, išnaudojant RNR specifines metiltransferazes, baltymų žymėjimui – baltymų metiltransferazes ir t.t.



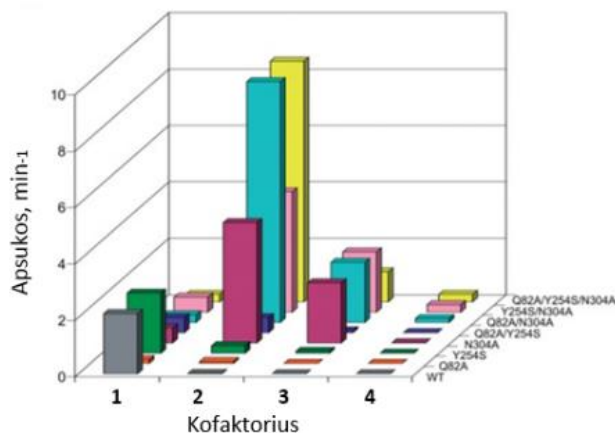
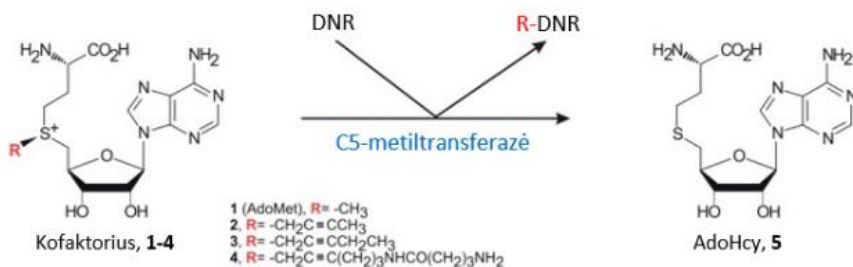
Pav. 1.8. Sintetinių AdoMet kofaktorių struktūros pavyzdys. Reaktyvi metilo grupė yra pakeičiama į ilgesnę šoninę grandinę, turinčią žymėjimui reikalingą funkcinę arba reporterinę grupę X (mTAG technologija buvo pritaikyta ir kitokios struktūros šoninių grandinių pernašai, žr. žemiau esantį tekstą) (iš Masevičius et al., 2016).

1.3.1 mTAG pritaikymas DNR žymėjimui

Pirmą kartą mTAG technologija buvo pritaikyta nuo sekos priklausomam DNR žymėjimui. Šių tyrimų metu parodyta, kad bakteriofago plazmidinė DNR gali būti pažymėta dviem žingsniais: iš pradžių pernešant ant jos amino grupę turinčią šoninę grandinę, o vėliau prie jos prijungiant fluoroforo žymę (Klimašauskas and Weinhold, 2007; Lukinavičius et al., 2012; Lukinavičius et al., 2007).

DNR molekulėse citozino metilinimas – tai viena dažniausių biologinių modifikacijų, kuri yra sutinkama nuo bakterijų iki žmogaus. Todėl eksperimentams buvo pasirinkta bakterinė M.HhaI metiltransferazė, atpažįstanti GCGC seką ir modifikuojanti pabraukto citozino penktąją (C5) poziciją (Lukinavičius et al., 2007). Deja, pirminiai tyrimai su laukinio tipo M.HhaI, ją pritaikant sintetiniams AdoMet analogams, neparodė gerų žymėjimo rezultatų: metiltransferazė pasižymėjo didžiausiu efektyvumu su natūraliu AdoMet kofaktoriumi, tačiau buvo praktiškai neaktyvi su AdoMet analogais. Kadangi sintetiniai AdoMet analogai turi didesnes šonines grandines, jos gali trukdyti kofatoriaus molekulei patekti į metiltransferazės kofatoriaus kišenę (Pav. 1.9, viršus). Todėl šalia laukinio tipo M.HhaI,

siekiant praplauti kofaktoriaus kišenę, šiame darbe buvo sukurtas variantas, 82-oje pozicijoje turintis glutaminą pakeistą į alaniną (Lukinavičius et al., 2007). Tokiu būdu buvo tikėtasi praplauti kofaktoriaus kišenę stambesniems AdoMet analogams. Toks metiltransferazės variantas nors ir pasižymėjo iki 4 kartų geresniu efektyvumu už laukinio tipo M.HhaI, pernešant šonines grandines nuo sintetinių kofaktorių, tačiau šios pernašos efektyvumas vis dar stipriai atsiliko nuo laukinio tipo M.HhaI su AdoMet reakcijos. Be to, buvo pastebėta, kad šio mutanto metilo grupių pernaša nuo AdoMet sumažėjo net 16 kartų (Lukinavičius et al., 2007).



Pav. 1.9. Sintetinių AdoMet kofaktorių pritaikymas pernašai M.HhaI ir jos variantų pagalba. A bendros alkilavimo reakcijos schema. B. AdoMet (1) ir jo sintetinių analogų (2, 3 ir 4) aktyvumas su HhaI laukinio tipo metiltransferaze (WT) ir jos variantais su nurodytomis pakeistomis aminorūgštimis (iš Lukinavičius et al., 2012).

Dėl to vėliau buvo sukurta visa eilė M.HhaI variantų, kurių kofaktoriaus kišenėje nuo vienos iki trijų funkcijai nesvarbių aminorūgščių buvo pakeistos aminorūgštėmis, turinčiomis trumpesnes šonines grandines (Lukinavicius et al., 2012). Kaip matome, metiltransferazės variantai, turintys praplatintą kofaktoriaus kišenę, su AdoMet analogais parodė ženkliai geresnius substrato modifikavimo rezultatus, o kai kurie iš jų (dvigubi ir trigubas mutantai) su kofaktoriais 2 ir 3 iki kelių kartų viršijo laukinės M.HhaI natūralios reakcijos su AdoMet apskukos greitį $2,1 \text{ min}^{-1}$ (Pav, 1.9, apačioje). Net ir didžiausią šoninę grandinę turintis kofaktorius parodė iki $0,13\text{--}0,25 \text{ min}^{-1}$ apskukos greitį, kas leidžia laboratorinėmis sąlygomis pasiekti pakankamą substrato pažymėjimo lygį mažiau nei per 15 minučių (Lukinavicius et al., 2012).

Galiausiai pavyko sukurti M.HhaI variantus, tinkančius DNR laboratoriniams žymėjimams GCGC sekose pagal mTAG technologiją. Analogišku būdu po dvi konservatyvias aminorūgštis buvo pakeista DNR metiltransferazėje M.HpaII, atpažįstančioje seką CCGG, ir M2.Eco3II, atpažįstančioje GGTCTC. Abiem atvejais kofaktoriaus kišenės praplatinimas sąlygojo alkilinimo pagerėjimą iki lygio, tinkamo laboratoriniam šių metiltransferazių variantų pritaikymui mTAG technologijai (Lukinavicius et al., 2012).

Tokiu būdu, mTAG technologija buvo sėkmingai pritaikyta DNR molekulių žymėjimui pagal jų seką (Dalhoff et al., 2006, 2006; Lukinavicius et al., 2012; Lukinavičius et al., 2007; Tomkuvienė et al., 2016)

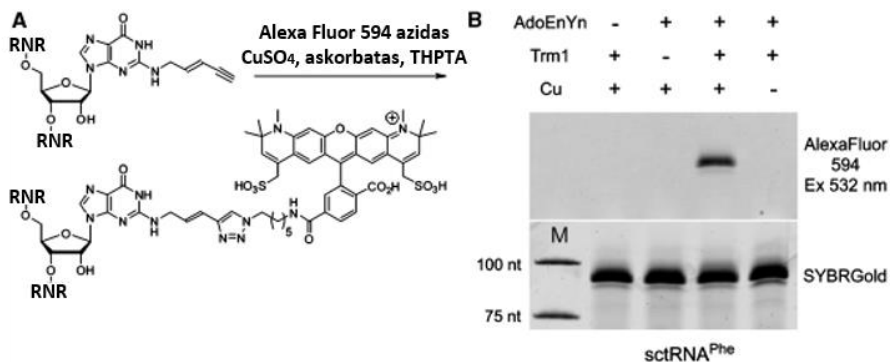
Neseniai mTAG paremta technologija buvo pritaikyta kuriant metodą epigenomo profiliavimui, nustatant nemodifikuotas genomo CG sekas. 5-meticitozinas, aptinkamas GC sekose, yra viena labiausiai paplitusių genomo modifikacijų. GC sekų metilinimas užblokuoja ir taip apsaugo nuo metiltransferazės SssI poveikio, tuo tarpu nemetilintos sekos gali būti modifikuotos šonine grandine nuo sintetinių AdoMet analogų. Kitame žingsnyje prie perneštų funkcinių grupių galima prijungti oligonukleotidą, nuo

kurio DNR polimerazės pagalba prasidės DNR sintezė, kuri bus išanalizuota sekoskaitos pagalba. Tokių būdu įmanoma nustatyti, kurios GC sekos genome yra užmodifikuotos, o kurios – ne (Staševskij et al., 2017).

1.3.2 mTAG pritaikymas RNR žymėjimui

Pirmą kartą RNR molekulių žymėjimui mTAG technologija buvo pritaikyta 2011 metais *Saccharomyces cerevisiae* tRNR^{Phe} transkripto modifikavimui (Motorin et al., 2011). Gamtoje Trm1 N2-metilina tRNR molekulių 26-oje pozicijoje esantį guanoziną. Reakcijų metu buvo tirtas AdoEnYn kofaktorius, kurio šoninė grandinė turėjo galinį alkiną ir buvo tinkama nuo vario priklausomam azido grupės prijungimui, taip vadinamu „click-cheminiu“ būdu (Pav. 1.10). Eksperimentų metu buvo parodyta, kad didesnės nei mikromoliarinės naudoto alkilavimo kofaktoriaus AdoEnYn koncentracijos slopina alkilavimo reakciją, tačiau ji vyksta, esant mažesnėms koncentracijoms. Modifikacijos buvimas įrodytas masių spektrometrinės analizės būdu. Buvo nustatyta teorinė alkilinto guanozino masės-krūvio santykio reikšmė, o tolimesnė glikozidinio ryšio fragmentacija nulėmė signalą, atitinkanti modifikuotos nukleobazės tikėtiną reikšmę. Taip pat kofaktoriu alkilintas tRNR^{Phe} substratas prijungė AlexaFluor 594 fluoroforą ir mėginys buvo stebimas denatūruojančiame poliakrilamidiniame (dPAGE) gelyje (Pav. 1.9) (Motorin et al., 2011).

Substrato modifikacija metiltransferaze Trm1 būtent 26-oje tRNR^{Phe} pozicijoje buvo įrodyta atvirkštinės transkriptazės sustabdymo modifikacijos pozicijoje metodu (modifikacija fiziškai trukdo judėti transkriptazei, dėl to ji sustoja): buvo nustatyta, kad fermentas sustoja, kaip ir tikėtasi, 26-27 tRNR pozicijoje (Motorin et al., 2011).

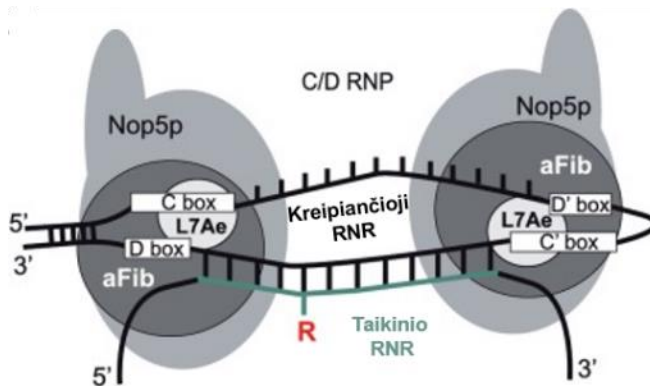


Pav. 1.10. tRNR žymėjimas fluoroforu per dvi stadijas. A. Reakcijos schema. Substratinė tRNR^{Phe} buvo alkilinta 26-oje G pozicijoje, naudojant AdoEnYn kofaktorių ir metiltransferazę Trm1. Antrame žingsnyje prie ant substrato perneštos šoninės grandinės buvo prijungtas AlexaFluor 594 azidas. B. dPAGE eksperimento rezultatai. Mėginiai buvo išanalizuoti AlexaFluor detekcijai, nudažyti SYBRGold interkalijuojančiu dažu ir detektuoti visi tRNR mėginiai (iš Motorin et al., 2011).

Papildomai prie Trm1 buvo ištirtos dar trys RNR metiltransferazės, modifikuojančios skirtingas nukleobazes įvairiuose tRNR pozicijose: *S. cerevisiae* tRNR:m⁵C_{34,40,48,49}- metiltransferazė Trm4, *P. abyssi* tRNR:m¹A₅₈-metiltransferazė TrmI ir *P. abyssi* tRNR:m²G₁₀- metiltransferazė Trm11. Pasirodo, kad būtent Trm1 pažymėtas substratas nulėmė stipriausią AlexaFluor 594 fluorescenciją, tačiau Trm11 alkilinto substrato signalas taip pat buvo pakankamai ryškus, kad ir minėta metiltransferazė galėtų būti pritaikyta laboratorinei praktikai. Trm4 ir TrmI nesąlygojo fluorescuojančio signalo, nors visų keturių metiltransferazių taikiniai yra panašiai paslėpti tRNR paviršiuje. Įdomu, kad Trm1 ir Trm11, kurie davė signalą, abu modifikuoja guanozino egzociklinę amino grupę antroje pozicijoje, iš ko buvo prieita prie išvados, kad būtent taikinio nukleofilo cheminė prigimtis, o ne taikinio erdvinis eksponavimas yra limituojantis modifikavimo veiksnys. Šis tyrimas tapo pirmuoju sait-specifinės tRNR molekulių žymėjimo, taikant mTAG metodą, praktiniu įrodymu (Motorin et al., 2011).

Metais vėliau pasirodė dar vienas tyrimas apie mTAG metodo RNR žymėjimui, tačiau šiuo atveju pirmą kartą buvo parodytas sekai-specifinis

tRNR ir pre-iRNR molekulių žymėjimas vieno nukleotido tikslumu, naudojant sintetiškai programuojamą link taikinio nukreipiantį oligonukleotidą (Tomkuvienė et al., 2012). Grupės nuo kofaktoriaus pernašai šiame darbe naudojamas dėžutės C/D ribonukleininis (C/D RNP) kompleksas, kuris gamtoje 2'-O-metilina tRNR, rRNR ir splaisosomines (sukirpimo) RNR. Šio RNP minimalų struktūrinį vienetą sudaro archėjų C/D RNR (kreipiančioji RNR) ir po 2 vienetus L7Ae, Nop5p ir aFib baltymų (Pav. 1.11).



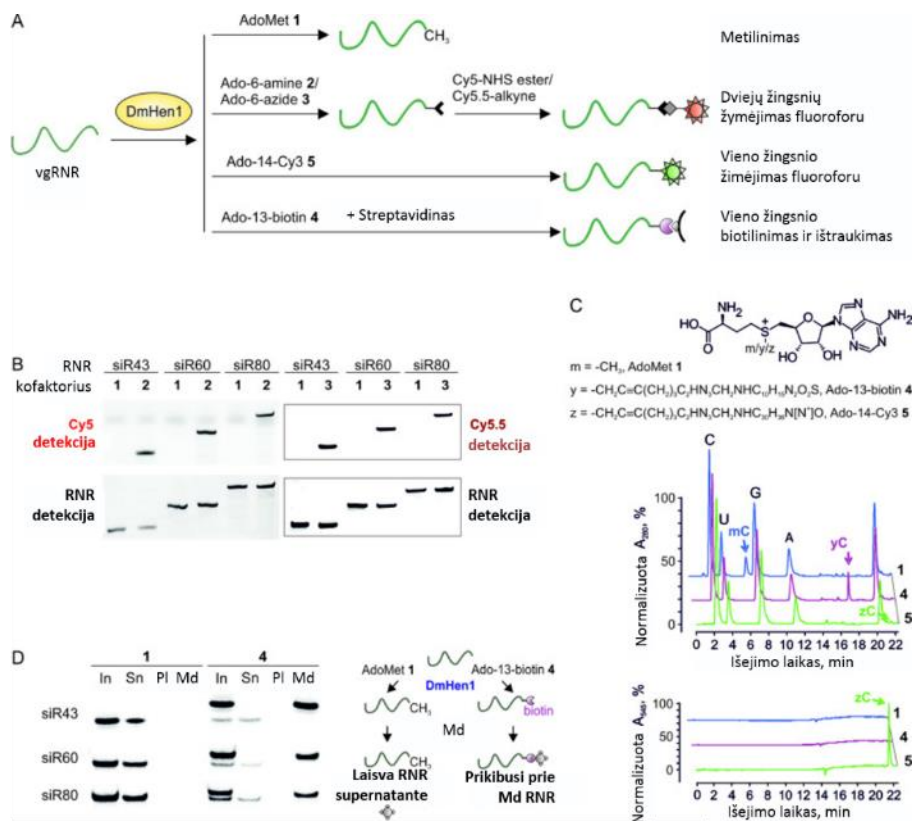
Pav. 1.11. Sekai specifinė taikinio RNR modifikacija, naujodant archėjų C/D ribonukleoproteininį (RNP) kompleksą. C/D RNP komplekso schematinė struktūra kartu su substratine RNR. Šerdies baltymai L7Ae, Nop5p ir aFib rišasi su kreipiančiuoju RNR C/D ir C'/D' saituose. Modifikacija įvyksta penktoje pozicijoje į dešinę nuo D dėžutės (iš Tomkuvienė et al., 2012).

Archėjų C/D RNR paprastai yra 50-70 nt ilgio ir turi tipines C (RUGAUGA) ir D (CUGA) dėžučių sekas, 3' ir 5' galuose bei RNR vidinėje dalyje, kurie rišasi su C/D ir C'/D' elementais. Taikinio RNR sąveikauja su C/D RNP pagal komplementarumo principą ir yra modifikuojama 5-oje pozicijoje į dešinę nuo D dėžutės (Appel and Maxwell, 2007). Kadangi reakcijos specifiškumą užtikrina C/D RNP, yra įmanoma susintetinti bet kokios sekos oligonukleotidą norimos taikinio RNR modifikacijai (Tomkuvienė et al., 2012)

C/D RNR gali modifikuoti net ir žymiai didesnius už jam natūraliai būdingus RNR taikinius. Tyrimo metu 357 nt ilgio triušio beta-globino pre-iRNR fragmente esantys 4 taikiniai, kurie visi buvo pažymėti fluoroforais. Vėliau buvo parodyta, kad *Pyrococcus abyssi* aFib-Nop5 heterodimeras gali atskirai atlikti nuo AdoMet-priklausomą 16S ir 23S rRNR 2'-O-metilinimą *in vitro* ir nepriklausomai nuo L7Ae ir C/D kreipiančiosios RNR. Tokiu būdu, buvo parodyta, kad C/D RNP ar net jo dalis gali žymėti, iš esmės, bet kurias RNR molekules, atpažįstant jas pagal įdėtos kreipiančiosios RNR seką (Tomkuvienė et al., 2017).

Visai neseniai, jau šios disertacijos rašymo metu, mTAG metodas buvo pritaikytas kitos mažųjų RNR grupės, viengrandinių piRNR, o taip pat ir kitų tipų 22-80 nt viengrandinių RNR 2'-O-žymėjimui, naudojant šiame darbe tirtam augalų HEN1 homologines metiltransferazes *Drosophila melanogaster* DmHen1 ir žmogaus HsHen1 (Pav. 1.12, A) (Mickutė et al., 2018).

Įdomu pastebėti, kad publikacija išėjo šios disertacijos rašymo metu ir nemaža dalis straipsnio tyrimų jau rėmėsi šios disertacijos autoriaus atidirbtais ir čia aprašomais metodais, adaptuojant homologinę metiltransferazę ilgų viengrandinių, o ne dvigrandinių miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* žymėjimui. Tačiau buvo sukurtos ir naujos technologijos, dar neegzistavusios šios disertacijos tyrimų publikavimo moksliniuose straipsniuose metu. Mickutė ir kiti sukūrė vieno žingsnio žymėjimo fluoroforu nuo Ado-14-Cy3 kofaktoriaus technologiją bei vieno žingsnio žymėjimui biotinu pritaikė kitokią cheminę struktūrą turintį Ado-13-biotin kofaktorių nei tas, kurio tyrimai aprašyti šioje disertacijoje (Pav. 1.12, B, C ir D).



Pav. 1.12. DmHen1 pritaikymas mTAG technologijai. A. Dviejų ir vieno žingsnio viengrandinių RNR (vgRNR) žymėjimo schema. B. Dviejų žingsnių žymėjimas Cy5 arba Cy5.5 fluoroforu. C. Ado-13-biotin ir Ado-14-Cy3 kofaktorių šoninių grandinių formulės (viršuje) ir miR173 žymėjimo jais nukleozidų HPLC chromatografinė analizė (apačioje). D. vgRNR ištraukimas magnetinėmis dalelėmis po vieno žingsnio biotilinimo. In – Pradinis mėginys, Md – magnetinių dalelių frakcija, PI – plovimas, Sn – supernatantas, nusiurbtas nuo Md (iš Mickutė et al., 2018).

Lyginant su augalų HEN1, kurios didžiausias aktyvumas stebimas su Mg^{2+} arba Mn^{2+} , abi gyvūnų metiltransferazės, DmHen1 ir HsHen1, parodė didžiausią aktyvumą *in vitro* su kobalto katijonais. Tai yra neįtikėtinas atradimas, kadangi natūralios šio jono koncentracijos ląstelėse yra nykstantčiai mažos, tačiau kobaltas gali būti naudojamas *in vitro* vgRNR žymėjimo metu, taip pagerinant metiltransferazės efektyvumą.

Galiausiai autoriai sukūrė DmHen1 mutantinį variantą, turintį pašalintą mažą C-dalinio domeno fragmentą, ko rezultate metiltransferazės efektyvumas pernešti šonines grandines nuo sintetinių AdoMet analogų išaugo bei išnyko natūrali DmHen1 būdinga reakcijos efektyvumo priklausomybė nuo modifikuojamos vgRNR 3'-galinio nukleotido cheminės prigimties (Mickutė et al., 2018).

1.3.3 mTAG pritaikymas kitų biomolekulių žymėjimui ir šio darbo reikšmė

2011 metais pasirodė publikacijos, kuriose buvo pademonstruota mTAG metodo pritaikymo galimybė pažymėti baltymus. Baltymų lizino metiltransferazė SETDB1, pagrindinai modifikuojanti histoninius baltymus ir reguliuojanti chromatiną kondensaciją, buvo pritaikyta pernešti alkino grupę turinčią šoninę grandinę ant rekombinantinio histono H3 baltymo lizino (Binda et al., 2011). Tais pačiais metais pasirodė straipsnis, kuriame sintetiniai kofaktoriai, turintys skirtingo ilgio „click-cheminei“ reakcijai tinkamas šonines grandines, buvo pritaikyti mTAG technologijai naudojant žmogaus baltymų arginino metiltransferazę 1 (PRMT1) (Wang et al., 2011). Metais vėliau paaiškėjo, jog 4-azido-but-2-enyl ir S-adenozil-L-metionino junginys (Ab-SAM) yra tinkamas kofaktorių metiltransferazinėmis sąvybėmis pasižymintiems baltymų kompleksams, turintiems EuHMT1 ir EuHMT2 baltymus. Šiame darbe baltymo metiltransferazės buvo ekspresuotos *in vivo*, ir taikant mTAG technologiją, pavyko nustatyti daugybę šių baltymų substratų, tame tarpe ir nehistoninių baltymų (Islam et al., 2012)

Apibendrinant, nuo savo sukūrimo prieš maždaug 10 metų minėta technologija buvo sėkmingai pritaikyta sekai-specifiniam kovalentiniam DNR ir RNR žymėjimui, taip pat metilinimo vietų tRNR molekulėse, histoninių ir nehistoninių baltymų kovalentinei modifikacijai ir net genomo profiliavimui. Vis dėlto nė viena iš šios technologijos atšakų neleidžia specifiskai pažymėti

žinduolių mažasias RNR, tokias kaip miRNR ir siRNR, o žymėjimas nukleorūgščių galuose kol kas dar, apskritai, nebuvo tirtas. Dėl miRNR ir siRNR didelės biologinės reikšmės mTAG technologijos pritaikymas specifiniam šių molekulių žymėjimui galėtų ženkliai paspartinti jų tyrimus bei prisidėti prie daugelio pagrindinių žmonijos ligų diagnostikos ar gydymo. Šiame darbe buvo tiriamas mažosioms dvigrandinėms RNR (miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR*) specifinės 2'-O-metiltransferazės HEN1 tinkamumas pritaikyti mTAG technologiją miRNR ir siRNR žymėjimui. Tai dar labiau praplėstų mTAG technologijos panaudojimo ribas. Be to, tai būtų pirmas kartas, kuomet minėtas metodas buvo panaudotas prieš atskirą RNR klasę – miRNR ir siRNR molekules, nepriklausomai nuo jų sekos.

Šio darbo tyrimai prasidėjo nuo detalaus HEN1 metiltransferazės miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* metilinimo mechanizmo išsiaiškinimo (Plotnikova et al., 2013). Vėliau metiltransferazė buvo pritaikyta mTAG technologijai su jai natūraliais miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* substratais, kas leido sukurti šių molekulių vizualizavimo fluoroforais ir gryninimo biotinu-magnetinėmis dalelėmis metodus (Plotnikova et al., 2014). Galiausiai HEN1 buvo adaptuota netipiniams miRNR/DNR ir siRNR/DNR heterodupleksams žymėti, kas dar labiau praplėtė minėto metodo panaudojimo ribas (Osipenko et al., 2017).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Cheminiai reagentai

Akrilamido-bisakrilamido tirpalai Rotiphorese gel 30 % (37,5:1) ir Rotiphorese gel 40 % (19:1), chloroformas, etidžio bromidas, Kumasi briliantinis mėlis R250, PMSF, Lipofilinis kokteilis Rotiszint Eco (Roth).

EDTA, NaCl, NDS, urėja (Amresco).

Etanolis 96,3 % (Vilniaus degtinė).

Glikogenas RNA-grade, ditioneitolis (DTT) (Thermo Fisher).

Na₂B₄O₇, MgCl₂ (Fluka).

NaIO₄, TEMED, HEPES, APS, metanolis, HCl, NaOH, H₃BO₃, glicerolis, Tris, NaOAc, ampicilinas, chloramfenikolis, DMSO, CuBr, TBTA (Sigma-Aldrich).

2.1.2 Buferiniai tirpalai

Amonio formiato buferis (20 mM NH₄HCO₂, pridedama HCOOH iki pH 3,5)

Boratinis buferis A (4,38 mM Na₂B₄O₇, 50 mM H₃BO₃, pH 8,6).

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

Degradacijos buferis (10 mM NaAc, 1 mM ZnAc, pH 6,5).

Click-chemijos buferis (0,2 M trietilamonio acetato, 2 mM askorbo rūgšties, 50 % dimetil sulfoksido, 0,5 mM Tris(benziltriazolilmetil)-amino, 0,25 mM CuSO₄, pH 7,0).

Fosfatinis buferis (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,0).

Reakcijos buferis (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,25 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml JSA, 0,2 u/μl Thermo Fisher Ribolock RNazių inhibitoriaus).

Stabdymo buferis (20 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1,5 % NDS, pH 7,5).

Sulydymo buferis (60 mM KCl, 0,2 mM MgCl₂, 6 mM HEPES, pH 7,5).

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

TE buferis (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5).

2.1.3 Nukleotidai ir nukleorūgštys

ATP, Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher)

Visi viengrandiniai RNR, DNR ir kovalentiškai modifikuoti oligonukleotidai, įskaitant LNA (uždaras nukleorūgštis) bei funkcinėmis grupėmis arba fluoroforais modifikuotus, buvo chemiškai susintetinti Metabion, IDT, IBA arba Exiqon.

Pavadinimas

Seka

RNR

miR173	5'-UUCGCUUGCAGAGAGAAAUCAC-3'
miR173*	5'-GAUUCUCUGUGUAAGCGAAAG-3'
miR-26a	5'-UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU-3'
miR-26a*	5'-CCUAUUCUUGGUUACUUGCACG-3'
miR-210	5'-CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA-3'
miR-210*	5'-AGCCCCUGCCCACCGCACACUG-3
let-7a	5'-UGAGGUAGUAGGUUGUUAUAGUU-3'
let-7a*	5'-CUAUACAAUCUACUGUCUUUCC-3'
miR173-U	5'-UUCGCUUGCAGAGAGAAAUCAU-3'
miR173-G	5'-UUCGCUUGCAGAGAGAAAUCAG-3'
miR173-A	5'-UUCGCUUGCAGAGAGAAAUCA-3'
RNA173*-R0/R0	5'-GUGAUUUCUCUCUGCAAGCGAA-3'
siR173	5'-UUAACGCUUGCAGAGAGAAUCAC-3'
siR173*	5'- GAUUCUCUCUGCAAGCGUAAAG-3'

RNR-LNA

RLNA210-R2:D0-CH ₃	5'-AGCCGCUGUCACACGCACAG ^{CH₃} -3'
-------------------------------	---

DNR-LNA

DLNA7a*-R1:D-1-NH ₂	5'-GAAAGACAGTAGATTGTATA ^{NH₂} -3'
--------------------------------	---

DNR su fluoroforais

DNA7a-R2:D2-Cy5	5'-CTATACAACCTACTACCTCACC ^{Cy5} -3'
DNA173-R2:D2-FAM	5'-GATTCTCTCTGCAAGCGAAAG ^{FAM} -3'
DNA173-R2:D0-Cy3	5'-GATT ^{Cy3} TCTCTCTGCAAGCGAA-3'

! Tiesiuoju šriftu pažymėti ribonukleotidai;
 ! pasvyruoju šriftu – deoksiribonukleotidai;
 ! **storuoju šriftu** paryškinti LNA nukleotidai;
 ! G^{CH₃} – 2'-O-metilgvanozinas;
 ! A^{NH₂} – C6-amino-deoksiadenozinas;
 ! C^{Cy5}, G^{FAM} ir T^{Cy3} – fluoroforais žymėti nukleotidai.

DNR

DNA7a-R0:D0	5'-AACTATACAACCTACTACCTCA-3'
DNA7a-R2:D5	5'-CTATACAACCTACTACCTCACCAGC-3'
DNA7a*-R0:D0	5'-GGAAAGACAGTAGATTGTATAG-3'
DNA26a-R0:D0	5'-AGCCTATCCTGGATTACTTGAA-3'
DNA26a-R2:D0	5'-CCTATCCTGGATTACTTGAA-3'
DNA26a-R2:D1	5'-CCTATCCTGGATTACTTGAA-3'
DNA26a-R2:D2	5'-CCTATCCTGGATTACTTGAA-3'
DNA26a-R2:D3	5'-CCTATCCTGGATTACTTGAA-3'
DNA26a-R2:D5	5'-CCTATCCTGGATTACTTGAA-3'
DNA26a*-R2:D2	5'-TGCAAGTAACCAAGAATAGGCT-3'
DNA173-R0:D0	5'-GTGATTTCTCTCTGCAAGCGAA-3'
DNA173-R2:D0	5'-GATTTCTCTCTGCAAGCGAA-3'
DNA173-R2:D1	5'-GATTTCTCTCTGCAAGCGAAA-3'
DNA173-R2:D2	5'-GATTTCTCTCTGCAAGCGAAA-3'
DNA173-R2:D5	5'-GATTTCTCTCTGCAAGCGAAAGGAG-3'
DNA173-R2:D7	5'-GATTTCTCTCTGCAAGCGAAAGGATAG-3'
DNA173*-R2:D2	5'-TTCGCTTACACAGAGAATCAC-3'
DNA173s-R2:D2	5'-GATTCTCTCTGCAAGCGTTAAAG-3'
DNA173s*-R2:D2	5'-TTAACGCTTGACAGAGAATCAC-3'
DNA210-R2:D2	5'-AGCCGCTGTCACACGCACAGTG-3'
DNA210-R0:D0	5'-TCAGCCGCTGTCACACGCACAG-3'
DNA210*-R2:D2	5'-GTGTGCGGTGGCAGGGGCTGA-3'

DNR, turinti SA dali

SA173-R0:s0	5'- <u>GTGATTTCTCTCTGCAAGCGAAATTGACCGCTG</u> TGTGACGCAAACTCAAT-3'
SA173-R2:s0	5'- <u>GATTTCTCTCTGCAAGCGAAATTGACCGCTGTG</u> TGACGCAAACTCAAT-3'
SA173-R0:s4	5'- <u>GTGATTTCTCTCTGCAAGCGAACCTAATTGACC</u> GCTGTGTGACGCAAACTCAAT-3'
SA173-R2:s4	5'- <u>GATTTCTCTCTGCAAGCGAACCTAATTGACCGC</u> TGTGTGACGCAAACTCAAT-3'
SA210-R0:s0	5'- <u>TCAGCCGCTGTCACACGCACAGATTGACCGCTG</u> TGTGACGCAAACTCAAT-3'
SA210-R2:s0	5'- <u>AGCCGCTGTCACACGCACAGATTGACCGCTGTG</u> TGACGCAAACTCAAT-3'
SA210-R0:s4	5'- <u>TCAGCCGCTGTCACACGCACAGCCTAATTGACC</u> GCTGTGTGACGCAAACTCAAT-3'
SA210-R2:s4	5'- <u>AGCCGCTGTCACACGCACAGCCTAATTGACCGC</u> TGTGTGACGCAAACTCAAT-3'

! Pabrauktu šriftu pažymėta miRNR komplementari dalis

2.1.4 AdoMet ir jo sintetiniai analogai

AdoMet (Sigma-Aldrich, papildomai atvalytas nuo AdoHcy).

Ado-6-amine, Ado-11-amine, Ado-6-ethyne, Ado-6-azide, Ado-13-biotin, Ado-18-biotin buvo susintetinti dr. Gražvydo Lukinavičiaus ir dr. Viktoro Masevičiaus bei Mildos Nainytės.

2.1.5 Radioaktyvios ir reporterinės žymės, dažai

γ -³²P-ATP (6000Ci/mmol); γ -³³P-ATP (3000Ci/mmol); ³H-metil-AdoMet (10 Ci/mmol; 55 μ M) (PerkinElmer);

Biotino N-hidroksisukcinimido esteris (Mr = 341,38, Sigma-Aldrich);

Sukcinimidil-2-(biotinamido)etil-1,3-ditiopropionatas (Mr = 504,65, Thermo Fisher);

Cy5-N- hidroksisukcinimido esteris (GE Healthcare);

Eterneono-480/635-azidas (BaseClick);

RNA Loading Dye 2x (Thermo Fisher);

Etidžio bromidas (Roth).

2.1.6 Fermentai ir kiti baltymų preparatai

HEN1 preparatas išgrynintas iš *E. coli* BL21-DE3-RIL bakterijų VU GMC DNR modifikacijos tyrimo skyriuje.

T4 PNK, Proteinazė K, FastAP, Ribolock RNazių inhibitorius, Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher);

Jaučio serumo albuminas (BSA, 2 mg/ml - Pierce);

Nukleazė P1 (Sigma-Aldrich).

2.1.7 Molekulinės biologijos ir genų inžinerijos rinkiniai, reagentai

TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Fisher);

Trizol Reagent (Invitrogen).

2.1.8 Mikroorganizmai ir ląstelių linijos

Žmogaus osteosarkomos ląstelių linija U2OS;

E. coli ER1727;

E. coli BL21-DE3-RIL.

2.2 Prietaisai ir priemonės

Automatinės elektroninės pipetės „Eppendorf Research Pro 200, 1000“;
Automatinės pipetės „Gilson Pipetman P2G – P5000G“;
Automatinių pipečių antgaliai „Eppendorf DNase/RNase Free“;
Blokinis termostatas „Thermolyne 17600“;
Blokinis termostatas-purtyklė „Eppendorf Thermomixer Comfort“;
Chromatografinė kolonėlė „Supelco Discovery SH C18“;
DNR/RNR boksas „Biosan UVC/T-M-AR“;
Elektroforezės aparato elektros šaltinis „BioRad Power Supply“;
Fluorescencijos tirpale matuoklis „Jobin Yvon Horiba FluoroMax-3“;
Gelių džiovinimo aparatas „Fisher Scientific Gel Dryer FBGD45“;
Gelių vaizdų skeneris “Fujifilm FLA-5100 Image Reader”;
Greitų cheminių reakcijų stabdymo aparatas „KinTek RQF-3“;
Kolonėlės grynimui (ZymoResearch Clean and Concentrator G-25);
Magnetinė maišyklė „Biosan Microspin“;
Magnetinės dalelės „Invitrogen Dynabeads M-270 Streptavidin“;
Magnetinės dalelės „Thermo Fisher Dynabeads MyOne Streptavidin T1“;
Magnetinių dalelių stovas „Invitrogen DynaMag-2“;
Maišyklė-vartyklė „Biosan RS 24“;
Masių spektrometras „Agilent Technologies Q-TOF 6520“;
Mėgintuvėliai reakcijoms, 0,6; 1,5 ir 2 ml „Eppendorf Tubes RNA/DNA“;
Mėgintuvėliai tirpalams, 50 ml „Falcon Centrifuge Tube“;
Nitroceliuliuozės filtrai „Whatmann Schleicher and Sheuell 3mm Chr“;
Scinciliacijos matuoklis „Beckman LS1801“;
Skysčių chromatografas „Agilent Technologies 1290 Infinity HPLC“;
Stalinė centrifuga „Centrifuge 5417C“;
Stalinė minicentrifuga-vorteksas „Microspin FV-2400“;
Svarstyklės “Kern EW 2200-2NM“;
Svarstyklės analitinės “A&D GR-202-EC”;
Termocikleris „SensoQuest Labcycler 48 gradient“;
Vakuuminis siurblys „Vacuubrand MZ 2C NT +2AK“;
Vandens filtravimo sistema „Millipore Milli-Q Synergy 185“;
Vandens termostatas „Grant Instruments Y14“;
Vertikalios elektroforezės aparatas baltymams „BioRad MiniProtean“;
Vertikalios elektroforezės aparatas nukleorūgštims „Sequi-gen GT“.

2.3 Kompiuterinės programos

Cheminių formulių apskaičiavimo/vaizdavimo programa „ISIS Draw“;
Chromatografo - masių spektrometro programa „Agilent Technologies MassHunter Workstation“;

Elektroforegramų analizės programa „Fujifilm MultiGauge 3.0“;

Gelių vaizdų nuskaitymo programa „Fujifilm Image reader FLA-5000“;

Skaičiavimo ir grafikų braižymo programa „GraFit 5.0.6“;

Skaičiavimo ir grafikų braižymo programa „Microsoft Office Excel 2003“;

Vektorinių schemų braižymo programa „Corel Draw 2017“.

2.4 Darbo metodai

2.4.1 Oligonukleotidų ir nukleorūgščių paruošimas

Visi viengrandiniai RNR, DNR ir kovalentiškai modifikuoti oligonukleotidai, įskaitant LNA (uždaras nukleorūgštis) bei funkcinėmis grupėmis arba fluoroforais modifikuotus, buvo chemiškai susintetinti Metabion, IDT, IBA arba Exiqon. Dvigrandiniai substratai buvo gauti atitinkamų komplementarių viengrandinių oligonukleotidų sulydymo būdu, iš pradžių denatūruojant mėginį 3 min. 85°C temperatūroje Sulydymo buferyje (60 mM KCl, 0,2 mM MgCl₂, 6 mM HEPES, pH 7,5) ir paskui mažinant temperatūrą -0,6°/min greičiu iki 4°C. Totalinė RNR iš U2OS ląstelių linijos ir *E. coli* ER1727 kamieno buvo gryninama, naudojant TRIzol (Invitrogen) reagentą pagal gamintojo rekomendacijas. C/D dėžutės mažoji RNR sR47-A31 ir premiR173 susintetintos *in vitro* transkripcijos būdu, naudojant TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Fisher) rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas.

2.4.2 Denatūruojančio poliakrilamidinio gelio elektroforezė (dPAGE)

Alkilinimo reakcijos atliktos, naudojant 0,1 μM atitinkamo sintetinio dvigrandinio substrato su 5'-³³P-žymėta tiriamąja grandine, 0,25 μM HEN1 ir 100 μM natūralaus AdoMet arba sintetino šio kofaktoriaus analogo (Ado-6-

amine, Ado-11-amine, Ado-6-azide, Ado-6-ethyne, Ado-13-biotin arba Ado-18-biotin) arba be kofaktoriaus (kontrolėi) Reakcijos buferyje (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,25 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml jaučio serumo albumino – JSA, 0,2 u/μl Thermo Fisher Ribolock RNazių inhibitoriaus) 1 val. 37°C temperatūroje vandens vonelėje. Reakcijos sustabdytos rankiniu būdu, pridėdant Proteinazę K (Thermo Fisher) iki galutinės 1 mg/ml koncentracijos Stabdymo buferyje (20 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1,5 % Natrio dodecilsulfato – NDS, pH 7.5). Mėginiai, kurie buvo modifikuojami, naudojant AdoMet arba Ado-6-azide kofaktorius ir jų kontrolės be kofaktoriaus buvo papildomai paveikti 20 μM natrio perjodato Boratiniame buferyje A (pH 8,6) tamsoje 10 min. kambario temperatūroje (KT), po to sumaišyti su 1/5 tūrio 67 % glicerolio ir inkubuoti dar 5 min, mišinys išsodintas etanolyje, ištirpintas Boratiniame buferyje B (pH 9,5) ir inkubuota 45 min. 45°C temperatūroje. Visais kofaktoriais modifikuoti mėginiai ir jų kontrolės buvo denatūruoti sumaišant su 2X RNA Loading Dye (Thermo Fisher) dažų ir inkubuojant 5 min 85°C temperatūroje bei išfrakcionuoti 12 % 7 M urėjos turinčio denatūruojančio poliakrilamidinio gelio elektroforezės (dPAGE) būdu. Vakuuminiame gelių džioviklyje 65°C 90 min. išdžiovinti geliai eksponuoti per naktį prieš fosfoliūmeniscentines ploktes, kurias skenuojamos Fujifilm FLA-5100 Image Reader skeneriu, naudojant 635 nm lazerį ir IP filtrą, gauti vaizdai išanalizuoti su MultiGauge (Fujifilm) programa.

2.4.3 Modifikacijų reakcijų kinetinė analizė

Substrato modifikacijos reakcijos atliekamos vienos apskukos sąlygomis, naudojant 0,25 μM HEN1, 0,1 μM RNR/RNR arba RNR/DNR duplekso su 5'-³³P-žymėta tiriamąja grandine ir 20-4000 μM AdoMet arba jo sintetinio analogo Reakcijos buferyje 37°C temperatūroje. Praėjus nustatytam reakcijos laikui reakcijos stabdytos Proteinaze K (Thermo Fisher) Stabdymo buferyje,

sumaišant rankiniu būdu (reakcijoms nuo 30 sek. iki 90 min.) arba naudojant greitų cheminių reakcijų stabdymo prietaisą Rapid Quench-Flow RQF-3 (reakcijoms, kurių trukmė nuo 0,01 sek. – 3 min.). Toliau mėginiai, modifikuoti AdoMet buvo veikti 20 μM natrio perjodato arba iš karto analizuojami denatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje (mėginiai, modifikuoti sintetiniais AdoMet analogais) kaip aprašyta dPAGE analizės skyrelyje. Kiekvienas reakcijos laiko taškas buvo pakartotas nuo 3 iki 5 kartų. Modifikacijos reakcijos kinetiniai parametrai buvo apskaičiuoti taikant vienos arba dviejų eksponenčių lygtis GraFit programoje.

2.4.4 Tričio inkorporacijos analizė

1 μM dvigrandinio substrato inkubuota su 0,25 μM HEN1 and 20 μM [methyl- ^3H] AdoMet Reakcijos buferyje 37°C temperatūroje 30 min. Po nustatyto laiko reakcijos sustabdomos Proteinaze K ir Stabdymo buferiu. Gauti mišiniai užnešami ant 2.3 cm DE-81 filtrinių popierių (Whatman), kelis kartus praskalaujami Fosfatiniame buferyje (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,0), toliau – du kartus vandenyje, dukart 70 % etanolyje, vieną kartą acetone ir išdžiovinami infraraudonųjų spindulių lempa. ^3H -žymėtos metilo grupės pernaša ant substratų matuojama 3 ml lipofilinio kokteilio Rotiszint Eco (Carl Roth), naudojant Beckman LS1801 scinciliacijos matuoklį. Fono reikšmės (400-600 dpm – desintegracijų per minutę) buvo atimtos iš apskaičiuotų rezultatų. Kiekvienam mėginiui atlikti 2-3 pakartojimai.

2.4.5 Skysčio chromatografinė-masių spektrometrinė (HPLC-MS) analizė

1 μM sintetinės miR173, miR-210 arba miR-210*, kuri buvo suldyta su komplementaria RNR arba DNR grandine, inkubuota su 1 μM HEN1 be kofaktoriaus (kontrolė) arba su 100 μM AdoMet arba jo analogų Reakcijos buferyje 90 min. 37°C temperatūroje. Reakcijos mišiniai išgryninti nuo baltymų gerai sumaišant su lygiu turio chloroformo, nucentrifuguojant 1

min. 20000 rcf KT ir nusiurbiant viršutinę vandeninę frakciją su automatine pipete. Toliau mėginiai išsodinti sumaišant su 1/10 tūrio 20 mg/ml glikogeno (Thermo Fisher) ir 3 M natrio acetato (pH 5,2) mišinio ir 3 tūriais 96 % etanolio, atšaldant 30 sek. skystame azote arba -20°C per naktį ir centrifuguojant 20000 rcf 4°C 20 min. Mėginiai sudegraduoti 0,01 u/μl P1 nukleazės (Sigma-Aldrich) ir defosforilinti 0,02 u/μl FastAP šarminės forfatazės (*Thermo Fisher*) Degradacijos buferyje (10 mM NaAc, 1 mM ZnAc, pH 6,5) per naktį 37°C temperatūroje. Mišiniai inkubuoti 15 min. 70°C ir priemaišos nucentrifuguotos 20000 rcf 4°C temperatūroje 30 min. Supernatantas išanalizuotas, naudojant 1290 Infinity HPLC sistemą (Agilent Technologies) su Discovery SH C18 (Supelco) kolonėle 20 mM Amonio formato buferyje (pH 3,5) su metanolio gradientu iki 80 %. Elektro-įpurškimo jonizacijos masių spektrometrinė (ESI-MS) analizė atlikta, naudojant Q-TOF 6520 masių spektrometrą (Agilent Technologies) teigiamos jonizacijos sąlygomis su MassHunter Workstation programine įranga.

2.4.6 Vieno žingsnio žymėjimas biotinu

0,2 μM atitinkamo dvigrandinio substrato inkubuojama su 0,5 μM HEN1 ir 200 μM Ado-13-biotin, Ado-18-biotin arba AdoMet (kontrolėi) 1 val. 37°C temperatūroje. Reakcijos stabdomos Stabdymo buferiu su Proteinaze K, mėginiai išsodinami su etanoliumi ir ištirpinami vandenyje iki 2 μM substrato koncentracijos. Toliau mėginiai inkubuojami su streptavidinu padengtomis magnetinėmis dalelėmis Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Thermo Fisher) arba su Dynabeads M-270 Streptavidin (Invitrogen) pagal gamintojo rekomendacijas. Biotilintos miRNR nuėmimui nuo magnetinių dalelių mėginiai inkubuojami 47,5 % formamide, 10 mM EDTA 85°C temperatūroje 5 minutes ir išanalizuojami dPAGE metodu, kaip aprašyta aukščiau.

2.4.7 Dviejų žingsnių žymėjimas biotinu

0,2 μM atitinkamo dvigrandinio substrato inkubuojama su 0,5 μM HEN1 ir 200 μM Ado-6-amine, Ado-11-amine arba AdoMet (kontrolėi) 1 val. 37°C temperatūroje. Modifikuota miRNR išsodinama etanolyje ir tirpinama Borato buferyje B (pH 9,5) iki 0,4 μM dvigrandinio substrato koncentracijos ir inkubuojama su 20 mg/ml biotino N-hidroksisukcinimido esterio (NHS-biotin Mr = 341,38, Sigma-Aldrich) arba nuimamą biotino grupę turinčiu sukcinimidil-2-(biotinamido)etil-1,3-ditiopropionatu (NHS-SS-biotin, Mr = 504,65, Thermo Fisher) 150 min. KT. Mėginiai inkubuojami su magnetinėmis dalelėmis Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Thermo Fisher) arba Dynabeads M-270 Streptavidin (Invitrogen) pagal gamintojo rekomendacijas. NHS-biotinu modifikuoti mėginiai inkubuojami 47.5 % formamide su 10 mM EDTA 5 min. 85°C temperatūroje. NHS-SS-biotinu modifikuota miRNR nuimama nuo magnetinių dalelių, inkubuojant su 20 % β -merkaptoetanolio (BME) arba 10 mM ditiotreitolio (DTT) 30 min. KT sąlygomis. Mėginiai analizuojami dPAGE kaip aprašyta aukščiau.

2.4.8 Dviejų žingsnių žymėjimas fluoroforu

2 μM atitinkamo dvigrandinio substrato inkubuojama su 1 μM HEN1 ir 200 μM Ado-6-amine (Cy5 fluoroforo prijungimui), Ado-6-ethyne (Eterneono fluoroforo prijungimui) arba AdoMet (kontrolėi) Reakcijos buferyje 1 val. 37°C temperatūroje. Mėginiai, kurie buvo žymėti Ado-6-amine kofaktoriumi, išsodinami etanolyje, tirpinami Boratiniame buferyje B (pH 9,5) iki galutinės 2,5 μM koncentracijos ir inkubuojami su 0,1 mg/ml Cy5 NHS-esteriu (GE Healthcare) 4 val. KT. Mėginiai, žymėti Ado-6-ethyne kofaktoriumi, inkubuojami su 0,25 mM Eterneon-480/635 azido (BaseClick) šviežiai pagamintame *Click*-chemijos buferyje (0,2 M trietilamonio acetato, 2 mM askorbo rūgšties, 50 % dimetil sulfoksido, 0,5 mM Tris(benziltriazolilmetil)-

amino, 0,25 mM CuSO₄, pH 7). Laisvo Cy5-NHS esterio perteklius pašalintas, naudojant RNA Clean and Concentrator-25 kolonėles (Zymo Research), alternatyviai, Eterneono-480/635 azido perteklius pašalintas išsodinant etanolyje. Mėginiai sumaišomi su lygiu tūriu 66 % glicerolio ir užnešami ant 12 % poliakrilamidinio gelio. Fluoroforo signalas gelyje nustatomas, naudojant FLA-5100 Image Reader (Fujifilm) skenerį su 635 nm lazeriu (Cy5) arba 473 nm lazeriu (Eterneonui), toliau gelis dažomas etidžio bromidu ir visos RNR vizualizuojamos 473 nm lazeriu MultiGauge programoje (Fujifilm).

2.4.9 Selektivus miRNR žymėjimas fluoroforu įvairių RNR mišinyje

RNR mišinys, sudarytas iš *in vitro* transkripcijos būdu gautų augalų pre-miR173 ir archėjų C/D dėžutės mažosios RNR sR47-A31, o taip pat chemiškai susintetintos gyvūnų piR3 (1 μM kiekvienos), sumaišytas su 0,5 μM metilintos (kontrolėi) arba nemodifikuotos sintetinės miR173/miR173* ir inkubuotas su 100 nM HEN1 ir 100 μM Ado-6-ethyne arba be kofaktoriaus (kontrolėi) Reakcijos buferyje 1 val. 37°C temperatūroje. Išsodinti mėginiai buvo inkubuoti su 250 μM Eterneono-480/635-azido (BaseClick) *Click-chemijos* buferyje 1 val. 42°C temperatūroje, denatūruoti 47.5 % formamide, 10 mM EDTA 5 min 85 °C temperatūroje ir išanalizuoti dPAGE metodu. Eterneono fluorescencija buvo detektuota FLA-5100 Image Reader (Fujifilm) skeneriu, naudojant 473 nm lazerį. Tuomet gelis nudažytas etidžio bromidu ir RNR vizualizuota su 473 nm lazeriu MultiGauge programoje (Fujifilm).

2.4.10 Selektivus miRNR/DNR metilinimas su *E. coli* totaline RNR

0,1 μM 5'-³³P-žymėtos miR173 arba miR-210 sumaišyta su totaline RNR, išgryninta iš *E. coli* ER1727 (žr. oligonukleotidų ir nukleino rūgščių paruošimo dalį) santykiu 1:10, 1:50 ir 1:100, o taip pat su 0,12 μM

komplementaraus DNR oligonukleotido. Gauti mišiniai suldyti ir inkubuoti su 100 μM AdoMet ir 0,25 μM HEN1 arba be metiltransferazės (kontrolėi). Toliau mėginiai veikiami natrio perjodatu ir analizuojami dPAGE metodu.

2.4.11 Selektīvus FAM-DNR nukreiptas miRNR alkilimas mišinyje su U2OS totaline RNR

0,1 μM 5'-³³P-žymėta miR173 sumaišoma su totaline RNR iš žmogaus osteosarkomos U2OS ląstelių linijos (neturinčioje į augalų miR173 panašių sekų) santykiu 1:10 ir suldydoma su komplementaria DNR arba 3'-gale FAM fluoroforu modifikuota DNR. Mėginiai alkilinami 1 val. 37°C temperatūroje su 0,25 μM HEN1 ir 100 μM Ado-11-amine kofaktoriumi, po to analizuojami dPAGE metodu.

2.4.12 Selektīvus DNR nukreiptas miRNR alkilimas įvairių RNR mišinyje
Mišiniai, sudaryti iš miR173, miR-26a* ir let-7a* (0,1 μM kiekvienos), tik viena iš kurių buvo 5'-³³P-žymėta (miR-26a* arba let-7a*) suldyti su 0,12 μM DNA173-R2:D2, DNA26a*-R2:D2 arba DNA7a*-R2:D2. Gauti šeši mišiniai inkubuoti su 100 μM Ado-6-amine ir 0,25 μM HEN1 arba be baltymo (kontrolėi). Mėginiai išanalizuoti dPAGE metodu.

2.4.13 miRNR/SA-DNR modifikacijos analizė

Tiriama miRNR suldyta su komplementaria DNR, savo 3'-gale sujungta su streptavidinui specifiško aptamero (SA) seka. 0,2 μM gauto dvigrandinio 5'-³³P-miRNR/SA-DNR substrato inkubuojama su 0,25 μM HEN1 ir 100 μM AdoMet, Ado-6-amine, Ado-11-amine arba be kofaktoriaus (kontrolėi) Reakcijos buferyje 1 val. 37°C. Reakcijos sustabdytos Stabdymo buferiu su Proteinaze K. Mėginiai, modifikuoti AdoMet, papildomai paveikti natrio perjodatu. Visi mėginiai išsodinti ir išanalizuoti dPAGE.

2.4.14 miRNR/SA-DNR ištraukimo analizė

2 μM viengrandinio SA-DNR arba dvigrandinio miRNR/SA-DNR substrato, turinčio 5'-³³P-žymėtą miRNR arba SA-DNR grandinę, inkubuota su magnetinėmis dalelėmis Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Thermo Fisher) pagal gamintojo rekomendacijas. Alternatyviai, 2 μM 5'-³³P-žymėtos miRNR buvo sulydyta su 2 μM komplementarios SA-DNR, inkubuota su 100 μM Ado-6-amine ir 0,5 μM HEN1 arba be baltymo (kontrolėi) 1 val. 37°C temperatūroje ir tik po to veikta magnetinėmis dalelėmis. Ištrauktos miRNR nuėmimui mėginiai buvo inkubuoti 47,5 % formamide, 10 mM EDTA 85°C temperatūroje 5 minutes. Nuo rutuliukų nusiurbtas supernatantas, vandenyje ištirpinta magnetinių dalelių frakcija ir pradinis mėginys prieš magnetinių dalelių stadiją buvo išanalizuoti dPAGE.

2.4.15 Selektivus miRNR žymėjimas fluoroforu su SA-DNR paremtu ištraukimu

Keturi mišiniai, sudaryti iš let-7a, miR-26a, miR173 ir miR-210 (9 μM kiekvienos) tik su viena iš šių miRNR 5'-³³P-žymėta kiekviename mišinyje buvo sulydyti su 18 μM SA210-R2:s0 DNR, komplementaria miR-210. Mišiniai praskiesti iki 1,5 μM kiekvienos miRNR koncentracijos ir inkubuoti su 0,4 μM HEN1 ir 200 μM Ado-6-azide Reakcijos buferyje 100 min. 37°C temperatūroje. Gauti mėginiai paveikti magnetinėmis dalelėmis Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Thermo Fisher) pagal gamintojo rekomendacijas, išsodinti etanolyje ir ištirpinti vandenyje iki 5 μM koncentracijos. Po to mišiniai sumaišyti su šviežiai paruoštu CuBr : TBTA (3,3 mM : 6,6 mM) DMSO ir 0,5 mg/ml Cy5,5-alkyne fluoroforu ir inkubuoti 50 % DMSO tirpale 2 val. 42°C temperatūroje. Mėginiai išfrakcionuoti 12 % denatūruojančiame poliakrilamidiniame gelyje, kuris buvo nuskenuotas, naudojant Fujifilm FLA-5100 Image Reader skenerį su 670 nm lazeriu ir R705 LPFR filtru Cy5,5

fluorescencijos detekcijai bei 635 nm lazeriu su IP filtru 5'-³³P-žymėtos miRNR detekcijai ir išanalizuoti MultiGauge (Fujifilm) programoje.

2.4.16 Försterio resonansinė energijos pernaša (FRET) tirpale

0,1 μ M miR173/DNA173-R2:D0 arba inkorporuotą Cy3 fluoroforą turinčio miR173/DNA173-R2:D0-Cy3 heteroduplekso inkubuojama su 0,25 μ M HEN1 su 100 μ M Ado-6-amine arba be kofaktoriaus (kontrolėi) Reakcijos buferyje 1 val. 37°C temperatūroje. Visi keturi mišiniai yra veikiami chloroformu ir išsodinami etanolyje. Ištirpinus gautas nuosėdas Boratiniame buferyje A (pH 8,6) iki 0,8 μ M miRNR/DNR(-Cy3) koncentracijos inkubuojama su 1 mg/ml Cy5-NHS esterio (GE Healthcare) 3 val. 37°C temperatūroje. Laisvo fluoroforo pašalinimui mėginiai triskart išsodinti etanolyje ir perlydyti Sulydymo buferyje. Toliau visi keturi mėginiai praskiesti iki 20 nM koncentracijos TE buferyje (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5), turinčiame 1/100 tūrio dalį BME. Fluorescencija buvo matuojama, naudojant spektrofluorimetrą FluoroMax-3 (Jobin Yvon Horiba) esant 500 nm sužadimui ir matuojant išspinduliavimą 520-580 nm bangos ilgio diapazone, o taip pat esant 590 nm sužadimui, matuojant išspinduliavimą 610-580 nm bangos ilgio diapazone, 1 nm bangos ilgio žingsniu, 0,2 sek. integracijos laiku ir sužadavimo/išspinduliavimo plyšiu lygiu 5 nm. Foninė miRNR/DNR duplekso fluorescencija buferyje buvo atimta iš miRNR/DNR-Cy3, miRNR-Cy5/DNR ir miRNR-Cy5/DNR-Cy3 spektrų. Gauti rezultatai buvo apdoroti GraFit programoje.

2.4.17 Försterio resonansinė energijos pernaša (FRET) gelyje

0,1 μ M miR173/DNA173-R2:D0 (būsima Cy5,5 kontrolė) arba miR173/DNA173-R2:D0-Cy3 (būsimas FRET mėginys) alkilinama 0,25 μ M HEN1 ir 100 μ M Ado-6-azide Reakcijos buferyje 1 val. 37°C. Papildomai miR173/DNA173-R2:D0-Cy3 heterodupleksas inkubuotas be kofaktoriaus

(Cy3 kontrolė). Siekiant pašalinti baltymų priemaišas mėginiai buvo paveikti chloroformu, toliau mišiniai išsodinti etanolyje ir ištirpinti vandenyje. *Click*-cheminė reakcija atliekama inkubuojant 1,4 μ M substrato su šviežiai paruoštu CuBr : TBTA (3,3 mM : 6,6 mM) ir 0,5 mg/ml Cy5,5-alkyne fluoroforu 50 % DMSO tirpale 2 val. 42°C temperatūroje. Mėginiai išsodinami etanolyje, ištirpinami vandenyje ir frakcionuojami 12 % natyviame poliakrilamidiniame gelyje. Po elektroforezės gelis nuskenuojamas Fujifilm FLA-5100 skeneriu, naudojant 532 nm lazerį su O575 LPG filtru (Cy3 detekcijai), 607 nm lazerį su R705 LPFR filtru (Cy5,5 detekcijai) ir 532 nm lazeriu su R705 LPFR filtru (FRET signalo nustatymui). Gauti vaizdai analizuojami MultiGauge (Fujifilm) programoje.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

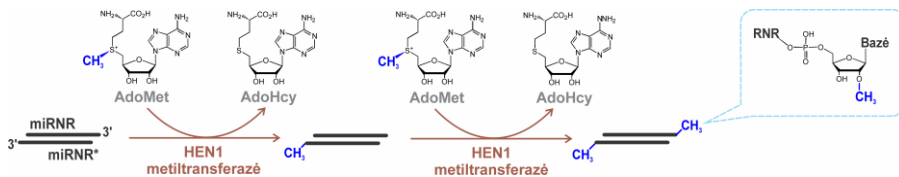
3.1 HEN1 katalizuojamo miRNR/miRNR* metilinimo mechanizmo tyrimas

Mažosios RNR atlieka ypatingai svarbias reguliacines funkcijas visų eukariotų, taip pat ir žmogaus, ląstelėse: siRNR kovoja su virusų ir judriųjų genomo elementų integracija, todėl yra svarbios genomo stabilumui, tuo tarpu miRNR plačiai dalyvauja potranskripcinėje genų raiškos reguliacijoje, o jos sutrikimai dažnai lemia įvairias ligas. Abi mažųjų RNR grupės gali būti metilinos šioms molekulėms specifinės metiltransferazės HEN1, kuri perneša metilo grupes nuo S-adenozil-L-metionino (AdoMet) kofaktoriaus ant miRNR ir siRNR 3'-galinių nukleotidų 2'-OH grupių. Reakcijos metu demetilintas AdoMet virsta S-adenozil-homocisteinu (AdoHcy). Šios disertacijos tyrimų tikslas buvo pritaikyti HEN1 mažųjų RNR žymėjimui, vietoj metilo grupės pernešant ant jų skirtingas funkcines ar reporterines molekules nuo sintetinių AdoMet analogų. Tyrimai pradėti nuo HEN1 metilinimo mechanizmo išsiaiškinimo.

3.1.1 Duplekso grandinių metilinimo prioriteto tyrimas

Kaip buvo rašyta literatūros apžvalgos dalyje, HEN1 turi dvigrandinę RNR surišančius domenų, o modifikuojamos grandinės ilgis yra preciziškai „išmatuojamas“ (Huang et al., 2009). Remiantis šiais duomenimis, HEN1 baltymo La motyvą turintis domenas sąveikauja su vienos iš duplekso grandinių 5'-galu, kurios 3'-galas patenka į metiltransferazinį domeną ir yra metilinas 2'-OH pozicijoje (Pav. 3.1). Dėl tokio substrato-fermento sąveikos pobūdžio absoliuti dauguma ląstelėje aptinkamų RNR negali tarnauti substratais HEN1 katalizuojamose reakcijose, nes pasižymi viengrandine struktūra ir turi kitokį, nei 20-24 nt ilgį. Būtent šias fermento savybes ir norima išnaudoti, pritaikant HEN1 specifiniam mažųjų RNR žymėjimui.

Kadangi HEN1 modifikuoja dvigrandinius RNR/RNR dupleksus, t. y., kiekviena substrato molekulė turi iš karto du taikinius – kiekvienos iš grandinių 3'-gale, o pats fermentas turi tik vieną metiltransferazinį domeną, vadinasi, vienos reakcijos metu yra užmodifikuojama tik viena grandinė, susidarant tarpiniam hemimetilintam dupleksui (Pav. 3.1). Vėliau trinaris HEN1-AdoHcy-RNR^{CH₃}/RNR kompleksas išyra, o hemimetilintos RNR dupleksas iš naujo sudaro sąveikas su HEN1 ir nauja AdoMet molekule taip, kad kita duplekso grandinė atsiduria metiltransferaziniame HEN1 domene, kur yra užmodifikuojama.

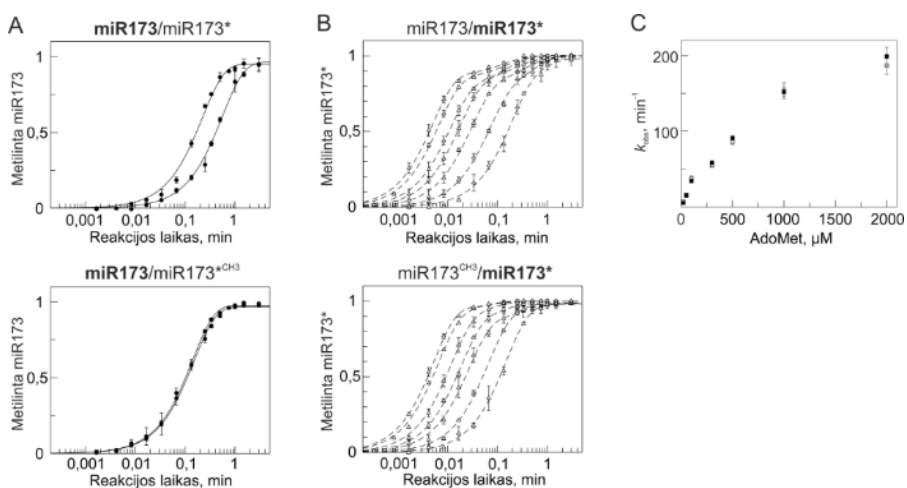


Pav. 3.1. HEN1 katalizuojamo metilinimo schema. Mažųjų RNR metilinimas vyksta dviem etapais. Iš pradžių į fermento metiltransferazinį domeną patenka vienos duplekso grandinės 3'-galinis nukleotidas, kur jo ribozės 2'-OH pozicija yra 2'-O-metilinama nuo AdoMet kofaktoriaus, taip susidarant hemimetilintam substratui. Vėliau kompleksas išyra ir, HEN1 prisirišus prie duplekso priešinga orientacija, modifikuojamas kitos grandinės 3'-galas.

Vienas iš klausimų, į kuriuos būtina atsakyti prieš pereinant į žymėjimo technologijų kūrimą – kaip HEN1 pasirenka subrendusio miRNR/miRNR* (o taip pat siRNR/siRNR*) duplekso grandines metilinimui *in vitro*, t. y., ar šis fermentas turi prioritetą kuriai nors iš grandinių – kreipiančiajai arba lydinčiajai. Kreipiančioji miRNR grandinė yra ta, kuri dažniau įtraukiama į RNR indukuotus nutildymo kompleksus (RISC), kuriuose ji sąveikauja su geno-taikinio informacinėmis RNR (iRNR) ir dalyvauja jas koduojančių genų potranskripciniame nutildyme (PTGS). Savo ruožtu, lydinčioji (žymima žvaigždute) miRNR* grandinė susiporuoja ir lydi kreipiančiąją RNR iki jos įtraukimo į RISC kompleksą. Prieš pat įtraukimą į RISC kompleksą miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleksų 3'-galai yra 2'-O-metilinami

HEN1 fermento, kas apsaugo minėtas RNR nuo degradacijos. Nebuvo aišku, ar HEN1 turi prioritetą kuriai nors iš duplekso grandinių *in vitro* ir kaip šios grandinės yra pasirenkamos metilinimui.

Kitas klausimas buvo, ar pirmos grandinės metilinimas daro kokią nors įtaką kitos grandinės modifikacijai. Kitais žodžiais, jeigu pasirodytų, kad *in vitro* sąlygomis HEN1 labiau linkęs modifikuoti mums nepalankią duplekso grandinę, ar metilo grupės buvimas nesutrikdys kitos, mums reikalingos, duplekso grandinės modifikacijos.



Pav. 3.2. ³³P-žymėtos miRNR grandinės metilinimo priklausomybė nuo reakcijos laiko ir AdoMet koncentracijos. A. Kreipiančiosios miR173 grandinės modifikacija nemetilintame duplekse (viršuje) ir hemimetilintame duplekse (apačioje) aprašoma vienos eksponentės lygtimi ir yra mažai priklausoma nuo AdoMet koncentracijos 20-100 μM diapazone. B. Lydinčiosios miR173* grandinės modifikacija nemetilintame duplekse (viršuje) ir hemimetilintame duplekse (apačioje) aprašoma dviejų eksponenčių lygtimi ir yra stipriai priklausoma nuo AdoMet koncentracijos 20-2000 μM diapazone. C. Stebimo lydinčiosios miR173* grandinės metilinimo greičio priklausomybė nuo AdoMet koncentracijos. Juodi taškai žymi kreipiančiąją miR173 grandinę, balti trikampiai – lydinčiąją miR173*. Kiekvienas eksperimentas buvo pakartotas 3-5 kartus.

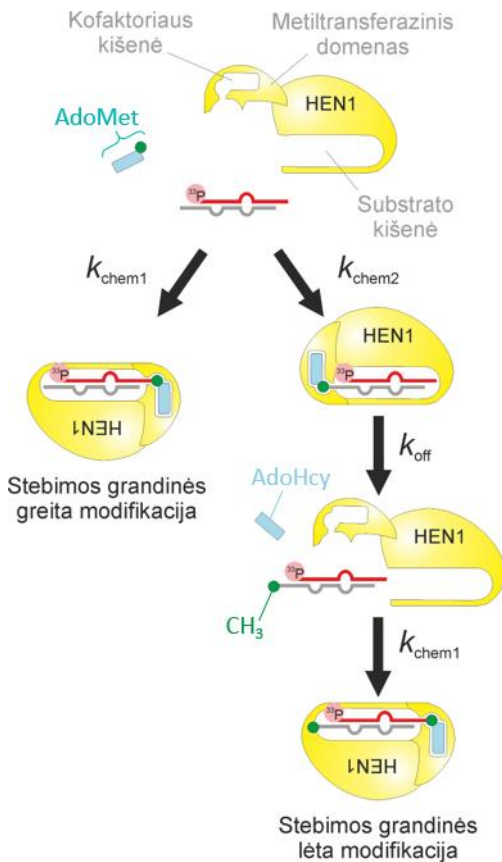
Tam, kad atsakytume į šiuos klausimus, buvo nuspręsta atlikti kinetinius tyrimus vienos apšukos sąlygomis, t. y., esant HEN1 fermento pertekliui dvigrandinio substrato atžvilgiu. Eksperimentams buvo pasirinkta

Arabidopsis thaliana miR173/miR173*, kuri yra natūraliai metilinama HEN1 baltymo augalų ląstelėse, ir yra viena iš labiausiai tyrinėjamų miRNR. Norėdami nustatyti, koku greičiu metilinamos atskiros duplekso grandinės, kiekvienu atveju ³³P-žymėta, ir dėl to matoma eksperimento metu, buvo tik miR173 arba miR173* grandinė. Išanalizavus eksperimentų duomenis buvo gautos logaritminės kreivės, atspindinčios metilinimo dinamiką (Pav. 3.2).

Lentelė 3.1. Nustatyti miR173/miR173* grandinių metilinimo parametrai. Kreipiančiosios miR173 ir lydinčiosios miR173* grandinių metilinimo parametrai aprašyti atitinkamai vienos ir dviejų eksponenčių lygtimis. Metilinimo greičiai nurodyti apskomis per minutę (min⁻¹), metilinimo amplitudės nurodytos kaip procentai šalia atitinkamos metilinimo greičio konstantos.

AdoMet	Kreipiančioji miR173 grandinė				Lydinčioji miR173* grandinė			
	Nemetilinta		Hemimetilinta		Nemetilinta		Hemimetilinta	
	miR173/miR173*		miR173/miR173 ^{OD}		miR173/miR173*		miR173 ^{OD} /miR173*	
	Greitis (min ⁻¹)	Amplitudė (%)	Greitis (min ⁻¹)	Amplitudė (%)	Greitis (min ⁻¹)	Amplitudė (%)	Greitis (min ⁻¹)	Amplitudė (%)
2000 μM					199 ± 12	86 ± 3	187 ± 12	94 ± 3
					7.2 ± 3	14 ± 3	11 ± 13	6 ± 3
1000 μM					152 ± 6	84 ± 1	154 ± 10	91 ± 5
					6.0 ± 1	16 ± 1	20 ± 13	9 ± 4
500 μM					91 ± 3	79 ± 1	86 ± 5	88 ± 4
					6.0 ± 1	21 ± 1	13 ± 6	12 ± 4
300 μM					58 ± 3	83 ± 3	55 ± 3	87 ± 4
					4.6 ± 1	17 ± 2	7.8 ± 3	13 ± 4
100 μM	4.5 ± 0.2	100	7.0 ± 0.2	100	35 ± 3	79 ± 3	38 ± 3	87 ± 5
					2.9 ± 1	21 ± 3	3.3 ± 2	13 ± 5
50 μM					15 ± 1	75 ± 4	16 ± 2	86 ± 12
					2.0 ± 1	25 ± 4	3.8 ± 3	14 ± 11
20 μM	1.8 ± 0.1	100	6.6 ± 0.2	100	5.5 ± 1	81 ± 21	7.0 ± 1	87 ± 13
					1.4 ± 1	19 ± 19	3.2 ± 2	13 ± 13

Buvo nustatyta, kad kreipiančiosios miR173 grandinės metilinto produkto priklausomybės nuo reakcijos trukmės eksperimentiniai duomenys yra aprašomi naudojant vienos eksponentės lygtį, tuo tarpu lydinčiosios miR173* grandinės grafike matoma dviejų fazių (greitos ir lėtos) logaritminė kreivė, reikalaujanti dviejų eksponenčių lygties (Pav. 3.2, lentelė 3.1). Gautiems duomenims paaiškinti buvo sukurtas dviejų pakopų ir dviejų kelių metilinimo HEN1 fermentu modelis (Pav. 3.3).



Pav. 3.3. HEN1 katalizuojamas ^{33}P -miRNR^(*)/miRNR^(*) metilinimo modelis. Remiantis siūlomu modelių, ^{33}P -žymėta grandinė gali būti modifikuota tiesiogiai (k_{chem1}) arba iš pradžių užmodifikuojant ^{33}P -nežymėtą, todėl gelyje nematomą grandinę (k_{chem2}), tuomet kompleksui disocijuojant (k_{off}) ir tik tuomet susirišant žymėtos grandinės modifikacijai palankia orientacija ir pastarąją užmodifikuojant (k_{chem1}). ^{33}P -žymėta miRNR grandinė, t.y., stebima eksperimento metu, pažymėta raudonai, nestebima miRNR grandinė – pilkai.

Mūsų pasiūlytas modelis numato, kad HEN1 gali rištis su miR173/miR173* duplesu dviem orientacijomis, viena iš kurių yra palanki kreipiančiosios miR173 grandinės modifikacijai, kita lydinčiosios – miR173*.

Jeigu HEN1 suriša duplesą tokia orientacija, kad metiltransferaziniame fermento domene atsiduria ^{33}P izotopu žymėtos grandinės 3'-galas, kuris iš karto gali būti metilinamas, tuomet mes galime stebėti tiesioginį metilo grupės pernešimo greitį. Tačiau, jeigu modifikacijai palankioje padėtyje iš pradžių atsidurs nežymėtos grandinės 3'-galas, tuomet būtent ši grandinė bus metilinama pirma, vėliau vyks HEN-miRNR/miRNR*-AdoHcy komplekso iširimas, ir tik po antro HEN1 susirišimo su hemimetilintu duplesu priešinga orientacija bus stebimas ^{33}P žymėtos grandinės metilinimas. Tokiu būdu, jeigu dalyje miR173/miR173* duplesų HEN1 iš pradžių metilina ^{33}P -žymėtą, o kitoje dalyje – nežymėtą grandinę, tuomet turėtų būti stebimos dvi metilinimo greičio konstantos – greitoji (k_{chem1}) ir lėtoji ($k_{chem2} + k_{off} + k_{chem1}$) fazės. Remiantis šiuo modeliu, lydinčiosios miR173* grandinės k_{chem1} konstanta

turėtų atitikti tiesioginį metilo grupės pernešimo greitį, stebimą greitosios fazės metu, kuomet HEN1 iš pradžių metilina būtent ^{33}P -žymėtą miR173*. Tuo tarpu, lėtoji miR173* metilinimo fazė yra sudėtinė iš $k_{chem2} + k_{off} + k_{chem1}$ konstantų reikšmių ir atspindi suminį abiejų grandinių metilinimo ir komplekso iširimo greitį (Pav. 3.3).

Sprendžiant iš to, kaip dažnai miR173/miR173* duplekso modifikacija vyksta pagal vieną, ir kaip dažnai pagal kitą metilinimo kelią, galima apibūdinti HEN1 polinkį iš pradžių metilinti arba kreipiančiąją miR173, arba lydinčiąją miR173* grandinę, ir tik po to, likusią duplekso grandinę. Ši HEN1 metiltransferazės prioritetą kuriai nors iš grandinių įmanoma apskaičiuoti iš greitosios ir lėtosios metilinimo fazių amplitudžių, t. y., iš abiejų eksponenčių maksimalaus aukščio y ašyje. Minėtu būdu buvo nustatyta, kad lydinčiosios miR173* grandinės k_{chem1} konstantos amplitudė yra 75-86 %, kas rodo, kad maždaug 4/5 visų atvejų HEN1 su nemetilintu miR173/miR173* dupleksu visų pirma rišasi orientacija, kuri yra palanki lydinčiosios miR173* metilinimui, ir tik po to modifikuojama kreipiančioji miR173 (lentelė 3.1). Atitinkamai, kreipiančioji miR173 grandinė pirma yra metilinama tik 14-25 %, t. y., maždaug 1/5 visų atvejų (lentelė 3.1). Siūlomą metilinimo modelį atitinka ir šiame darbe gautus duomenis patvirtina kiti VU BTI DMTS tyrimai, atlikti G. Vilkaičio, A. Plotnikovos ir S. Jachimovičiūtės-Baranauskės (Baranauskė et al., 2015).

Kaip buvo rašyta aukščiau, miRNR dupleksų pilnas metilinimas vyksta per tarpinę hemimetilintą būseną, kuomet tik viena duplekso grandinė turi modifikaciją. Tuo tarpu mūsų gauti eksperimentiniai rezultatai rodo, kad bent jau miR173/miR173* atveju HEN1 kaip pirmą grandinę dažniau metilina ne kreipiančiąją miR173, kuri tiesiogiai dalyvauja genų nutildymo procese, bet lydinčiąją miR173*. Žinant tai, natūraliai išskyla klausimas, ar metilo grupės buvimas vienoje duplekso grandinėje daro įtaką kitos grandinės modifikacijai. Todėl buvo nuspręsta palyginti reakcijos parametrus tarp nemetilintų ir

hemimetilintų miRNR dupleksų. Eksperimentų metu pažymėta grandinė buvo sulydoma su jau iš karto metilo grupę turinčia jai komplementaria grandine. Tokiu būdu buvo gauti du tiriamieji substratai: miR173/miR173*^{CH₃} dupleksas su ³³P-žymėta kreipiančiąja miR173, ir miR173^{CH₃}/miR173*, kuriame žymėta ir stebima eksperimentų metu buvo lydinčioji miR173*. Atlikus tyrimus identiškomis, kaip ir ankstesniuose eksperimentuose, sąlygomis ir išanalizavus eksperimento duomenis paaiškėjo, kad hemimetilintų substratų reakcijos greičio konstantos ir jų amplitudės nežymiai skiriasi nuo nemetilintų miR173/miR173*, vadinasi vienos grandinės modifikacija neturi įtakos kitos grandinės modifikacijai (lentelė 3.1).

Šiame skyriuje aprašyti tyrimai aiškiai parodo, kad *in vitro* HEN1 metiltransferazės pagalba gali būti sėkmingai pažymėtos abi mažųjų RNR duplekso grandinės.

3.1.2 Metilinimo, priklausomai nuo 3'-galinio nukleotido, tyrimas

Šiuo metu yra žinoma, kad gyvūnų HEN1 baltymai-homologai skirtingus nukleotidus modifikuoja nevienodai. Pavyzdžiui, vaisinės muselės *DmHEN1* metilinimo efektyvumo priklausomybės nuo modifikuojamo 3'-galinio nukleotido eilė yra tokia: A (269 %) > C (137 %) > U (100 %) > G (44 %), skliausteliuose nurodant santykinį modifikacijos efektyvumą (Kirino and Mourelatos, 2007). Kadangi nukleotido cheminė prigimtis galbūt gali daryti įtaką mūsų tiriamo HEN1 baltymo vykdomai reakcijai, buvo sukurti tokie substratai, kurių kreipiančioji miR173 grandinė turėjo skirtingą 3'-galinį nukleotidą: C (kaip laukinio tipo miR173), U, G arba A. Sulydžius vieną iš keturių miR173 variantų su laukinio tipo lydinčiąja miR173* grandine, buvo ištirtos dupleksų metilinimo reakcijos (lentelė 3.2).

Lentelė 3.2. miR173, turinčios skirtingus 3'-galinius nukleotidus, metilinimo reakcijos parametrai.

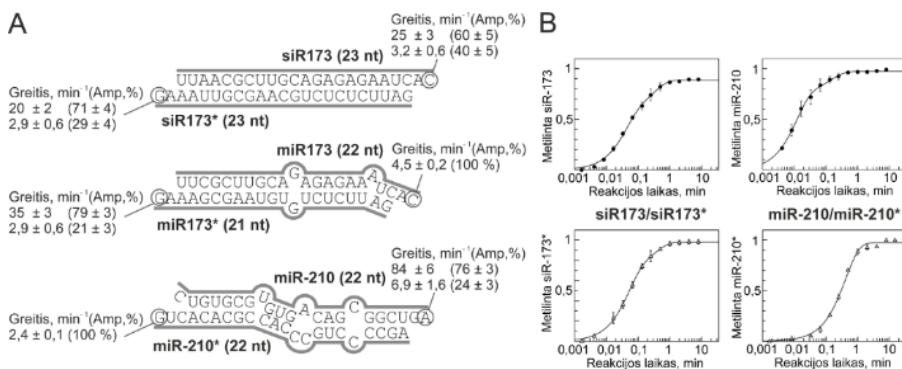
Kreipiančioji miR173-C/G/A/U grandinė			Lydinčioji miR173* grandinė		
miRNR	Greitis (min^{-1})	Amplitudė (%)	miRNR	Greitis (min^{-1})	Amplitudė (%)
miR173-C (wt)	4.5 ± 0.2	100	miR173*	35 ± 3.0	79 ± 3
miR173-G	5.7 ± 0.2	100	(sulydyta su miR173-C)	2.9 ± 0.6	21 ± 3
miR173-A	37 ± 7.0	45 ± 7	miR173*	35 ± 2.0	78 ± 3
	5.4 ± 0.8	55 ± 7	(sulydyta su miR173-A)	4.6 ± 0.9	22 ± 3
miR173-U	3.7 ± 0.2	100			

Kaip matome, laukinio tipo (wt) miR173, turinčios 3'-gale C, metilinimo greičiai yra panašūs į kitų miR173 substratų, turinčių G, U arba A (nuo 3,7 iki 5,7 min^{-1}) (lentelė 3.2, kairė). Iš kitos pusės, buvo pastebėta, kad ^{33}P -miR173-A/miR173* duplekso metilinimo kreivei aprašyti geriau tiko ne vienos, bet dviejų eksponenčių lygtis, nors pagal dvi eksponentes apskaičiuoti metilinimo greičiai buvo panašūs, ir sudarė 4,6-5,4 bei 35-37 min^{-1} (lentelė 3.2, miR173-A ir miR173*, sulydyta su miR173-A). Minėtu atveju, dviejų eksponenčių atsiradimą galėtų paaiškinti pasikeitusios amplitudžių reikšmės: miR173-A/miR173* kreipiančioji grandinė buvo metilinama pirma tik 45 % atveju, vietoj 78-79 %, kaip buvo kitų substratų atveju. Nustatyti parametrai rodo, kad A buvimas miR173 grandinės 3'-gale galbūt gali daryti įtaką HEN1 rišimuisi su dvigrandiniu substratu orientacijai, tačiau nei vienas iš keturių nukleotidų variantų nepadarė ženklesnės įtakos metilinimo greičiui, todėl buvo padaryta išvada, jog modifikuojamo nukleotido cheminė prigimtis praktiškai nedaro įtakos reakcijos greičiui. Vadinasi kuriamam mažųjų RNR žymėjimo metodui turėtų būti tinkamos miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR*, turinčios bet kokius 3'-galinių nukleotidų variantus.

3.1.3 Metilinimo, priklausomai nuo erdvinės struktūros, tyrimas

Norėdami suprasti, ar HEN1 katalizuojamam mažųjų RNR metilinimui įtaką daro erdvinė substrato struktūra, atlikome dar dviejų dupleksų, miR-210/miR-210* ir siR173/siR173*, kinetinę analizę. Pirmas iš substratų, miR-210/miR-210*, yra hipoksijos indukuojama žmogaus miRNR, susijusi su įvairiais suvėžėjimo procesais, įskaitant ląstelių apoptozę, angiogenezę ir metastazę (Dang and Myers, 2015). Paprastai gyvūnų miRNR, skirtingai nuo augalų miRNR, pasižymi didesnių nesuporuotų nukleotidų skaičiumi, galinčių turėti įtakos HEN1 metilinimui (<https://www.mirbase.com>). Nors žmogaus miR-210/miR-210* turi net šešis nekomplementarius nukleotidus centrinėje duplekso dalyje ir nesuporuotą kreipiančiosios grandinės 5'-nukleotidą (Pav. 3.4, A), tai nesutrukdė HEN1 modifikacijai, o metilinimo greitis buvo panašus ar net didesnis, nei miR173/miR173* substrato atveju. Tačiau priešingai nei miR173/miR173* miR-210/miR-210* duplekse 76 % metilinimo reakcijų pirma buvo modifikuojama ne lydinčioji, bet kreipiančioji grandinė (Pav. 3.4). Tai rodo, kad metiltransferazė, pati savaime, neskiria, kuri iš duplekso grandinių yra kreipiančioji. Panašiais greičiais buvo metilinamas ir substratas, analogiškas miR173/miR173*, bet turintis pilnai komplementarią dvigrandinę struktūrą su 2 nt išsikišimais 3'-galuose, pavadintas siR173/siR173* ir imituojantis pilnai komplementarių siRNR substratų modifikaciją (Pav. 3.4).

Apibendrinus duomenis, buvo buvo prieita prie išvados, jog HEN1 gali metilinti abi modifikuojamo duplekso grandines ir nei 3'-gale esančios nukleobazės cheminė prigimtis, nei mažosios RNR erdvinė struktūra, nei metilo grupės buvimas kitoje duplekso grandinėje neturi reikšmingesnės įtakos modifikacijos procesui, t. y., bet kuri miRNR ar siRNR, nepriklausomai nuo savo antrinės struktūros ar sekos, ir bet kuri jos duplekso grandinė potencialiai gali būti modifikuota, naudojant gamtinį AdoMet kofaktorių.

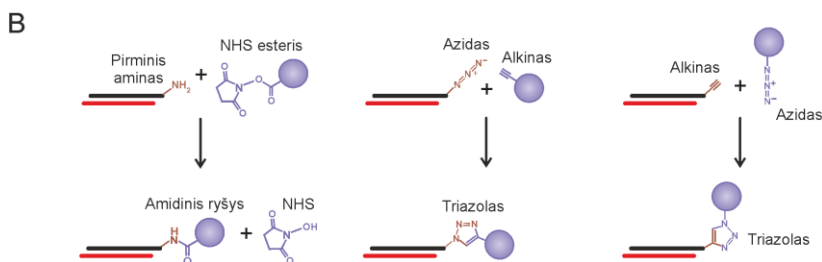
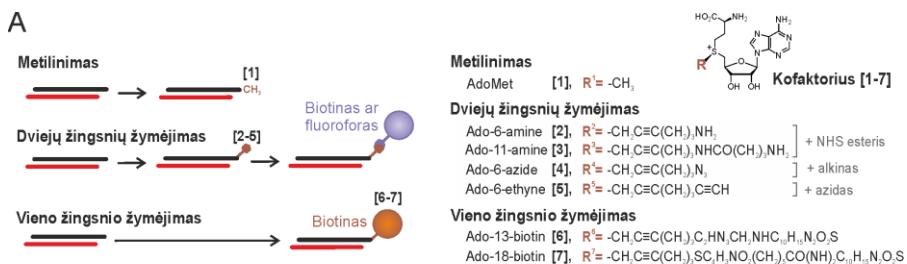


Pav. 3.4. siRNR ir miRNR metilinimas. A. Tyrimuose naudotų siRNR (siR173/siR173*) ir miRNR (miR173/miR173* bei miR-210/miR-210*) antrinės struktūros ir individualių grandinių metilinimo kinetinės konstantos. Metilinimo greičiai (min⁻¹) ir amplitudės (Amp., %) buvo apskaičiuotos pagal vienos arba dviejų eksponenčių lygtis. B. Mažųjų RNR metilinimo priklausomybė nuo reakcijos laiko, esant fiksuotai 100 μM AdoMet koncentracijai.

3.2 HEN1 taikymas miRNR/miRNR* žymėjimui

Ankstesniame skyriuje aprašyti HEN1 metilinimo mechanizmo tyrimai atskleidė, kad *in vitro* metiltransferazė metilina ne tik augalų, bet ir žmogaus miRNR, pernešdama metilo grupę nuo AdoMet kofaktoriaus. Norėdami pritaikyti HEN1 mažųjų RNR žymėjimui pagal mTAG (angl. *methyltransferase-directed transfer of activated groups*) technologiją, šiame skyriuje ištyrėme ilgesnių nei metilo šoninių grandinių pernašą ant miRNR ir siRNR. Eksperimentai buvo atlikti su chemiškai susintetintais įvairių dydžių ir struktūrų šonines grandines turinčiais AdoMet [1] analogais, kuriuos galima padalinti į tris tipus:

- I) pirminio amino funkcinę grupę turintys Ado-6-amine [2] ir Ado-11-amine [3] kofaktoriai,
- II) „click-chemistry“ reakcijoms tinkantys Ado-6-azide [4] ir Ado-6-ethyne [5] dviejų žingsnių žymėjimo technologijai,
- III) biotino žymę turintys Ado-13-biotin [6] ir Ado-18-biotin [7], tinkantys vieno žingsnio žymėjimui (Pav., 3.5, a).



Pav. 3.5. Vieno ir dviejų žingsnių mažųjų RNR žymėjimo technologijos. A. Metiltransferazė HEN1 gali būti naudojama miRNR ir siRNR dupleksų metilinimui nuo AdoMet [1] kofaktoriaus. Taip pat HEN1 galima pritaikyti dviejų žingsnių žymėjimui, pernešant funkcines grupes turinčias šonines grandines nuo Ado-6-amine [2], Ado-11-amine [3], Ado-6-azide [4] ir Ado-6-ethyne [5] kofaktorių. Antro žingsnio metu prie perneštų funkcinių grupių galima prijungti įvairias prieinamas reporterines molekules, tokias kaip biotinas arba vienas iš fluoroforų. Alternatyviai HEN1 galima būtų pritaikyti ir tiesioginei reporterinės molekulės, tokios kaip biotinas, pernešai. Tyrimuose naudotų kofaktorių šoninių grandinių formulės nurodytos dešinėje pusėje. B. Antra stadija dviejų žingsnių žymėjimo technologijoje gali vykti tarp ant RNR perneštos pirminio amino grupės ir N-hidroksisukcinimido (NHS) esterio grupės arba pagal Cu (I) katalizuojamą „click-chemistry“ reakciją tarp alkino ir azido.

Pirmo tipo kofaktorių šoninės grandinės turi funkcinę pirminio amino grupę, kuri geba reaguoti su N-hidroksisukcinimido-esteriais (NHS-esteriais), tokiu būdu sudarant stabilius konjugatus tarp amino grupės, HEN1 pagalba perneštos ant RNR, ir mums reikalingos reporterinės molekulės, tokios kaip fluoroforo- arba biotino-NHS esterio (Pav. 3.5, b). Antrojo tipo kofaktorių šoninės grandinės dalyvauja „click-chemistry“ reakcijose ir vyksta tarp funkcinių grupių, kurios nėra sutinkamos biologinėse sistemose, todėl pasižymi ypač aukštu specifiskumu. Vienvalenčių vario jonų Cu(I) katalizuojama „click-chemistry“ reakcija leidžia pažymėti RNR šonine

grandine, turinčia azido grupę, ir prie jos prijungti alkino-reporterinės molekulės konjugatą, arba priešingai, pažymėti RNR alkino grupe ir prijungti azido-reporterinės molekulės konjugatą (Pav. 3.5, b). Galiausiai šoninės grandinės, turinčios biotino liekaną, geba labai aukštu afiniškumu nekovalentiškai sąveikauti su baltymu streptavidinu.

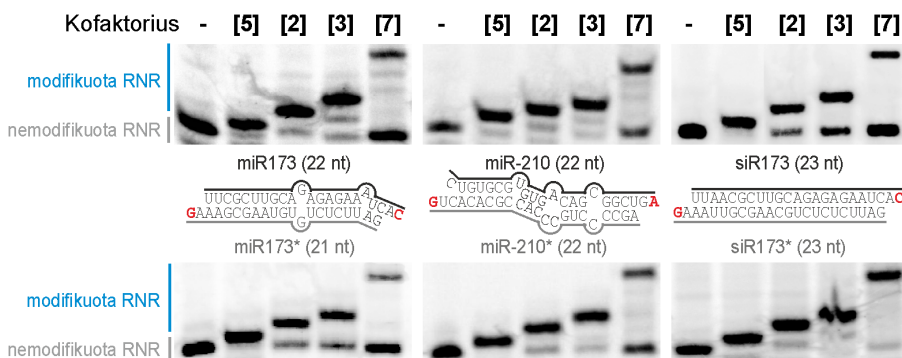
Reporterinė molekulė, pernešta ant substrato pagal vieno arba dviejų žingsnių žymėjimo technologiją, gali būti biotinas arba vienas iš komerciškai prieinamų fluoroforų. Biotino pernešimas ant miRNR ar siRNR galėtų būti naudingas norint taip žymėtą RNR ištraukti/praturtinti, naudojant streptavidinu dengtas magnetines daleles, kurios specifiskai sąveikauja su biotinu. Savo ruožtu fluoroforo prijungimas leistų pažymėtą RNR substratą vizualizuoti tirpale arba elektroforeziniame gelyje. Tokiu būdu mTAG technologija galėtų būti sėkmingai pritaikyta specifiniam miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleksų žymėjimui įvairiais reporteriais, kas praplėstų mažųjų RNR tyrimo metodų sąrašą.

3.2.1 Alkilinimo sintetiniais kofaktoriais tyrimas

3.2.1.1 Alkilinimo produktų analizė PAGE metodu

Visus HEN1 modifikacijai tinkančius substratus pagal savo erdvinę struktūrą galima būtų suskirstyti į tris tipus: vieną ar kelis nesuporuotus nukleotidus turinčius augalų miRNR/miRNR* dupleksus, didesniu nesuporuotų nukleotidu skaičiumi pasižyminčius gyvūnų miRNR/miRNR* ir iš pilnai komplementarių grandinių sudarytus siRNR/siRNR* dupleksus. Kaip modeliniai substratai alkilavimo tyrimams buvo pasirinktos augalų *A. thaliana* miR173/miR173*, žmogaus miR-210/miR-210* bei pilnai komplementari siR173/siR173*. Atlikus minėtų substratų inkubaciją su HEN1 metiltransferaze ir Ado-6-amine [2], Ado-11-amine [3], Ado-6-ethyne [5], Ado-6-amine [4] arba Ado-18-biotin [7] kofaktoriumi, mėginiai buvo užnešti į denatūruojanti poliakrilamidinį gelį (dPAGE). Išanalizavus elektroforezės

rezultatus paaiškėjo, jog visais atvejais, įdėjus vieną iš sintetinių AdoMet analogų, elektroforegramose yra stebimas mėginio juostelės poslinkis, lyginant su pradiniiais nemodifikuotais mėginiais – ant mėginio pernešta šoninė kofaktoriaus grandinė sumažino RNR mobilumą gelyje (Pav., 3.6).



Pav. 3.6. HEN1 modifikuoja miRNR ir siRNR, naudodamas sintetinius AdoMet analogus – dPAGE analizės elektroforegramos. Viršuje: ³³P-žymėta kreipiančioji duplekso grandinė (juoda), apačioje – lydinčioji (pilka). Po miR173/miR173* (kairėje), miR-210/miR-210* (centre) ar siR173/siR173* (dešinėje) inkubacijos su metiltransferaze HEN1 ir sintetiniais AdoMet analogais Ado-6-ethyne [5], Ado-6-amine [2], Ado-11-amine [3] arba Ado-18-biotin [7] elektroforezės metu yra stebimas ³³P-žymėtos RNR poslinkis – mobilumas mažėja (viršutinė kiekvieno takelio juostelė, migruojanti skirtingame aukštyje, priklausomai nuo kofaktoriaus). Tuo tarpu, nemodifikuota RNR dalis juda vienu frontu (apatinė kiekvieno takelio juostelė).

Šoninės grandinės pernešimas nuo sintetinių kofaktorių ant RNR sumažina pastarosios mobilumą elektroforeziniame gelyje, tuo tarpu kiekvieno mėginio nemodifikuota RNR dalis juda vienu apatiniu frontu. Kaip matome, išskyrus Ado-18-biotin [7], visų kitų kofaktorių ir substratų atvejais didesnioji RNR dalis yra sėkmingai modifikuota (Pav. 3.6).

3.2.1.2 Alkilinimo produktų analizė HPLC-MS metodu

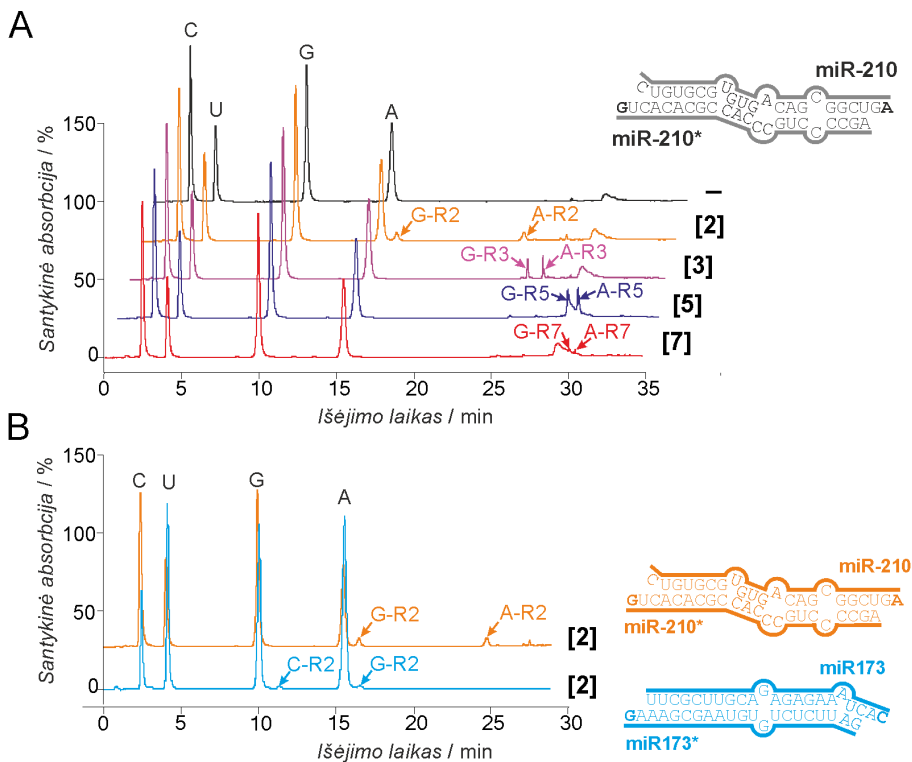
Norint patvirtinti šoninių grandinių pernešimą nuo sintetinių kofaktorių ant substratinių RNR buvo atlikta aukštos skyros skysčių chromatografinė-masių spektrometrinė HPLC-MS (angl. *high-performance liquid chromatography-mass spectrometry*) analizė. Po inkubacijos su HEN1

metiltransferaze ir Ado-6-amine [2], Ado-11-amine [3], Ado-6-ethyne [5] arba Ado-18-biotin [7] kofaktoriumi miR-210/miR-210* substratas buvo sudegraduotas nukleaze P1 ir defosforilintas šarmine fosfataze FastAP, susidarant pavienių nukleozidų mišiniui. Tokio poveikio rezultate kiekviename mėginyje turėtų susidaryti visų keturių tipų ribonukleozidai (C, U, G ir A), o taip pat miR-210 grandinės 3'-gale esantis nukleozidas A ir miR-210* grandinės 3'-galinis nukleozidas G su prijungta šonine grandine nuo atitinkamo kofaktoriaus (Pav. 3.6).

Atlikus analizę, paaiškėjo, kad kontroliniame mėginyje, į kurį nebuvo pridėta kofaktoriaus, chromatogramoje yra matomos keturios ryškios smailės: išeinančios trečią, penktą, dešimtą ir šešioliktą minutę (Pav. 3.7, A). Masės spektrometro pagalba šios keturios chromatogramos smailėse buvo identifikuoti atitinkamai citidino, uridino, guanozino bei adenozino dariniai. Toks nukleozidų išėjimo profilis, o taip pat smailių išėjimo laikais stebimi absorcijos spektrai sutampa su literatūriniais duomenimis (Nakajima et al., 2010). Taip pat 30-31 minutėmis buvo stebimos kelios dalinai susiliejusios nedidelės smailės, kurios buvo priskirtos papildomiems junginiams, atėjusiems iš baltyminių priemonių bei buferinių tirpalų, kurios dažnai stebimos HPLC analizės metu būtent chromatogramų gale (Pav. 3.7, A, viršutinė chromatograma, be kofaktoriaus).

Mėginių po reakcijos su vienu iš sintetinių kofaktorių chromatogramose be keturių nukleozidų smailių, kurių profiliai pilnai sutapo su kontrolinio mėginio profilu, papildomai stebimos po dvi atskiram mėginiui specifinės smailės, kurių išėjimo chromatogramoje laikas keitėsi, priklausomai nuo į reakciją įdėto kofaktoriaus (Pav. 3.7, A). Norėdami papildomai patikrinti, ar šios dvi smailės iš tikrųjų siejasi su modifikuojamo substrato 3'-galinio nukleozido bei ant jo pernešamos šoninės grandinės chemine prigimtimi, buvo atliktas analogiškas eksperimentas su miR173/miR173* ir Ado-6-amine kofaktoriumi (Pav. 3.7, B). Kaip matome, miR-210/miR-210* atveju

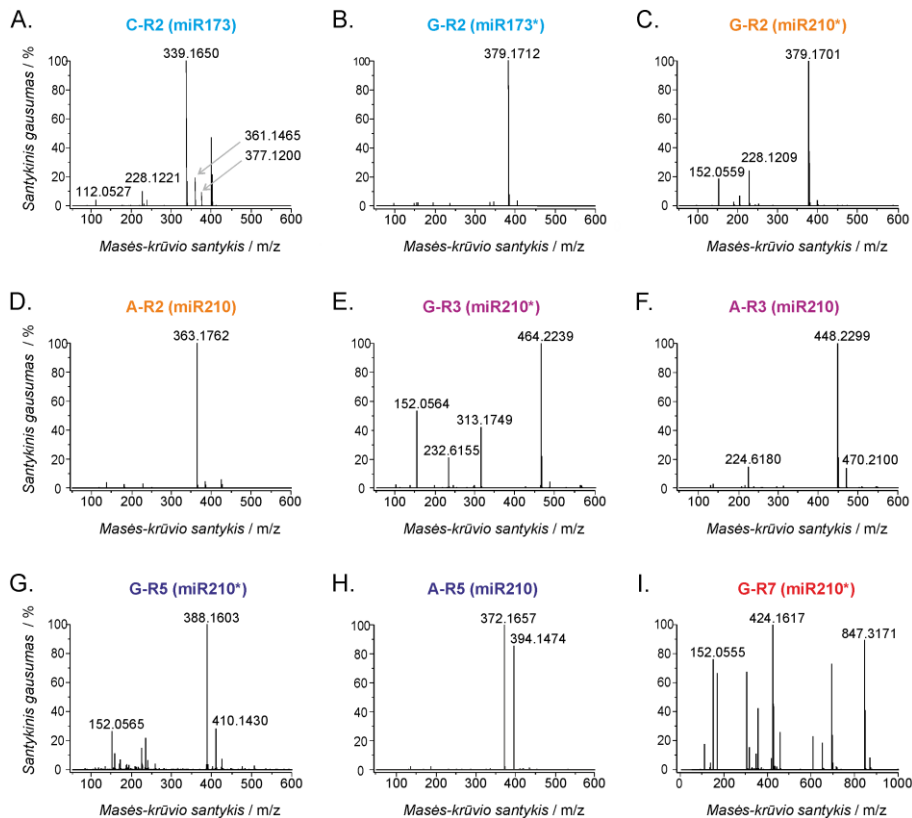
aptinkami modifikuoti 3'-galiniai G ir A, o miR173/miR173* atveju – modifikuoti C ir G nukleozidai. (Pav. 3.7, B).



Pav. 3.7. HEN1 modifikuotų miR-210/miR-210* mėginių HPLC-MS analizės chromatogramos. A. Kiekviename mėginyje papildomai prie keturių tipų ribonukleozidų (C, U, G ir A) buvo identifikuoti substrato 3'-galiniai nukleozidai, turintys nuo atitinkamo kofaktoriaus (Ado6-amine [2], Ado-11-amine [3], Ado-6-ethyne [4] arba Ado-18-biotin [5]) perneštą šoninę grandinę – modifikuotas A iš miR-210 grandinės ir modifikuotas G iš miR-210* grandinės. B. miR-210/miR-210* ir miR173/miR173*, modifikuotų Ado-6-amine kofaktoriumi, chromatogramos.

Visose kofaktoriui-specifinėse smailėse buvo nustatytas vienas ar keli junginiai, kurių masės ir krūvio (m/z) santykio reikšmės buvo labai artimos teoriškai apskaičiuotai ieškomo junginio (atitinkama šonine grandine modifikuotų G ir A – miR-210/miR-210* atveju, arba C ir G – miR173/miR173 atveju) reikšmei (Pav. 3.8 ir Lentelė 3.3). Kaip matome, daugelio junginių apskaičiuotos ir nustatytos m/z reikšmės tarpusavyje skiriasi tik keliomis milijoninėmis (ppm – *parts per million*) dalimis. Be to,

masių spektrometrinės analizės metu pavyko nustatyti šonine grandine modifikuotos ribozės fragmentus. Pavyzdžiui, Ado-6-amine kofaktoriūmi



Pav. 3.8. HPLC-MS analizės metu kofaktoriui specifinėse chromatogramų smailėse nustatytos masės/krūvio (m/z) spektrogramos. Smailės aukštis vaizduoja santykinį aptikto jono dažnumą. Smailės, virš kurių nurodytos jų skaitinės reikšmės, buvo identifikuotos, kaip ieškomo junginio m/z signalai. A ir B. miR173/miR173* duplekso, 3'-galinių nukleozidų (citidino ir guanozino, atitinkamai), modifikuotų Ado-6-amine [2] kofaktoriūmi, dariniai. C-H. miR-210/miR-210* duplekso, modifikuoto Ado-6-amine [2] kofaktoriūmi (C ir D), Ado-11-amine [3] kofaktoriūmi (E ir F) arba Ado-6-ethyne [5] kofaktoriūmi (G ir H), 3'-galinių nukleozidų (guanozino ir adozino, atitinkamai) dariniai. I. miR-210* grandinės 3'-galinio guanozino, modifikuoto Ado-18-biotin [7], dariniai (miR-210 grandinės, modifikuotos nuo Ado-18-biotin kofaktoriaus, nustatyti nepavyko dėl silpno signalo). Spektrogramų spalvos atitinka pav. 3.7 stebimas kofaktoriui specifines smailes. Dėl detalesnės informacijos žiūrėkite lentelę 3.3.

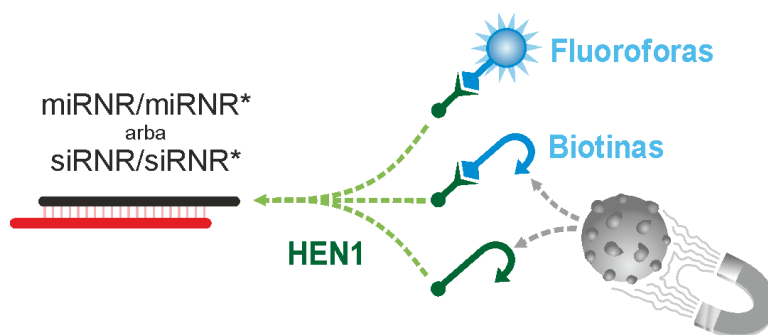
modifikuoto miR-210/miR-210* substrato atveju abiejų, ir modifikuoto citozino, ir modifikuoto adenino, chromatogramos smailėse buvo nustatytas ribozės-6-amino jonas bei nuo pilno nukleozido nuskilę atitinkamai citidino ar guanino bazės jonai. Gauti duomenys įrodo, kad HEN1 alkilavimo metu šoninė grandinė nuo sintetinio AdoMet analogo yra perduodama būtent ant RNR oligonukleotido 3'-galinės ribozės.

Lentelė 3.3. Apskaičiuotos ir praktiškai nustatytos masės/krūvio (m/z) reikšmės.

Sintetinis ko-faktorius	Laukiamas reakcijos produktas	Nustatytas reakcijos produktas			
		Junginys	Formulė	Apskait. m/z	Nustat. m/z
miR173/miR173* (3'-nukleozidai C ir G, atitinkamai)					
Ado-6-amine	C-6-amine	[Cytidine + H] ⁺	[C ₈ H ₉ N ₃ O] ⁺	112.0506	112.0527
		[Ribose-6-amine] ⁺	[C ₁₁ H ₁₈ NO ₄] ⁺	228.1230	228.1221
		[Cytidine-6-amine + H] ⁺	[C ₁₃ H ₂₃ N ₄ O ₅] ⁺	339.1663	339.1650
		[Cytidine-6-amine + Na] ⁺	[C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₅ Na] ⁺	361.1482	361.1465
		[Cytidine-6-amine + K] ⁺	[C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₅ K] ⁺	377.1222	377.1200
	G-6-amine	[Guanosine -6-amine + H] ⁺	[C ₁₆ H ₂₃ N ₅ O ₆] ⁺	379.1725	379.1712
miR-210/miR-210* (3'-nukleozidai A ir G, atitinkamai)					
Ado-6-amine	G-6-amine	[Guanine + H] ⁺	[C ₅ H ₆ N ₂ O] ⁺	152.0567	152.0559
		[Ribose-6-amine] ⁺	[C ₁₁ H ₁₈ NO ₄] ⁺	228.1230	228.1209
		[Guanosine-6-amine + H] ⁺	[C ₁₆ H ₂₃ N ₅ O ₆] ⁺	379.1725	379.1701
	A-6-amine	[Adenosine-6-amine + H] ⁺	[C ₁₆ H ₂₃ N ₅ O ₆] ⁺	363.1776	363.1762
Ado-11-amine	G-11-amine	[Guanine + H] ⁺	[C ₅ H ₆ N ₂ O] ⁺	152.0567	152.0564
		[Guanosine-11-amine + 2H] ⁺²	[C ₂₀ H ₃₁ N ₇ O ₈] ⁺²	232.6163	232.6155
		[Ribose-11-amine] ⁺	[C ₁₃ H ₂₂ N ₂ O ₅] ⁺	313.1758	313.1749
		[Guanosine-11-amine + H] ⁺	[C ₂₀ H ₃₀ N ₇ O ₈] ⁺	464.2252	464.2239
	A-11-amine	[Adenosine-11-amine + 2H] ⁺²	[C ₂₀ H ₃₁ N ₇ O ₈] ⁺²	224.6188	224.6180
		[Adenosine-11-amine + H] ⁺	[C ₂₀ H ₃₀ N ₇ O ₈] ⁺	448.2303	448.2299
		[Adenosine-11-amine + Na] ⁺	[C ₂₀ H ₂₉ N ₇ O ₈ Na] ⁺	470.2122	470.2100
Ado-6-ethyne	G-6-ethyne	[Guanine + H] ⁺	[C ₅ H ₆ N ₂ O] ⁺	152.0567	152.0565
		[Guanosine-6-ethyne + H] ⁺	[C ₁₆ H ₂₂ N ₅ O ₅] ⁺	388.1616	388.1603
		[Guanosine-6-ethyne + Na] ⁺	[C ₁₆ H ₂₁ N ₅ O ₅ Na] ⁺	410.1435	410.1430
	A-6-ethyne	[Adenosine-6-ethyne + H] ⁺	[C ₁₆ H ₂₂ N ₅ O ₅] ⁺	372.1667	372.1657
		[Adenosine-6-ethyne + Na] ⁺	[C ₁₆ H ₂₁ N ₅ O ₅ Na] ⁺	394.1486	394.1474
Ado-18-Biotin	G-18-biotin	[Guanine + H] ⁺	[C ₅ H ₆ N ₂ O] ⁺	152.0567	152.0555
		[Guanosine-biotin + 2H] ⁺²	[C ₂₆ H ₃₂ N ₁₀ O ₁₀ S ₂] ⁺²	424.1649	424.1617
		[Guanosine-biotin + H] ⁺	[C ₂₆ H ₃₁ N ₁₀ O ₁₀ S ₂] ⁺	847.3226	847.3171

3.2.2 miRNR/miRNR* dupleksų žymėjimo technologijos ir jų pritaikymas

HEN1 vykdoma miRNR/miRNR (ir siRNR/siRNR*) dupleksų modifikacija gali būti pritaikyta vieno ir dviejų žingsnių mažųjų RNR žymėjimo technologijoms (Pav. 3.5). Mūsų sukurto fermento-cheminio dviejų žingsnių žymėjimo metodo pirmos stadijos metu HEN1 metiltransferazės pagalba ant miRNR ar siRNR substrato yra pernešama santykinai kompaktiška šoninė grandinė, turinti tam tikrą funkcinę grupę. Antro žingsnio metu prie šios grupės galima prijungti norimą žymę, susidarant kovalentiniam ryšiui (Pav. 3.5). Optimizavus funkcinės grupės pernašą pirmo žingsnio metu, minėtas metodas gali būti greitai ir nesunkiai adaptuotas mažųjų RNR žymėjimui įvairiomis reporterinėmis molekulėmis. Pavyzdžiui, prie ant substrato perneštos funkcinės grupės galima prijungti įvairius komerciškai prieinamus fluoroforų konjugatus tiriamos miRNR (siRNR) vizualizavimui (Pav. 3.9).



Pav. 3.9. HEN1 metiltransferazės panaudojimo mažųjų RNR žymėjimui schema. HEN1 pagalba miRNR/miRNR* arba siRNR/siRNR* dupleksai gali būti modifikuoti šoninėmis grandinėmis, turinčiomis amino, azido, etino ar kitokias funkcines grupes. Antro žingsnio metu prie perneštos funkcinės grupės galima prijungti fluoroforą mažosios RNR vizualizavimui arba biotiną jos išgryninimui streptavidinu padengtomis magnetinėmis dalelėmis. Vieno žingsnio žymėjimo technologijoje reporterinė molekulė tokia kaip biotinas ant substrato yra pernešama tiesiogiai HEN1 metiltransferazės pagalba. Žaliai pažymėta kofaktoriaus šoninė grandinė, pernešama HEN1 metiltransferazės; mėlynai – chemiškai prijungiamas reporterio konjugatas.

Alternatyviai tirama mažoji RNR galėtų būti pažymėta biotino konjugatu, kuris pasižymi aukšto afiniškumo nekovalentine sąveika su baltymu streptavidinu, kurios disociacijos konstanta yra viena mažiausių, sutinkamų gamtoje, $K_d \approx 10^{-14}$ – 10^{-16} M (Laitinen et al., 2006). Per du žingsnius biotilinta mažoji RNR, prikibusi prie magnetinių dalelių, galėtų būti išgryninta magneto pagalba, ištraukiant ją iš įvairių mišinių ir ląstelių ekstraktų (Pav. 3.9).

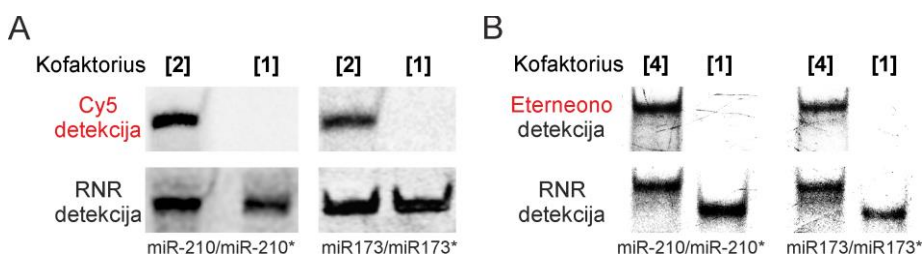
Mūsų sukurtas fermentinis vieno žingsnio žymėjimas remiasi tiesioginiu reporterinės molekulės pernešimu ant mažųjų RNR, panaudojant HEN1 katalizuojamą reakciją. Specialiai šiai technologijai buvo sukurti biotino liekaną šoninėse grandinėse turintys kofaktoriai, leidžiantys greitai ir paprastai biotilinti miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* vos per vieną žingsnį. Analogiškai, kaip ir dviejų žingsnių biotilinimo technologijoje, tiesiogiai vienu žingsniu biotilinta mažoji RNR gali būti ištrauka ar praturtinta, panaudojant streptavidinu dengtas magnetines daleles (Pav.3.9).

3.2.2.1 Dviejų žingsnių žymėjimas fluoroforais

Ląstelių ekstraktuose aptinkami labai nedideli mažųjų RNR kiekiai iš esmės neleidžia šias molekules vizualizuoti klasikiniiais į nukleorūgštis interkaliojančiais dažais, pavyzdžiui, etidžio bromidu ar net žymiai jautresniu Sybr Gold. Be to, šie dažai nėra specifiški būtent mažosioms RNR ir nudažo visas, efektyviausiai dvigrandines nukleorūgštis, įskaitant visų tipų RNR bei DNR molekules (Islam et al., 2007). 5'-galo modifikacija radioaktyviu ^{33}P arba ^{32}P izotopu, panaudojant polinukleotido kinazę, yra pakankamai jautrus, tačiau taip pat mažosioms RNR nespecifiškas metodas, žymintis visas RNR ir DNR molekules (Eastberg et al., 2004). Be to, radioaktyvus žymėjimas ir dažymas etidžio bromidu yra vengtini dėl pavojaus žmogaus sveikatai. Dviejų žingsnių mažųjų RNR žymėjimas fluoroforais, pritaikant HEN1 metiltransferazę, galėtų tapti vienu jautriausių šiuo metu

egzistuojančių metodų ir svarbiausia būtų specifiskas būtent mažosioms RNR bei nebūtų toks pavojingas sveikatai.

Siekiant pademonstruoti, kad miRNR 3'-galas gali būti modifikuotas fluoroforu, naudojant HEN1 metiltransferazę, o taip pat, kad tokiu būdu pažymėta RNR gali būti vizualizuota, dvigrandinis miRNR substratas, miR173/miR173* arba miR-210/miR-210*, buvo inkubuotas su HEN1 metiltransferaze ir Ado-6-amine [2] (Pav. 3.10, A), Ado-6-ethyne [4] (Pav. 3.10, B) arba AdoMet [1] kofaktoriumi (kontrolėi). Antro žingsnio metu su Ado-6-amine inkubuotas mėginys buvo paveiktas Cy5-NHS esteriu, o su Ado-6-ethyne inkubuotas – eterneono azidu (Pav. 3.10, A ir B, atitinkamai). Tokiu būdu Cy5 fluoroforas buvo jungiamas pirminio amino ir NHS esterio cheminės reakcijos pagalba, o eterneono fluoroforas – panaudojant vario (I) katalizuojamą „click-chemistry“ reakciją tarp etino ir azido (Pav 3.5, B). Kaip matome pav. 3.10, mėginiuose, kurie buvo modifikuoti Ado-6-amine [2] kofaktoriumi, gelyje yra stebimas ryškus Cy5 signalas, o mėginiuose, pažymėtuose Ado-6-ethyne [4] kofaktoriumi, – eterneono fluorescencija. Abiem atvejais fluoroforo konjugatai nesijungė prie analogiškų substratų, metilintų nuo AdoMet [1], kas įrodo žymėjimo fluoroforu reakcijos specifiskumą tik atitinkama funkcinė grupė modifikuotam substratui.

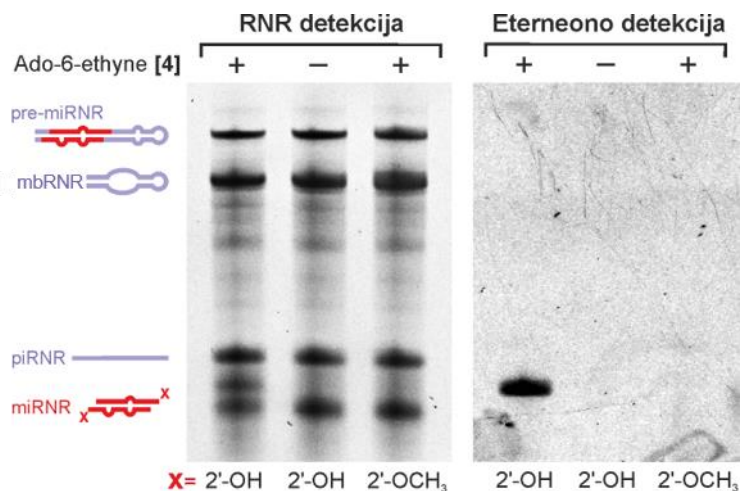


Pav. 3.10. Dviejų žingsnių miRNR/miRNR* žymėjimas fluoroforais. A. miR-210/miR-210* (kairėje) arba miR173/miR173* (dešinėje) buvo modifikuota, naudojant Ado-6-amine [2] arba AdoMet [1], paveikta Cy5-NHS esterio konjugatu ir išanalizuota dPAGE gelyje, vizualizuojant Cy5 fluorescenciją (viršutiniai geliai) ir ³³P-RNR signalą (apatiniai geliai). B. Analogiškas eksperimentas, vietoj Ado-6-amine [2] kofaktoriaus naudojant Ado-6-ethyne [4], o vietoj Cy5-NHS esterio – eterneono azidą.

Galiausiai reikėjo patikrinti, ar miRNR gali būti specifiskai pažymėta mišinyje su kitomis RNR. Šiam tyrimui buvo pasirinktos įvairių tipų, dydžių, sekų bei erdvinių struktūrų sintetinės RNR: 22/21 nt ilgio dvigrandinė subrendusi augalinė miR173/miR173*, turinti 2 nt išsikišimus 3'-galuose (miRNR), 28 nt ilgio viengrandinė gyvūnų piR3 (piRNR), archėjų C/D komplekso 64 nt ilgio dalinai sau komplementari, tačiau turinti didelių nesuporuotų regionų, maža branduolėlio kreipiančioji RNR sR47-A31 (gRNR) bei 102 nt ilgio miR173/miR173* duplekso plaukų segtuko formos miRNR pirmtakas (pre-miRNR). Sudėjus visas RNR į vieną mišinį mėginiai buvo inkubuoti su HEN1 metiltransferaze, mišinyje esant (+) arba nesant (-) Ado-6-ethyne [4] kofaktoriaus (Pav. 3.11, pirmas ir antras abiejų gelių takeliai). Kaip papildoma kontrolė buvo naudojamas tų pačių RNR mišinys, kuriame abiejų miR173/miR173* grandinių 3'-galinių nukleotidų 2'-pozicijos buvo iš anksto chemiskai užblokuotos metilo grupe (Pav. 3.11, trečias abiejų gelių takelis).

Kaip matome iš eksperimento rezultatų, eterneono azido fluorescencija (Pav. 3.11, dešinysis gelio vaizdas) yra stebima tik miR173/miR173* mėginyje, kuris buvo inkubuotas kartu su HEN1 ir Ado-6-ethyne [4] kofaktoriumi, ir kuriame modifikacijai svarbi 2'-OH grupė nebuvo užblokuota. Kaip jau buvo minėta, 2'-OH metiltransferazė yra labai specifiska savo substratams ir jos didžiausias aktyvumas yra stebimas būtent su 21-24 nt dvigrandinėmis RNR, turinčiomis 2 nt ilgio išsikišimus 3'-galuose. Vadinasi eterneono prisijungimas buvo sąlygotas būtent šio fermento katalizuojamo šoninės grandinės nuo kofaktoriaus ant substrato pernešimo, kas ir nulėmė aukštą šios reakcijos specifiskumą būtent miRNR dupleksui. Kitų RNR buvimas mišinyje buvo vizualizuotas nudažius visą gelį etidžio bromido dažų, interkaluojančiu į visų tipų RNR, nepriklausomai nuo jų sekos ar tipo (Pav. 3.11, kairysis gelio vaizdas). Gauti eksperimento rezultatai vaizdžiai parodo, kad sukurta žymėjimo technologija iš tikrųjų pasižymi aukštu specifiskumu

miRNR (ir tikėtina siRNR) tipo mažosioms RNR, apsaugodama nuo kitų tipų santykinai trumpų RNR, įskaitant piRNR ir mbRNR, o taip pat ilgųjų RNR fragmentų bei visų tipų DNR nespecifinio žymėjimo. Ne mažiau įdomus yra faktas, kad sukurtas HEN1 katalizuojamas dviejų žingsnių žymėjimas fluoroforu leidžia diferencijuoti net pilnai subrendusių miRNR (ir siRNR) dupleksus nuo mažųjų RNR pirmtakinių molekulių (pre-miRNR), ko nesugeba daryti kiti šiuo metu egzistuojantys nuo sekos priklausomi mažųjų RNR detekcijos metodai.

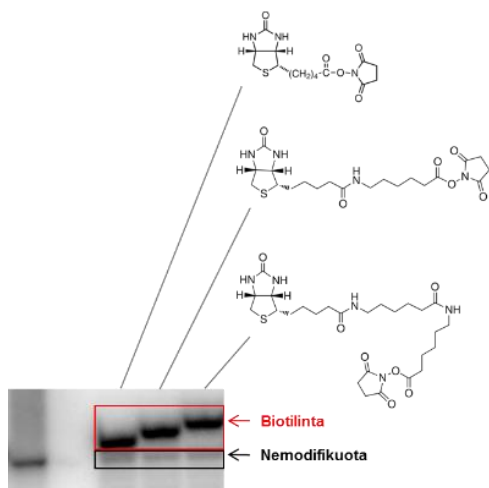


Pav. 3.11. Specifinis dviejų žingsnių miRNR/miRNR* žymėjimas fluoroforu įvairių RNR mišinyje. Nemodifikuotas ($X=2'-OH$) arba pre-metilintas ($X=2'-OCH_3$) augalų miR173/miR173* dupleksas (miRNR, 21/22 nt) buvo inkubuotas su HEN1 metiltransferaze, mėginyje esant (+) arba nesant (-) Ado-6-ethyne kofaktoriui, kartu su kitų tipų RNR: gyvūnų viengrandine piR3 (piRNR, 28 nt), dalinai sau pačiai komplementaria archėjų mažąja branduolėlio kreipiančiąja RNR sR47-A31 (gRNR, 64 nt) ir plaukų segtuko formos miR173/miR173* pirmtakine RNR (pre-miRNR, 102 nt) (bendri elementai paryškinti raudonai). Po modifikacijos mėginiai paveikti su eterneono azidu, išfrakcionuoti dPAGE gelyje ir detektuoti eterneono fluorescenciją (dešinysis gelis), gelis nudažytas etidžio bromidu ir nustatytos visos RNR (kairysis gelis).

3.2.2.2 Dviejų žingsnių žymėjimas biotinu

Technologine prasme ne mažiau svarbus būtų specifinis mažųjų RNR žymėjimas biotinu, skirtas šias molekules ištraukti ar praturtinti. Norint

patikrinti, ar komerciniai biotino konjugatai gali jungtis prie funkcinės grupės, perneštos ant miRNR, miR173/miR173* substratas buvo modifikuotas, panaudojant Ado-6-amine kofaktorių. Kaip buvo parodyta anksčiau (Pav. 3.6), substrato modifikacija siekia praktiškai 100 %. Antro žingsnio metu modifikuotas substratas buvo inkubuotas su įvairiais biotino-N-hidroksisukcinimido (NHS) esterio konjugatais. Pirminio amino grupė, pernešta su šonine grandine ant miR173, turėtų specifiškai sureaguoti su NHS esterių ir taip kovalentiškai prijungti biotino liekaną (Pav. 3.5).



Pav. 3.12. Dviejų žingsnių miR173/miR173* žymėjimas komerciškai prieinamais biotino-NHS esteriais, turinčiais įvairaus ilgio jungtį tarp biotino liekanos ir N-hidroksisukcinimido (NHS) esterio. Kairėje viršuje – biotino N-hidroksisukcinimido esteris; centre – biotino 6-aminokaproinės rūgšties N-hidroksisukcinimido esteris; dešinėje apačioje – biotino amidoheksanoil-6-aminoheksanoinės rūgšties N-hidroksisukcinimido esteris.

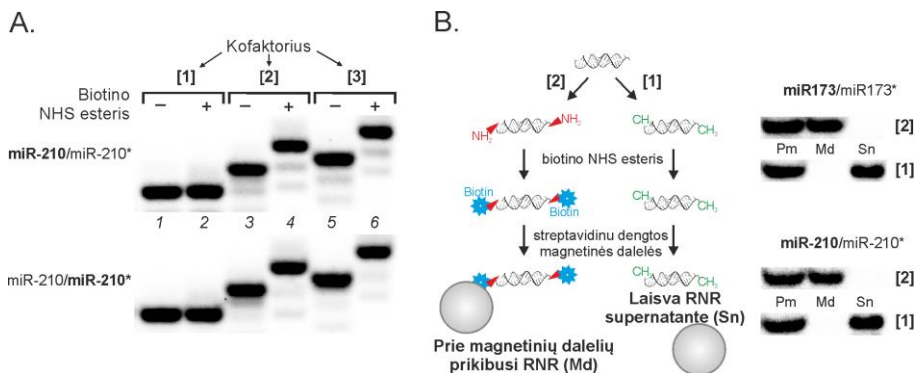
Kaip matome iš mėginio poslinkio dPAGE gelyje, visi trys išbandyti biotino NHS esterio konjugatai, turintys skirtingų ilgio ir erdvinės struktūros jungtį tarp biotino liekanos ir NHS esterio grupės, praktiškai 100 % efektyvumu sureagavo su modifikuota miR173 (Pav. 3.12). Skirtingą orientaciją turinčios ilgesnės jungtys gali būti naudingos sekančiame žingsnyje, optimizuojant biotilintos miRNR sąveikas su streptavidinu dengtomis magnetinėmis dalelėmis, jeigu trumpiausią jungtį turinčios biotino

NHS esterio sąveika su dalelėmis nebūtų efektyvi. Tuo pačiu šis eksperimentas (kartu su dviejų žingsnių žymėjimo fluoroforu eksperimentu) įrodo, kad prie ant substrato perneštos amino grupės gali jungtis įvairios struktūros NHS esterių konjugatai, todėl tikėtina, kad ir kitos komerciškai prieinamos reporterinės molekulės gali būti prijungtos prie miRNR, taikant dviejų žingsnių žymėjimo technologiją.

Sėkmingai atlikus dviejų žingsnių miRNR biotilinimą, reikėjo empiriškai įrodyti, kad kovalentiškai prijungta biotino grupė iš tikrųjų leidžia žymėtą substratą išgryninti, panaudojant magnetines daleles. Eksperimento metu miR-210/miR-210* dupleksas buvo inkubuotas su HEN1, mišinyje esant Ado-6-amine [2], Ado-11-amine [3] arba AdoMet [1] (kontrolėi) kofaktoriui (Pav. 3.13, A). Kiekvienas iš trijų mėginių buvo padalintas į dvi dalis, kurių viena buvo papildomai inkubuota su Biotino NHS-esteriu. Kaip matome abiejų mėginių, kurie buvo modifikuoti šonine grandine, turinčia pirminio amino grupę (Ado-6-amine ir Ado-11-amine), po poveikio biotino NHS-esteriu yra matomas poslinkis dPAGE gelyje (Pav. 3.13, A, lyginant 3 takelį su 4 bei 5 su 6). Tačiau biotino konjugato pridėjimas nedavė jokio efekto substratų, modifikuotų su AdoMet, mobilumui (Pav. 3.13, A, lyginant 1 takelį su 2). Tokiu būdu parodyta, kad NHS esterio, prie kurio prijungtas biotinas, reakcija su funkcine pirminio amino grupe yra specifinė.

Tam, kad patikrinti, ar dviem žingsniais biotilinta miRNR iš tikrųjų gali būti specifiskai išgryninta *in vitro* miR173/miR173* ir miR-210/miR-210* substratai, turintys ³³P-žymėtas kreipiančiasias grandines, buvo inkubuoti su Ado-6-amine [2] (arba AdoMet [1] – kontrolėi) ir HEN1 metiltransferaze (Pav. 3.13, B). Mėginiai buvo inkubuoti su biotino NHS esteriu, o gautas pradinis mėginys (Pm) buvo paveiktas streptavidinu padengtomis magnetinėmis dalelėmis. Atskirus magnetinių dalelių (Md) frakciją nuo supernatanto (Sn), mėginiai išanalizuoti dPAGE metodu. Kaip matome ir miR173, ir miR-210 atveju, pažymėjus substratus Ado-6-amine [2]

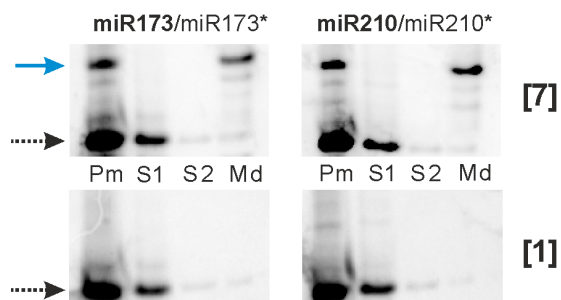
kofaktoriū, tik magnetinių dalelių frakcijos (Md) yra praturtintos miRNR, tuo tarpu supernatante (Sn) mėginys nėra stebimas, t. y. miRNR yra praktiškai pilnai ištraukiama su magnetinių dalelių frakcija. Kontroliniai mėginiai, modifikuoti AdoMet, priešingai – visiškai nesąveikauja su dalelėmis ir išlieka supernatante, vadinasi reakcija iš tikrųjų yra specifinė.



Pav. 3.13. Dviejų žingsnių miRNR/miRNR* biotilinimas ir ištraukimas, naudojant magnetines daleles. A. miR-210/miR-210* su ³³P-žymėta kreipiančiąja miR-210 (viršutinis gelis) arba lydinčiąja miR-210* (apatinis gelis) grandine buvo modifikuota HEN1 ir AdoMet [1] (1 ir 2 takeliai), Ado-6-amine [2] (3 ir 4 takeliai) arba Ado-11-amine [3] (5 ir 6 takeliai). Toliau mėginiai esantys 2, 4 ir 6 takeliuose buvo paveikti biotino-NHS esteriu. B. Dviejų žingsnių mažųjų RNR žymėjimo, naudojant Ado-6-amine [2] ir biotino NHS esterį, ir biotilintos RNR ištraukimo schema (kairėje) ir eksperimentiniai duomenys, tiriant miR173/miR173* (dešinėje, viršutiniai geliai) ir miR-210/miR-210* (dešinėje, apatiniai geliai).

3.2.2.3 Vieno žingsnio žymėjimas biotinu

Vieno žingsnio žymėjimo atveju reporterinė molekulė yra tiesiogiai pernešama su šonine grandine nuo sintetinio kofaktoriaus ant miRNR/miRNR* (arba siRNR/siRNR*) HEN1 metiltransferazės pagalba. Šiai technologijai buvo pritaikytas prof. dr. Viktoro Masevičiaus sukurtas Ado-18-biotin [7] kofaktoriū, tinkamas greitam ir techniškai paprastam mažųjų RNR biotilinimui vos vienos laboratorinės procedūros metu. Toliau biotilinta RNR gali būti išgryninta / praturtinta magnetinėmis dalelėmis, analogiškai, kaip ir dviejų žingsnių žymėjimo biotinu atveju.



Pav. 3.14. Mažųjų RNR vieno žingsnio biotilinimas ir ištraukimas magnetinėmis dalelėmis. Viršuje. miR173/miR173* (kairėje) arba miR-210/miR-210* (dešinėje) buvo inkubuotos su HEN1 ir Ado-18-biotin [7] kofaktoriumi (Pm – pradinis mėginys). Mėginiai buvo paveikti streptavidinu padengtomis magnetinėmis dalelėmis ir magnetinių dalelių frakcija (Md) atskirta nuo inkubacijos supernatanto (S1) ir praplovimo supernatanto (S2) frakcijų. Mėginiai išanalizuoti dPAGE gelyje. Apačioje. miR173/miR173* ir miR-210/miR-210* mėginiai buvo modifikuoti nuo AdoMet [1] kofaktoriaus ir nesąveikauja su magnetinėmis dalelėmis. Mėlyna rodyklė rodo biotilintą miRNR, juoda rodyklė – nemodifikuota arba metilintą miRNR.

Atlikus eksperimentą, paaiškėjo, jog abu tirti substratai, miR173/miR173* ir miR-210/miR-210*, buvo dalinai modifikuoti, naudojant Ado-18-biotin [7] kofaktorių (Pm – pradinis mėginys), kas yra aiškiai matoma iš modifikuotos miRNR poslinkio dPAGE gelyje (Pav. 3.14, „Pm“ takeliai, mėlyna rodyklė pažymėtas mėginys). Toliau paveikus tokį mėginį magnetinėmis dalelėmis, pastebėjome, kad praktiškai visa pažymėta dalis yra efektyviai ištaukiama su magnetinių dalelių (Md) frakcija. Tuo tarpu, biotinu nepažymėta miRNR dalis, lygiai taip pat, kaip ir nuo AdoMet metilinti miRNR nekimba prie magnetinių dalelių ir išlieka supernatante (S1 – reakcijos supernatantas ir S2 – dalelių praplovimo supernatantas), kas parodo šios naujoviškos technologijos aukštą specifiškumo laipsnį tik biotinu pažymėtai mažajai RNR (Pav. 3.14, S1, S2 ir Md takeliai).

Tokiu būdu, HEN1 metiltransferazė buvo sėkmingai pritaikyta miRNR/miRNR ir siRNR/siRNR* alkiliniui, panaudojant sintetinius AdoMet analogus, kas leido sukurti mažųjų RNR specifinio vizualizavimo fluoroforais ir išgryninimo / praturtinimo biotinu technologijas.

3.3 HEN1 taikymas miRNR/DNR žymėjimui

Dvigrandiniai subrendę miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupeksai ląstelėse gyvuoja labai trumpai – iškart po metilinimo HEN1 fermentu viena iš dupeksos grandinių yra įtraukiama į riboproteininius RNR indukuotus nutildymo kompleksus (RISC), kurie apsaugo viengrandinę RNR nuo degradacijos (Zhai et al., 2016). Dėl šios priežasties pagrindinė dalis ląstelėse aptinkamų miRNR ir siRNR yra būtent viengrandinėje būsenoje ir negali būti modifikuojamos metiltransferazės HEN1, kuri yra specifiška dvigrandiniams substratams (Vilkaitis et al., 2010). Šią problemą galima apeiti hibridizuojant miRNR (arba siRNR) su jai komplementaria grandine prieš žymėjimo HEN1 fermentu reakciją. Tuo pačiu komplementaraus zondo naudojimas leidžia nukreipti modifikaciją būtent prieš vieną ar kelias tikslines mažąsias RNR, neliečiant kitas mišinyje esančias RNR.

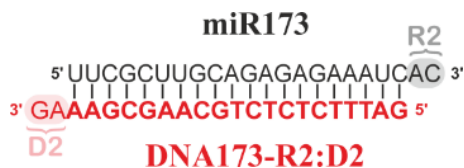
Ankstesniame skyriuje aprašyti tyrimai, naudojant komplementarų RNR zondą, leido pritaikyti HEN1 metiltransferazę specifiniam miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupeksų žymėjimui, panaudojant sintetinius AdoMet kofaktoriaus analogus, ir tokiu būdu sukurti metodus šių mažųjų RNR grynimui ir praturtinimui, pernešant biotino liekaną, o taip pat jų vizualizacijai, prijungiant fluoroforo konjugatą. Vis dėlto šie metodai turėjo keletą apribojimų. RNR sintezė yra santykinai brangi, o pačios RNR molekulės yra nestabilios ląsteliniuose lizatuose dėl juose esančių ribonukleazijų poveikio, kas apsunkina iš ląstelių išgrynintų miRNR ir siRNR *ex vitro* žymėjimą, panaudojant aukščiau aprašytas HEN1-katalizuojamas technologijas. Savo ruožtu DNR molekulės yra nepalyginamai stabilesnės už RNR ir yra mažiau jautrios nukleaziniam poveikiui. Be to, DNR sintezė yra pigesnė ir paprastesnė nei RNR. Galiausiai DNR zondų panaudojimas galėtų leisti sukurti naujas technologijas, pvz., inkorporuojant specifiniams taikiniams giminingus DNR aptamerus ir/arba katalizinėmis savybėmis pasižyminčius DNRzimus ir tokiu būdu ženkliai praplatinti šio metodo

taikymo ribas. Kadangi hibridinės RNR/DNR molekulės tirpale dažnai priima A formos geometriją, kuri taip pat yra būdinga RNR/RNR tipo dupleksams, erdvinė RNR/DNR heteroduolekšų struktūra turėtų būti tinkama HEN1 žymėjimo reakcijoms. Savo ruožtu HEN1 žymėjimo reakcijos nukreipimas ne RNR, bet DNR zondų pagalba galėtų atpiginti bei dar labiau praplėsti mažųjų RNR žymėjimo technologijų panaudojimo ribas. Šiame skyriuje yra aprašyti HEN1 metiltransferazės pritaikymo tyrimai miRNR ir siRNR, hibridizuotų su joms komplementariu DNR zondų, heteroduplekšų žymėjimui.

3.3.1 miRNR/DNR heteroduplekšų su išsikišusiais galais modifikacija

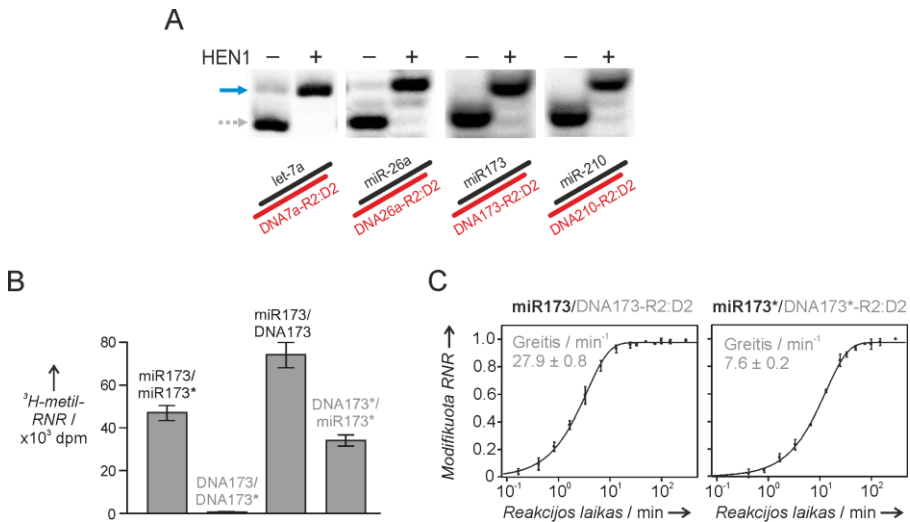
3.3.1.1 miRNR/DNR substratų, turinčių 2 nt išsikišusius 3'-galus, metilinimo tyrimas

Norėdami patikrinti, ar HEN1 kaip substratą sugeba panaudoti hibridinius miRNR/DNR dupleksus, tyrimams sukūrėme kolekciją DNR molekulių, kurios buvo pilnai komplementarios tiriamai RNR, ir turėjo po 2 nt išsikišimus abiejų grandinių 3'-galuose (Pav. 3.15). Tokia DNR buvo numeruojama miRNR, kuriai ji yra komplementari, pavadinimu, pvz., DNA173 yra komplementari miR173, o DNA173* – miR173* grandinei. Priešas „R2“ rodo RNR grandinės 3'-galo 2 nt išsikišimą, o „D2“ – 2 nt išsikišimą DNR grandinėje (Pav. 3.15).



Pav. 3.15. miR173/DNA173-R2:D2 – RNR/DNR heteroduplekso, turinčio 2 nt RNR grandinės 3'-išsikišimą (R2) ir 2 nt DNR grandinės 3'-išsikišimą (D2), pavyzdys.

Ištyrus miRNR/DNR metilinimo reakciją su AdoMet kofaktoriumi, nustatėme, kad miRNR grandinė (let-7a, miR-26a, miR173 arba miR-210), esanti miRNR/DNR heteroduplekse, buvo metilinta praktiškai 100 % efektyvumu visų tirtų substratų atvejais, kas yra matoma iš sumažėjusio mėginių mobilumo dPAGE gelyje (Pav. 3.16, A).



Pav. 3.16. miRNR/DNR substratų, turinčių 2 nt 3'-išsikišimus, HEN1 katalizuojamo metilinimo tyrimas. A. miRNR/DNR substratų (let-7a, miR-26a, miR173 ir miR-210, sudarytų su komplementaria DNR) metilinimo HEN1 fermentu analizė poslinkio dPAGE gelyje metodu. B. Tričio (^3H) izotopą turinčios metilo grupės pernašos ant miRNR/miRNR* (miR173/miR173*), miRNR/DNR (miR173/DNA173-R2:D2 ir miR173*/DNA173*-R2:D2) ir DNR/DNR (DNA173-R2:D2 /DNA173*-R2:D2) eksperimentas. Po inkubacijos su HEN1 ir [metil- ^3H]-AdoMet kofaktoriumi, dvigrandinis substratas užneštas ant filtrinio popieriaus. Susigėrus mėginiui, filtras buvo praplautas nuo laisvo [metil- ^3H]-AdoMet ir scintiliatoriumi išmatuotas prie filtro prikibusio substrato tričio aktyvumas, atspindintis HEN1 ant substrato perneštą metilo grupių kiekį. C. miRNR/DNR metilinimo greičio, esant vienos apšukos sąlygoms, kinetinė analizė.

Atlikta tričiu žymėtų metilo grupių pernešimo nuo [metil- ^3H]-AdoMet kofaktoriaus analizė taip pat parodė, kad dupleksai turintys abi RNR grandinės (miR173/miR173*) arba vieną RNR grandinę, sudaryta su komplementaria DNR (miR173/DNA173-R2:D2 ir miR173*/DNA173*-R2:D2) yra metilinami HEN1 fermento, tačiau dupleksas iš dviejų DNR grandinių nėra

modifikuojamas (Pav. 3.16, B). Analogiškai HPLC-MS analizėje buvo nustatyti metilinti RNR grandinės 3'-galinių ribonukleozidų dariniai, tačiau nebuvo aptikta jokių deoksiribonukleozidų iš DNR grandinės modifikacijos požymių (Pav. 3.18). Visi šie duomenys įrodo, kad RNR grandinė yra metilinama HEN1 fermento, kuomet ji yra sulydyta su komplementariu DNR zonu (kuris savo ruožtu nėra modifikuojamas).

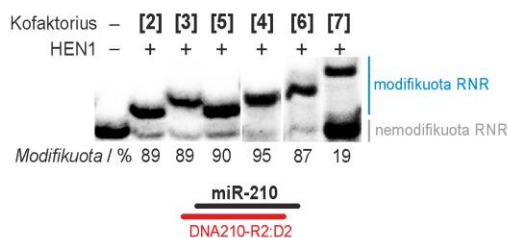
Norėdami dar detaliau ištirti miRNR/DNR duplexų metilinimą, atlikome kinetinius tyrimus vienos apsukos sąlygomis, t. y., esant HEN1 pertekliui tiriamojo substrato atžvilgiu. Tokiu būdu galėtume kiekybiškai palyginti metilo grupės pernešimo greitį ant natūralių miRNR/miRNR* ir HEN1 fermentui netipinių miRNR/DNR substratų.

Kaip buvo rašyta skyriuje 3.1.1, paprastai metilo grupės pernešimo priklausomybės nuo reakcijos laiko grafikas turi dvi kinetines fazes. Greitoji fazė atspindi tiesioginį šios grandinės susirišimo ir metilinimo greitį, o lėtoji fazė rodo susirišimą priešinga orientacija metilinant kitą grandinę su toliau sekančiu kompleksu persiorientavimu, tinkamu tiriamos grandinės metilinimui. Tačiau miRNR/DNR substratų metilinimo atveju stebima vienos eksponentės kinetika (Pav. 3.16, C). Tai galėtų būti paaiškinama tuo, kad HEN1 turėtų silpnai sąveikauti su DNR grandine, rezultate fermentas rišasi prie miRNR/DNR substrato praktiškai tik vienoje orientacijoje, būtent toje, kuri yra palanki miRNR grandinės metilinimui, kuomet metiltransferaziniame HEN1 domene iškart atsiduria ne DNR, bet miRNR grandinės 3'-galas. Netikėtai nustatyta, kad metilinimo HEN1 fermentu greičiai miR173/DNA173-R2:D2 bei miR173*/DNA173*-R2:D2 atvejais buvo panašūs į tipinio miR173/miR173* substrato atskirų grandinių metilinimo greičius arba buvo net didesni už juos, kas rodo, kad DNR grandinė netrukdo komplementarios miRNR grandinės modifikacijai (Pav. 3.16, C, Lentelė 3.4).

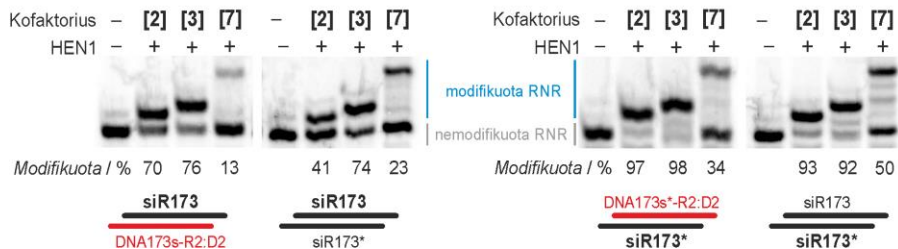
3.3.1.2 miRNR/DNR substratų, turinčių 2 nt išsikišusius 3'-galus, alkilinimo tyrimas

Galiausiai buvo pereita prie miRNR/DNR modifikacijos tyrimo, naudojant sintetinius kofaktorius: pirminį aminą turinčius Ado-6-amine [2] ir Ado-11-amine [3], „click“ cheminiam jungimui tinkančius Ado-6-azide [4] ir Ado-6-ethyne [5] bei biotino žymę turinčius Ado-13-biotin [6] ir Ado-18-biotin [7]. Atlikus modifikacijos reakcijas ir išanalizavus mėginius dPAGE gelyje, paaiškėjo, jog visi tirti RNR/DNR substratai yra alkilinami, o modifikacijos efektyvumas siekė 70-95 % su kofaktoriais [2-6] (Ado-6-amine, Ado-11-amine, Ado-6-ethyne, Ado-6-azide ir Ado-13-biotin) (Pav. 3.17).

A

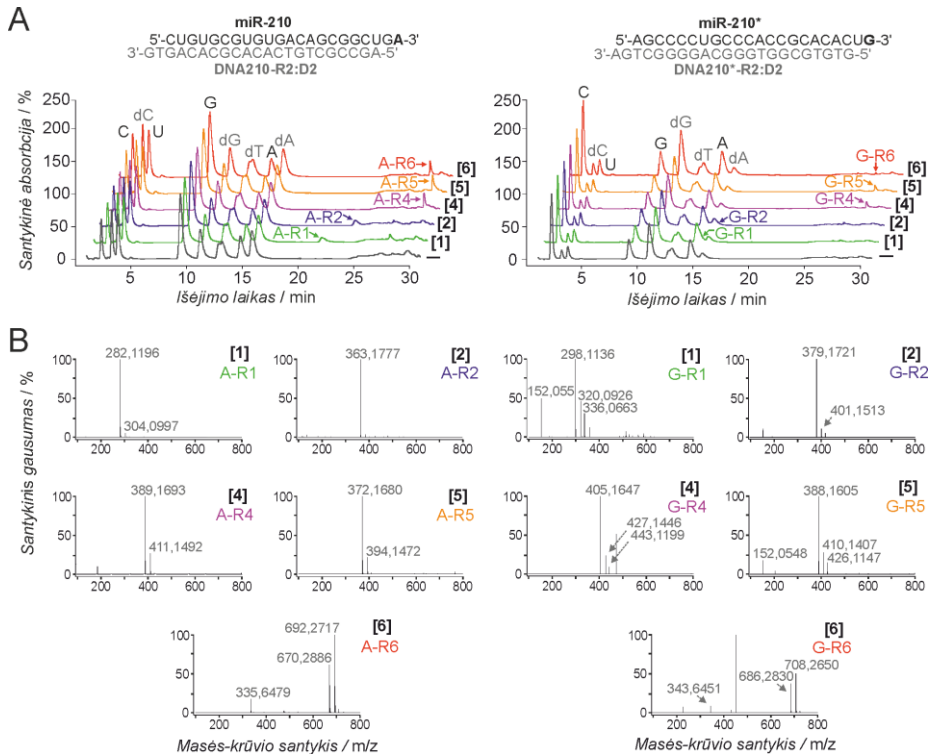


B



Pav. 3.17. RNR/DNR substratų, turinčių 2 nt išsikišimus, alkilinimas. A. miR-210/DNA210-R2:D2 alkilinimas, naudojant (iš kairės į dešinę) Ado-6-amine [2], Ado-11-amine [3], Ado-6-ethyne [5], Ado-6-azide [4], Ado-13-biotin [6] ir Ado-18-biotin [7] kofaktorius. B. (Kairėje) siR173 alkilinimas duplekse su DNR (pirmas blokas) arba RNR (antras blokas) ir (dešinėje) siR173* alkilinimas duplekse su DNR (trečias blokas) arba RNR (ketvirtas blokas), naudojant Ado-6-amine [2], Ado-11-amine [3] ir Ado-18-biotin [7] kofaktorius. Modifikuoto substrato dalis nurodyta procentais po gelių vaizdais.

Vienintelis Ado-18-biotin [7] esamomis sąlygomis pasižymėjo mažesniu modifikacijos efektyvumu (19-34 % miRNR/DNR atveju ir 23-50 % miRNR/miRNR* atveju), nors tikėtina, kad ir su šiuo kofaktoriumi modifikacijos efektyvumas gali būti pagerintas optimizuojant sąlygas, pvz., ilginant inkubacijos laiką ir didinant kofaktoriaus koncentraciją.



Pav. 3.18. RNR/DNR alkilavimo HPLC-MS analizė. A. Su DNR sulydyto ir alkilinto miR-210 (kairėje) ir miR-210* (dešinėje) heteroduplekso nukleozidų atvirkštinės fazės HPLC analizė. Po inkubacijos su AdoMet [1], Ado-6-amine [2], Ado-6-azide [4], Ado-6-ethyne [5] arba Ado-13-biotin [6] ir HEN1 arba be jo (-), mėginiai buvo sudegraduoti P1 nukleaze ir defosforilinti FastAP šarminė fosfataze iki atskirų nukleozidų bei išanalizuoti HPLC chromatografijos metodu. B. Kofaktoriui specifinių smailių (A-R ir G-R) spektrogramos. Unikalioms smailėms, kurių buvimas priklausė nuo įdėto substrato ir kofaktoriaus, buvo išanalizuotos masės spektrometru. Smailės, virš kurių nurodytos jų skaitinės reikšmės, buvo identifikuotos, kaip ieškomo junginio masės-krūvio (m/z) signalai. Žiūrėkite ieškotų ir identifikuotų junginių sąrašą lentelėje 3.4.

Norėdami papildomai įrodyti, kad ant tiriamų substratų pernešamos šoninės grandinės, ir kad jos pernešamos būtent ant 3'-galinio RNR nukleozido, atlikome HPLC-MS tyrimus (Pav. 3.18). Po miR-210/DNA210-R2:D2 ir miR-210*/DNA210-R2:D2 inkubacijos su HEN1 ir AdoMet [1], Ado-6-amine [2], Ado-6-azide [4], Ado-6-ethyne [5] arba Ado-13-biotin [6] mėginiai buvo sudegraduoti iki atskirų nukleozidų, o gauti mišiniai išanalizuoti HPLC-MS metodu. Visuose mėginiuose buvo identifikuoti visų keturių tipų ribonukleozidai (C, U, G ir A) bei visų keturių tipų deoksiribonukleozidai (dC, dT, dG ir dA) (Pav. 3.18, A). Mėginių, į kuriuos buvo pridėtas tam tikras kofaktorius, chromatogramose buvo stebima papildoma smailė, kurios išėjimo laikas varijavo, priklausomai nuo kofaktoriaus ir 3'-galinio nukleozido cheminės prigimties (nuo A-R1 iki A-R6 arba nuo G-R1 iki G-R6). Nustatyta, jog miR-210/DNA210-R2:D2 substrato atveju analizuojamuose mėginiuose buvo aptikti atitinkama šonine grandine (R1-R6) modifikuoto adenzino dariniai (nuo A-R1 iki A-R6), o miR-210*/DNA210*-R2:D2 atveju – modifikuoto guanozino dariniai (nuo G-R1 iki G-R6) (Pav. 3.18, B, lentelė 3.4).

Būtent adenzinas randasi kreipiančiosios miR-210 grandinės 3'-gale, tuo tarpu guanozinas yra lydinčiosios miR-210* grandinės 3'-galinis nukleozidas (Pav. 3.18, A, žr. substratų sekas). Atskiruose mėginiuose papildomai buvo rasti ribozės, modifikuotos atitinkama šonine grandine, liekanos, kurių išėjimo chromatogramoje laikai sutapdavo su atitinkamai modifikuoto adenzino arba guanozino išėjimo laikais (lentelė 3.4). Visi šie duomenys leidžia teigti, jog tirtuose RNR/DNR duplesuose iš tiesų yra modifikuojama RNR grandinės 3'-galinio nukleozido ribozė, ant kurios yra pernešamos šoninės grandinės nuo visų tirtų sintetinių kofaktorių.

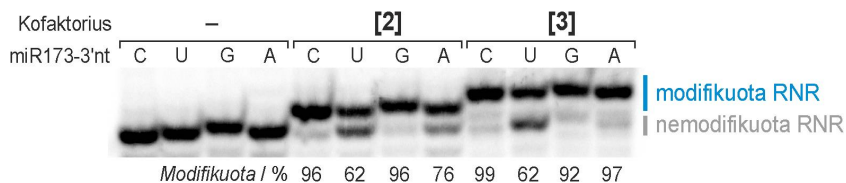
Lentelė 3.4. Alkilintų miR-210 ir miR-210* grandinių 3'-galinių nukleotidų MS analizės kofaktoriui specifinėse smailėse duomenys.

Substratas	Sintetinis kofaktorius	Junginys	Formulė	Apskaičiuot. m/z	Nustatyt. m/z
miR-210(A) DN.A210-R2:D2	AdoMet	[Ado-CH ₃ + H] ⁺	[C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄] ⁺	282.1197	282.1196
		[Ado-CH ₃ + Na] ⁺	[C ₁₁ H ₁₄ N ₅ O ₄ Na] ⁺	304.1016	304.0997
	Ado-6-amine	[Ado-6-NH ₂ + H] ⁺	[C ₁₆ H ₂₂ N ₆ O ₄] ⁺	363.1776	363.1777
	Ado-6-azide	[Ado-6-N ₃ + H] ⁺	[C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₄] ⁺	389.1681	389.1693
		[Ado-6-N ₃ + Na] ⁺	[C ₁₆ H ₁₉ N ₄ O ₄ Na] ⁺	411.1500	411.1492
	Ado-6-ethyne	[Ado-6-C ₂ + H] ⁺	[C ₁₈ H ₂₀ N ₅ O ₄] ⁺	372.1667	372.1680
		[Ado-6-C ₂ + Na] ⁺	[C ₁₈ H ₁₉ N ₅ O ₄ Na] ⁺	394.1486	394.1472
	Ado-13-biotin	[Ado-13-Biotin + Na] ⁺	[C ₂₉ H ₃₈ N ₁₁ O ₆ SNa] ⁺	692.2697	692.2717
		[Ado-13-Biotin + H] ⁺	[C ₂₉ H ₃₉ N ₁₁ O ₆ S] ⁺	670.2878	670.2886
		[Ado-13-Biotin + 2H] ⁺²	[C ₂₉ H ₄₀ N ₁₁ O ₆ S] ⁺²	335.6476	335.6479
miR-210*(G) DN.A210*-R2:D2	AdoMet	[Guo-CH ₃ + H] ⁺	[C ₁₁ H ₁₃ N ₅ O ₃] ⁺	298.1146	298.1136
		[Guo-CH ₃ + Na] ⁺	[C ₁₁ H ₁₄ N ₅ O ₃ Na] ⁺	320.0965	320.0926
		[Guo-CH ₃ + K] ⁺	[C ₁₁ H ₁₄ N ₅ O ₃ K] ⁺	336.0705	336.0663
		[Gua + H] ⁺	[C ₅ H ₅ N ₃ O] ⁺	152.0567	152.0550
	Ado-6-amine	[Guo-6-NH ₂ + H] ⁺	[C ₁₆ H ₂₂ N ₆ O ₃] ⁺	379.1725	379.1721
		[Guo-6-NH ₂ + Na] ⁺	[C ₁₆ H ₂₁ N ₆ O ₃ Na] ⁺	401.1544	401.1513
	Ado-6-azide	[Guo-6-N ₃ + H] ⁺	[C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃] ⁺	405.1637	405.1647
		[Guo-6-N ₃ + Na] ⁺	[C ₁₆ H ₁₉ N ₄ O ₃ Na] ⁺	427.1449	427.1446
		[Guo-6-N ₃ + K] ⁺	[C ₁₆ H ₁₉ N ₄ O ₃ K] ⁺	443.1189	443.1199
	Ado-6-ethyne	[Guo-6-C ₂ + H] ⁺	[C ₁₈ H ₂₁ N ₅ O ₃] ⁺	388.1616	388.1605
		[Guo-6-C ₂ + Na] ⁺	[C ₁₈ H ₂₀ N ₅ O ₃ Na] ⁺	410.1435	410.1407
		[Guo-6-C ₂ + K] ⁺	[C ₁₈ H ₂₀ N ₅ O ₃ K] ⁺	426.1175	426.1147
		[Gua + H] ⁺	[C ₅ H ₅ N ₃ O] ⁺	152.0567	152.0548
	Ado-13-biotin	[Guo-13-Biotin + H] ⁺	[C ₂₉ H ₃₉ N ₁₁ O ₇ S] ⁺	686.2828	686.2830
		[Guo-13-Biotin + Na] ⁺	[C ₂₉ H ₃₈ N ₁₁ O ₇ SNa] ⁺	708.2647	708.2650
		[Guo-13-Biotin + 2H] ⁺²	[C ₂₉ H ₄₀ N ₁₁ O ₇ S] ⁺²	343.6451	343.6451

3.3.1.3 miRNR/DNR substratų, turinčių skirtingas 3'-galines bazes, alkilimo tyrimas

Norint sėkmingai pritaikyti HEN1 metiltransferazę mažųjų RNR žymėjimui, būtina, kad fermentas efektyviai modifikuotų visus keturis galimus 3'-galinių nukleozidų variantus (C, U, G ir A). Ankstesniuose eksperimentuose jau buvo parodyta, kad *in vitro* HEN1 gali modifikuoti G, esantį miR173*, miR-210* ir siR173* grandinėse, taip pat C, esantį miR173 ir siR173 grandinėse bei A, esantį miR-210 grandinėje, vienodai sėkmingai pernešant šonines grandines, kaip nuo natūralaus AdoMet kofaktoriaus, taip ir nuo jo sintetinių analogų ant miRNR/miRNR* substratų. Norėdami daugiau

išsiaiškinti 3'-galinio nukleozido heterociklinės bazės modifikacijai daromą įtaką, buvo ištirtas HEN1 vykdomo alkilinimo efektyvumas su miR173/DNA173-R2:D2 substratais, kuriuose miR173 grandinė turi keturis skirtingus 3'-galinių heterociklinių bazių variantus.



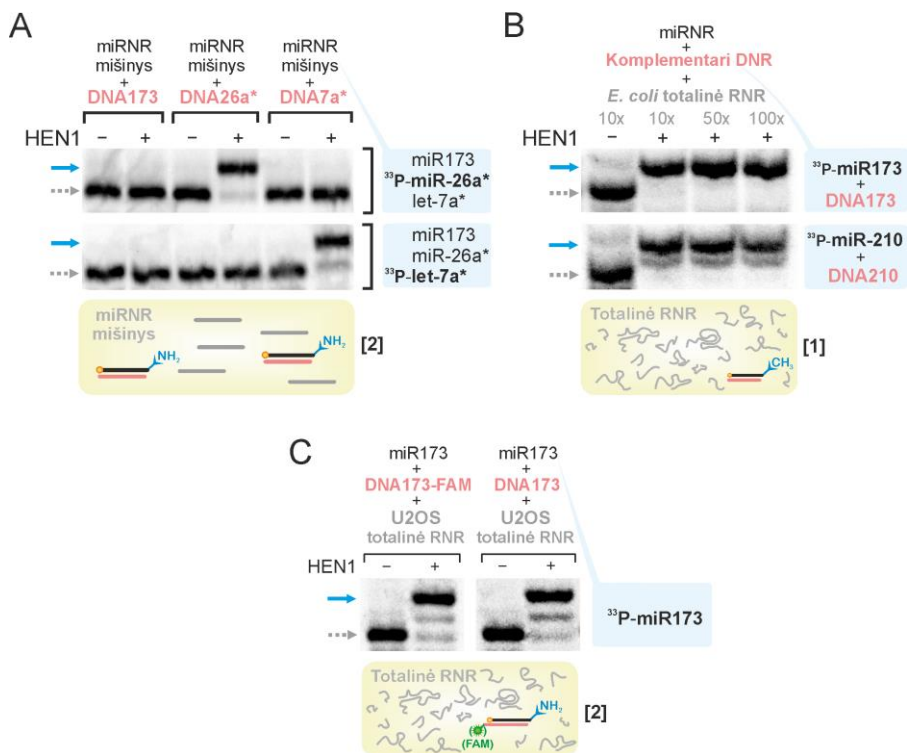
Pav. 3.19. miR173, turinčios 3'-galinį C, U, G arba A, sulydytos su DNA173-R2:D2, alkilinimas, naudojant Ado-6-amine [2] ir Ado-11-amine [3] kofaktorius.

Paaikškėjo, jog visi keturi miR173 variantai yra alkilinami, naudojant Ado-6-amine [2] ir Ado-11-amine [3] kofaktorius (Pav. 3.19). Substratai, 3'-galuose turintys C ir G buvo modifikuojami efektyviausiai (modifikuota 92-99%), panašiai buvo modifikuojamas ir A turintis substratas (modifikuota 76-97%), kiek prasčiau už kitus buvo alkilinamas U (modifikuota 62%). Vis dėlto visi keturi terminaliniai nukleozidai modifikuojami pakankamai efektyviai, kad kuriamas metodas galėtų būti pritaikytas įvairių rūšių bei izoformų mažųjų RNR žymėjimui.

3.3.1.4 miRNR/DNR substratų alkilinimo įvairių RNR mišinyje tyrimas

Norėdami pademonstruoti, kad DNR zondas gali specifiskai nukreipti mažųjų RNR žymėjimo reakciją, buvo sulydyti reakcijos mišiniai, sudaryti iš trijų skirtingų miRNR (miR173, miR-26a* ir let-7a*) ir vieno iš trijų galimų DNR zondų (DNA173, DNA26a* arba DNA7a*) (Pav. 3.20, A). Kiekviename mišinyje tik viena iš trijų miRNR, kuri buvo pažymėta ³³P izotopu (miR-26a* viršutiniame gelyje arba let-7a* apatiniame gelyje), buvo stebima dPAGE gelyje. Eksperimentas parodė, kad miR-26a* taikinio RNR buvo modifikuota, inkubuojant su HEN1 ir Ado-6-amine [2], tik tuo atveju,

kai į trijų RNR mišinių buvo pridėtas jai komplementarus DNA26a* zondas. Atitinkamai, let-7a* alkilinimas įvyko tik tuo atveju, kai į mišinį buvo pridėtas jai komplementarus DNA7a* zondas. Abiem atvejais taikinio miRNR alkilinimas buvo praktiškai pilnas, tuo tarpu likusios mišinyje buvusios dvi miRNR nebuvo modifikuojamos. Vadinasi, būtent komplementarus DNR zondas, susilydydamas su taikinio miRNR, nukreipė HEN1 modifikaciją prieš ją, kas atveria galimybes kontroliuoti, kuri iš mišinyje esančių miRNR bus selektyviai pažymėta.



Pav. 3.20. miRNR/DNR substratų alkilinimas kitų RNR mišinyje. A. Mišinys, sudarytas iš miR173, miR-26a* ir let-7a*, kuriame tik miR-26a* (viršuje) arba let-7a* (apačioje) buvo ³³P-žymėta, sulydytas su DNA173, DNA26a* arba DNA7a*, modifikuotas Ado-6-amine [2] ir išanalizuotas dPAGE. B. miR173 (viršuje) arba miR-210 (apačioje) buvo sulydytas su DNA173-R2:D2 arba DNA210-R2:D2, atitinkamai, modifikuotas AdoMet [1] ir išanalizuotas dPAGE. C. miR173 buvo sulydyta su DNA173-R2:D2 (kairėje) arba DNA173-R2:D2-FAM (dešinėje), modifikuota Ado-6-amine [2] ir išanalizuota dPAGE.

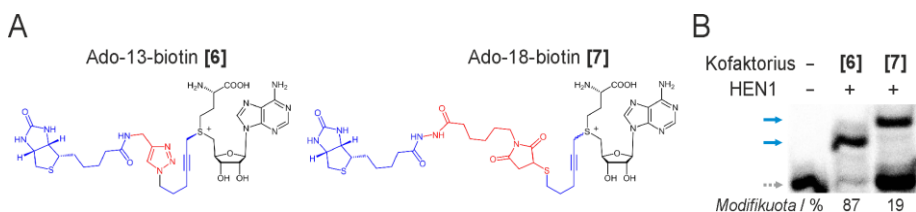
Galiausiai buvo svarbu iširti, ar HEN1 katalizuojamas ir DNR zondo nukreipiamas žymėjimas gali vykti kompleksiniuose RNR preparatuose ir ar kitų tipų RNR buvimas netrukdyt šiai reakcijai. Eksperimento metu augalų miR173 arba žmogaus miR-210 buvo sulydyta su komplementariu DNR zonu, mišinyje esant *E. coli* bakterijų totalinės RNR frakcijos 10-100-kartiniam pertekliui. Po inkubacijos su HEN1 ir AdoMet mėginiai buvo išanalizuoti denatūruojančiame gelyje (Pav. 3.20, B).

Kadangi bakterijos tikėtina neturi į miR173 ar miR-210 pakankamo panašumo sekų, *E. coli* totalinė RNR neturėtų hibridizuotis su jomis ar joms komplementariais DNR zondais. Pagal savo struktūrą absoliuti dauguma bakterijų RNR taipogi neturėtų būti tinkamos sąveikai ir su metiltransferaze HEN1. Vadinasi, net *E. coli* totalinės RNR perteklius neturi daryti įtakos HEN1 katalizuojamo metilinimo reakcijai. Ir iš tiesų nei miR173, nei miR-210 atveju net 100-kartinis bakterinės totalinės RNR perteklius nesutrukdė taikinio miRNR modifikacijai (Pav. 3.20, B). Panašus eksperimentas buvo atliktas su augalų miR173, jai komplementariu DNR zonu ir žmogaus kaulų osteosarkomos epitelinių ląstelių linijos U2OS totalinės RNR 10-kartiniu pertekliumi, modifikuojant taikinio RNR šonine grandine nuo Ado-6-amine [2] kofaktoriaus. Kaip paaiškėjo, totalinė U2SO RNR reakcijai netrukdė, ir taikinio miR173 buvo labai efektyvus (Pav. 3.20, C). Įdomu pastebėti, kad miR173 modifikacija mišinyje su totaline U2OS RNR buvo praktiškai pilna net tokio miRNR/DNR substrato atveju, kurio DNR grandinės 3'-gale buvo kovalentiškai prijungtas FAM fluoroforas.

3.3.1.5 miRNR žymėjimo biotinu technologijos ir jų panaudojimas

Ankstesniuose skyriuose 3.2.2.2 ir 3.2.2.3 buvo aprašytos miRNR/miRNR* atitinkamai vieno ir dviejų žingsnių žymėjimo biotinu technologijos su tolimesniu biotilinto substrato ištraukimu / praturtinimu streptavidinu dengtomis magnetinėmis dalelėmis. Primintina, kad

miRNR/miRNR* žymėjimo tyrimu metu pavyko pasiekti praktiškai 100 % dviejų stadijų biotilinimą, iš pradžių HEN1 pagalba ant substrato pernešant amino grupę turinčią šonine grandinę nuo Ado-6-amine [2] arba Ado-11-amine [3], su toliau sekančia chemine reakcija naudojant vieną iš komerciškai prieinamų biotin-NHS esterių (Pav. 3.12 ir 3.13). Tačiau vieno žingsnio biotilinimas, naudojant Ado-18-biotin [7], nors ir vyko, bet buvo mažai efektyvus (Pav. 3.14). Norėdami išspręsti šią problemą, vykdant miRNR/DNR žymėjimus, panaudojome prof. dr. Viktoro Masevičiaus sukurtą kitokią cheminę struktūrą turintį mažesnės molekulinės masės Ado-13-biotin [6] kofaktorių (Pav. 3.21, A).

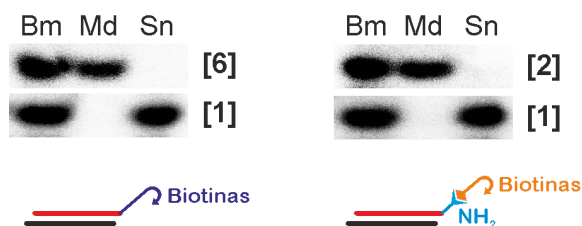


Pav. 3.21. Reporterinę biotino grupę turinčių kofaktorių palyginimas. A. Ado-13-biotin [6] ir Ado-18-biotin [7] struktūrinės formulės. B. miR-210/DNA210-R2:D2 vieno žingsnio žymėjimas, naudojant Ado-13-biotin [6] ir Ado-18-biotin [7] sintetinius AdoMet analogus. Apačioje po geliu nurodytas žymėjimo reakcijos efektyvumas procentais.

Atlikus palyginamąją miR-210/DNA210-R2:D2 žymėjimo analizę, pamatėme, jog naujas vieno žingsnio biotilinimui tinkantis kofaktorių iš tikrųjų pasižymi ženkliai geresniu modifikavimo HEN1 metiltransferazės pagalba efektyvumu, sulyginamu su trumpesnes funkcines grupes turinčiais sintetiniais kofaktoriais (Pav. 3.21, B).

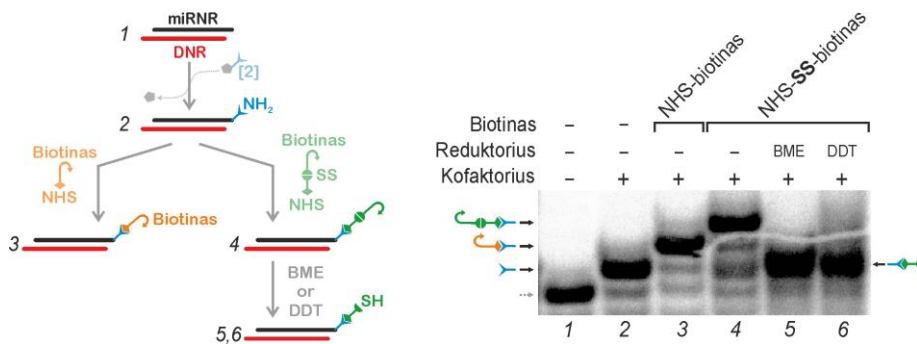
Tolimesniems miRNR/DNR tyrimams buvo naudotas žymėjimo reakcijose efektyvesnis Ado-13-biotin [6] kofaktorių. Norėdami patikrinti miRNR/DNR mėginio ištraukimo/praturtinimo po biotilinimo stadijos efektyvumą miR-210/DNA210-R2:D2 substratas buvo pažymėtas Ado-13-biotin [6] kofaktorių, taikant vieno žingsnio žymėjimo technologiją (Pav. 3.22, kairėje) arba Ado-6-amine [2] kofaktorių su tolimesniu biotin-NHS

esterio prijungimu, taikant dviejų žingsnių žymėjimo technologiją (Pav. 3.22, dešinėje). Abu mėginiai beveik 100-procentiniu efektyvumu rišosi prie streptavidinu padengtu magnetinių dalelių (Md) ir buvo pilnai ištraukti iš supernatanto frakcijos (Sn). Priešingai, kontroliniuose AdoMet [1] modifikuotuose mėginiuose visas substratas išliko supernatanto frakcijoje, vadinasi ir vieno, ir dviejų žingsnių biotilinimas vyksta ne tik efektyviai, bet ir specifiškai.



Pav. 3.22. Vienu ir dviem žingsniais biotilinto RNR/DNR substrato ištraukimas magnetinėmis dalelėmis. Kairėje: po miR-210/DNA210-R2:D2 inkubacijos su HEN1 ir Ado-13-biotin [6] (biotilintas mėginys – Bm) arba AdoMet [1], mėginiai buvo paveikti magnetinėmis dalelėmis ir jų frakcija (Md) atskirta nuo supernatanto (Sn). Dešinėje: po miR-210/DNA210-R2:D2 inkubacijos su HEN1 ir Ado-6-amine [2] arba AdoMet [1], mėginiai buvo paveikti biotino NHS esteriu ir išfrakcionuoti magnetinėmis dalelėmis.

Norėdami praplėsti dviejų žingsnių žymėjimo biotinu metodo panaudojimo ribas, nusprendėme išbandyti biotino-SS-NHS esterio konjugatą, kurio biotino liekana gali būti nuimta redukuojant konjugatą beta-merkaptetanoliu (BME) arba ditiotreitolu (DDT). Pažymėjus tiriamą miRNR Ado-6-amine [2] ir paveikus biotino-SS-NHS esteriu, susidaro miRNR-6-amido-SS-biotino produktas. Redukuojančių agentų poveikyje disulfidinis (SS) tiltelis miRNR-6-amido-SS-biotino junginyje redukuojasi, susidarant miRNR-6-amido-SH ir laisvam biotino-SH junginiui, tokiu būdu, nuimant biotino liekaną nuo modifikuoto miRNR substrato (Pav. 3.23, žr. schemą kairėje).



Pav. 3.23. miRNR/DNR dviejų žingsnių biotilinimo schema (kairėje) ir dPAGE rezultatai (dešinėje). miR-210/DNA210-R2:D2 (1) buvo modifikuota nuo Ado-6-amine [2] kofaktoriaus (2) ir inkubuota su biotin-NHS esteriu (3) arba biotin-SS-NHS esteriu (4). Pastarasis mėginys buvo paveiktas BME (5) arba DDT (6) redukuojančiais agentais ir visi mėginiai išanalizuoti dPAGE metodu.

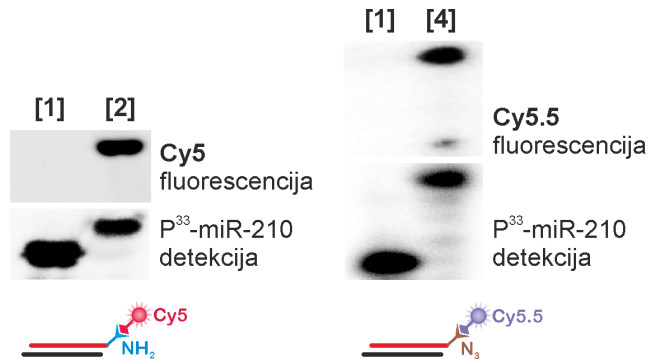
Eksperimento metu miR-210/DNA210-R2:D2 substratas (1 takelis) buvo efektyviai modifikuotas HEN1 ir Ado-6-amine [2] (2 takelis) (Pav. 3.23, žr. gelio vaizdą dešinėje). Gautas mėginys buvo inkubuotas su biotino-NHS esteriu (3 takelis) arba biotino-SS-NHS esteriu (4 takelis), kuriais efektyviai pasižymėjo. Galiausiai į mėginį, pažymėtą biotino-SS-NHS esteriu, buvo pridėtas BME (5 takelis) arba DDT (6 takelis), ko rezultate biotino-SH liekana buvo efektyviai nuimta nuo modifikuotos miR-210 (Pav. 3.23).

Toks žymėjimo būdas suteikia dar daugiau galimybių *in vitro* manipuliacijoms: dviejų žingsnių biotilinimo metodu pažymėjus tikslią mažąją RNR biotino-SS-NHS esterio konjugatą, prie magnetinių dalelių prikibęs substratas gali būti švelniomis sąlygomis lengvai nuimtas redukuojančiais agentais, o pašalinta biotino liekana netrukdyt tolimesniems eksperimentams.

3.3.1.6 miRNR žymėjimo fluoroforais technologijos ir jų panaudojimas

miRNR/DNR duplesų žymėjimas fluoroforais taip pat buvo sėkmingas. miR-210/DNA210-R2:D2 buvo modifikuota Ado-6-amine [2] kofaktoriumi su vėlesniu Cy5-NHS esterio prijungimu (Pav. 3.24, kairėje)

arba modifikuota Ado-6-azide [4] kofaktoriumi, prie kurio šoninės grandinės „click“ cheminės reakcijos būdu buvo prijungtas Cy5.5-ethyne fluoroforo konjugatas (Pav. 3.24, dešinėje; cheminių reakcijų paaiškinimui žr. Pav. 3.5, B). Abiem atvejais žymėjimas buvo ypač efektyvus: tai matosi iš ^{33}P -miR-210 juostelės ženklau poslinkio apatiniuose gelių vaizduose ir ryškios abiejų fluoroforų (Cy5 arba Cy5.5) fluorescencijos viršutiniuose gelių vaizduose.



Pav. 3.24. miRNR/DNR dviejų žingsnių žymėjimas fluoroforais. ^{33}P -miR-210/DNA210/-R2:D2 mėginiai buvo modifikuoti, atitinkamai, AdoMet [1] ir Ado-6-amine [2] (kairėje) arba AdoMet [1] ir Ado-6-azide [4] (dešinėje). Kairėje matomi mėginiai buvo inkubuoti su Cy5-NHS esteriu, dešinėje stebimi – su Cy5.5-ethyne fluoroforto konjugatu. Mėginiai išfrakcionuoti dPAGE gelyje. Cy5 arba Cy5.5 fluoroforo bei ^{33}P izotopo signalai buvo detektuoti FujiFilm FLA-5100 aparatu.

3.3.2 Netipinės struktūros miRNR/DNR heterodupleksų žymėjimas

3.3.2.1 miRNR/DNR substratų, turinčių bukų galus, metilinimo tyrimas

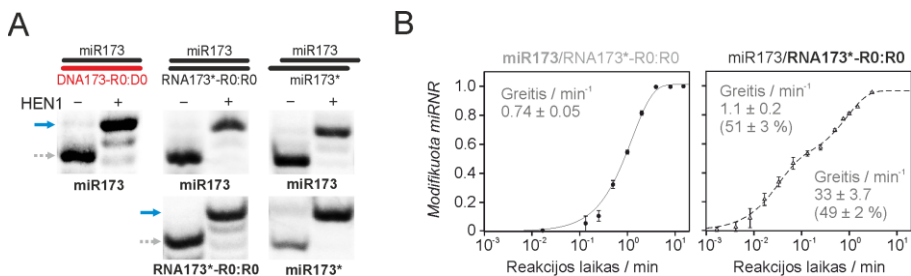
Tyrimų metu buvo gauti kiek netikėti rezultatai, rodantys, kad miRNR/DNR heterodupleksų, turinčių 2 nt išsikišimus 3'-galuose, metilinimo greitis gali būti net didesnis nei fermentui natūralių miRNR/miRNR* (Pav. 3.16). Tai privertė detaliau ištirti, kaip HEN1 metilina įvairius netipinės struktūros substratų variantus. Ląstelėse yra dažni miRNR variantai, kurių pradžios pozicija besiskiria vos vienu ar dviem nukleotidais (Liang et al., 2017). Tokie miRNR izomerai (izomiRai) turi labai tarpusavyje panašias sekas, tačiau gali reguliuoti kiek skirtingus genų taikinius ir atitinkamai

pasižymėti skirtingu fiziologiniu poveikiu. Tikėtina, kad oligonukleotido zondas, įdėtas hibridizacijai prieš vieną iš tokių miRNR variantų, taip pat sąveikaus ir su kitais labai artimos sekos variantais, tačiau jo sąveikos pozicija bus pasislinkusi ir tokiu būdu susidarys kitokie nei 2 nt išsikišę duplekso 3'-galai. Dėl šios priežasties buvo nuspręsta papildomai ištirti, ar HEN1 fermentas gali metilinti substratus, turinčius bukus galus – tolimesniame tekste pažymėtus „R0:D0“ (Pav. 3.25).



Pav. 3.25. miR173/DNA173-R0:D0 – RNR/DNR heteroduplekso, turinčio bukų galus (atitinkamai R0 ir D0), pavyzdys.

Atlikus kinetinius tyrimus vienos apšukos sąlygomis su miRNR/miRNR* bei miRNR/DNR dupleksais, turinčiais bukų galus, paaiškėjo, kad tokie substratai yra metilinami ir gali būti pilnai modifikuoti (Pav. 3.26, A). Išanalizavus miRNR/miRNR* duplekso, turinčio bukų galus, metilinimo kinetiką, buvo nustatyta, kad miR173 metilinimo priklausomybė nuo reakcijos laiko aprašoma vienos eksponentės lygtimi, tuo tarpu kitos grandinės – dviejų eksponentių lygtimi (Pav. 3.26, B).



Pav. 3.26. HEN1 metilina miRNR/miRNR* ir miRNR/DNR substratus su bukais galais. A. dPAGE metilinimo analizė. B. Nustatyti miRNR/RNR su bukais galais metilinimo reakcijos parametrai.

Duomenys sutampa su analogiško natūralaus substrato, turinčio išsikišusius galus, miR173/miR173*, metilinimo parametrais, ir tuo pačiu patvirtina anksčiau iškelta hipotezę (žr. skyrių 3.3.1.1), jog miR173*/DNA173*-R2:D2 atveju stebima vienos eksponentės dinamika, kadangi HEN1 tokį substratą suriša tik viena orientacija, kuri yra palanki RNR grandinės metilinimui. Dvigrandinių RNR substratų su išsikišusiais ir bukais galais metilinimo greičiai buvo pakankamai panašūs: miR173 atveju – $4,5 \pm 0,2$ % ir $0,74 \pm 0,05$ %, o miR173* atveju – 35 ± 3 % ir $33 \pm 3,7$ % bei $2,9 \pm 1$ % ir $1,1 \pm 0,2$ % (Lentelė 3.5).

Lentelė 3.5. miR173 ir miR173* metilinimo parametrai, priklausomai nuo kitos duplekso grandinės: RNR arba DNR, t. p., buko arba išsikišusio galo. Metilinimo greičių (min^{-1}) vidurkiai apskaičiuoti iš 3-5 pakartojimų, nurodant paklaidas. Greičiai apskaičiuoti pagal vienos eksponentės (amplitudė lygi 100 %) arba dviejų eksponenčių lygtis, procentaliai nurodant amplitudės aukštį skliausteliuose. Storuoju šriftu paryškinta duplekso grandinė, kurios metilinimo dinamika buvo stebima dPAGE, ją pažymėjus ^{33}P izotopu.

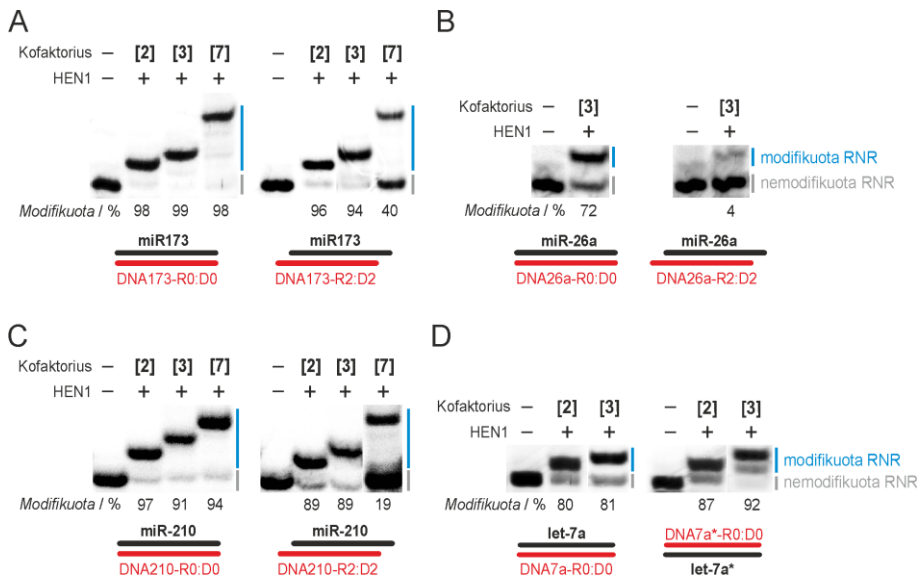
Substratas	Greitis, min^{-1} (Amplitudė, %)
miR173/miR173*	4.5 ± 0.2 (100%)
miR173/RNA173*-R0:R0	0.74 ± 0.05 (100%)
miR173/DNA173*-R2:D2	27.9 ± 0.8 (100%)
miR173/miR173*	35 ± 3 (79 \pm 3%)
miR173/miR173*	2.9 ± 1 (21 \pm 3%)
miR173/RNA173*-R0:R0	33 ± 3.7 (49 \pm 2%)
miR173/RNA173*-R0:R0	1.1 ± 0.2 (51 \pm 3%)
DNA173*-R2:D2/miR173*	7.6 ± 0.2 (100%)

Savo ruožtu praktiškai vienodos substratų su bukais galais grandinių metilinimo amplitudės (49 ± 2 % ir 51 ± 3 %) rodo, jog bukų galų ir pilno grandinių komplementarumo atveju HEN1 metiltransferazė gali prarasti prioritetą vienos iš grandinių metilinimui, todėl abu tokio duplekso galai turės vienodą tikimybę patekti į metiltransferazinį fermento domeną (palyginkite su 79 ± 3 % ir 21 ± 3 % substratų išsikišusiais galais metilinimo atveju, kuomet

lydinčioji miR173* grandinė 4 iš 5 atveju yra metilinama pirma) (Lentelė 3.5). Šie netikėti duomenys paneigia ankstesnę hipotezę, jog 1-2 nt išsikišę galai yra būtini vykti HEN1 metilinimo reakcijai *in vitro*.

3.3.2.2 miRNR/DNR substratų, turinčių bukus galus, alkilinimo tyrimas

Atlikus bukus galus turinčių miRNR/DNR dupleksų alkilinimo su sintetiniais kofaktoriais reakcijas ir išanalizavus rezultatus, paaiškėjo, jog visi tirti substratai (komplementarūs miR173, miR-26a, miR-210, let-7a arba let-7a*) yra efektyviai alkilinami (Pav. 3.27). Didelę nuostabą sukėlė faktas, jog ir su sintetiniais AdoMet analogais bukas galas dažnai buvo modifikuojamas net efektyviau už turintį 2 nt 3'-galo išsikišimą, pavyzdžiui, miR-26a/DNR atveju bukas galas buvo modifikuotas net 72 % efektyvumu, lyginant su vos 4 % išsikišusius galus turinčiame substrate (Pav. 3.27, B).

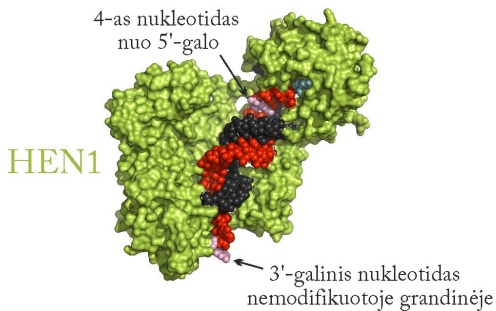


Pav. 3.27. miRNR/DNR substratų, turinčių bukus ir išsikišusius galus, alkilinimo efektyvumo palyginimas. miR173 (A), miR-26a (B) ir miR-210 (C) substratų su bukais ir 2 nt išsikišusiais 3'-galais alkilinimas naudojant Ado-6-amine [2], Ado-11-amine [3] ir Ado-18-biotin [7]. D. let-7a ir let-7a* heterodupleksų bukais galais alkilinimas, naudojant Ado-6-amine [2] ir Ado-11-amine [3] kofaktorius.

Gauti rezultatai patvirtino prielaidą, jog 2 nt išsikišę substratų 3'-galai nėra būtini HEN1 katalizuojamai modifikacijai *in vitro*. Kuriamo mažųjų RNR žymėjimo metodo kontekste šie nauji duomenys galėtų būti naudingi norint detektuoti ne vien tik taikinio miRNR, tačiau ir labai artimos sekos izomiRus – tikėtina, kad tokie alternatyvūs tiriamos miRNR variantai susiporuotų su prieš taikinio miRNR įdėtu DNR zondų ir atitinkamai turėtų būti modifikuotos HEN1 metiltransferazės. Tai galėtų padėti atrasti naujus, nežinomus miRNR biologinius variantus.

3.3.2.3 miRNR/DNR substratų, turinčių DNR 3'-galo išsikišimą, modifikacijos tyrimas

Remiantis kristalografiniais duomenimis, modifikuojama duplekso grandinė sąveikauja su HEN1 vidiniu paviršiumi ir jos ilgis yra griežtai apibrėžtas atstumo tarp metiltransferazinio domeno bei su 5'-galu sąveikaujančios baltymo dalies. Tuo tarpu kita duplekso grandinė yra eksponuojama į išorę, o jos 3'-galas nėra fiziškai apribotas metiltransferazės (Pav. 3.28).



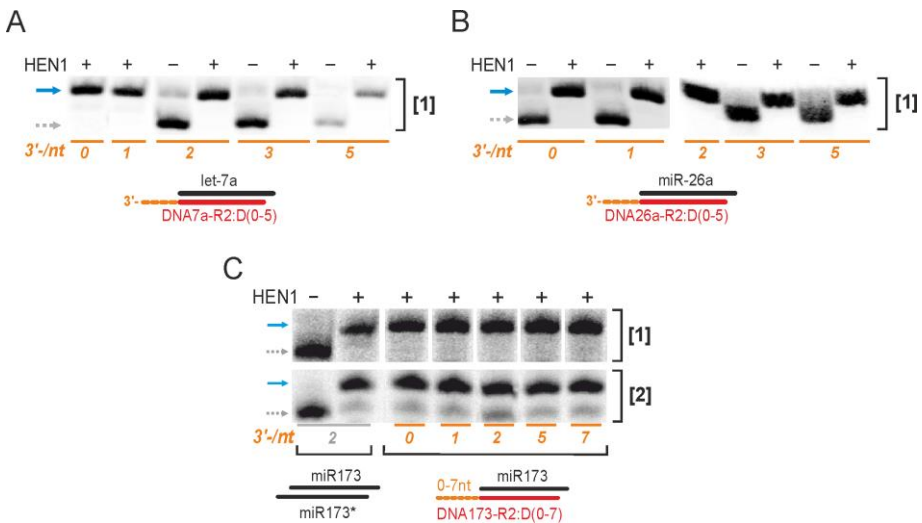
Pav. 3.28. HEN1-miRNR-AdoHcy komplekso tretinės struktūros erdvinis modelis. HEN1 baltymas pavaizduotas salotine spalva; modifikuojama miRNR grandinė pažymėta juodai, nemodifikuojama – raudonai, į išorę eksponuotos sritys paryškintos rausva spalva; AdoHcy pažymėtas melsvai.

Žinant tai buvo padaryta prielaida, jog šios grandinės ilgis nėra griežtai apibrėžtas, ir jos 3'-galas galėtų išsikišti į išorę, netrukdam modifikacijos reakcijai. Norėdami ištirti šią hipotezę, sukūrėme eilę DNR zondų, kurie susiporavę su komplementaria miRNR, sudarydavo DNR 3'-galo išsikišimą nuo 1 iki 5 ir net 7 nt ilgio (Pav. 3.29).



Pav. 3.29. miR173/DNA173-R2:D7 – miRNR/DNR heteroduplekso, turinčio 2 nt RNR grandinės 3'-galo išsikišimą (R2) ir 7 nt DNR grandinės 3'-galo išsikišimą (D7), pavyzdys.

Sulydžius let-7a, miR-26a arba miR173 su DNR zondų, kurio 3'-galas duplekso struktūroje buvo bukas (0 nt DNR 3'-galas) arba 1-7 nt išsikišęs (1-7 nt DNR 3'-galas) ir atlikus tokių heterodupleksų modifikacijos tyrimus, gauti rezultatai patvirtino mūsų hipotezę: visų substratų atveju į reakcijos mišinį pridėjus HEN1 metiltransferazę ir AdoMet [1] arba Ado-6-amine [2] kofaktorių, vyko praktiškai pilna miRNR grandinės modifikacija, nepriklausomai nuo DNR grandinės 3'-galo išsikišimo ilgio (Pav. 3.30).



Pav. 3.30. miRNR, sualydytos su DNR zondų, turinčiu įvairaus ilgio 3'-galo išsikišimą, modifikacijos tyrimas. let-7a/DNA7a (A) ir miR-26a/DNA26a (B), turinčių 2 nt ilgio miRNR ir 0-5 nt DNR grandinės išsikišimą, metilinimo tyrimas. C. miR173/miR173* (pirmi 2 takeliai nuo kairės) ir miR173/DNA173 turinčios 2 nt RNR išsikišimą ir 0-7 nt DNR grandinės išsikišimą (sekantys 5 takeliai), metilinimo, naudojant AdoMet [1] (viršuje), ir alkilavimo, naudojant Ado-6-amine [2] (apačioje), tyrimas. DNR grandinės 3'-galo išsikišimo ilgis pavaizduotas oranžine spalva.

Gauti duomenys rodo, jog HEN1 metiltransferazė pasižymi ženkliai didesniu lankstumu savo substrato atžvilgiu nei buvo manyta anksčiau ir gali toleruoti ilgesnius nei 2 nt ilgio DNR grandinės išsikišimus kaip metilinimo, taip ir alkilavimo reakcijose.

3.3.2.4 miRNR žymėjimas fluoroforu ir praturtinimas DNR aptameru

Pasitvirtinus hipotezei, jog HEN1 metiltransferazė toleruoja iki 7 nt ilgio DNR grandinės išsikišimą, ir žinodami, kad jis yra eksponuotas į baltymą supančią išorę, padarėme prielaidą, jog šis galas nėra apribotas ir teoriškai gali būti bet kokio ilgio. Suprasdami tai, nusprendėme patikrinti, ar šis oligonukleotido išsikišimas gali savyje inkorporuoti funkcinės ir / arba katalizines nukleorūgščių struktūras, tokias kaip aptamerai, specifiskai sąveikaujantys su kitomis molekulėmis, RNAzimai ir DNAzimai, katalizuojantys įvairias biochemines reakcijas ar specifinę seką turintys oligonukleotido fragmentai, pritraukiantys baltymus arba besirišantys prie taikinio DNR arba RNR sekų.

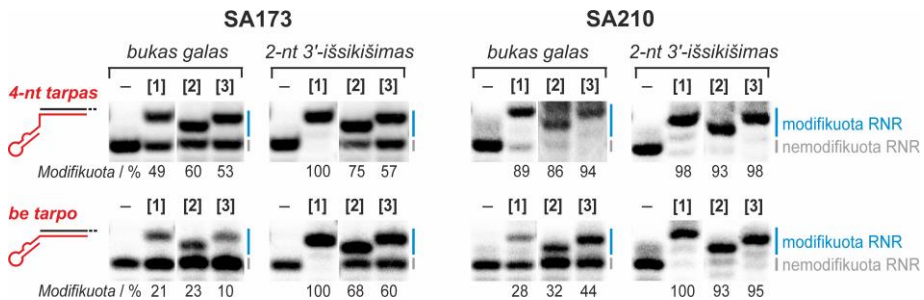
Kaip modelinį objektą šiems tyrimams pasirinkome DNR aptamerą, nekovalentiškai sąveikaujantį su streptavidino baltymu (Bing et al., 2010). Mes sukūrėme DNR zondų biblioteką, kurių kiekvienas turėjo tiriamai miRNR komplementarią maždaug 20 nt ilgio fragmentą DNR 5'-gale ir per jungtukinę 0-4 nt ilgio dalį prijungtą 29 nt ilgio streptavidinui specifisko DNR aptamero seką 3'-gale (Pav. 3.31).



Pav. 3.31. miR173/SA173-R2:s4 miRNR/DNR-SA struktūra. Heterodupleksas turi 2 nt RNR grandinės 3'-galo išsikišimą (R2). Streptavidinui-specifinio DNR aptamero (SA) seką DNR zondo 3'-gale jungiasi su RNR-komplementaria dalimi per 4 nt DNR jungtuką (s4 – 4 nt spacer).

Toks DNR zondas turėtų hibridizuotis su komplementaria taikinio miRNR, sudarant dvigrandinę struktūrą, kuri yra būtina HEN1 vykdomai modifikacijai, o streptavidinui specifinis DNR galas turėtų sąveikauti su streptavidinu padengtomis magnetinėmis dalelėmis. Tokiu būdu, tai leistų sukurti tokią mažųjų RNR žymėjimo technologiją, kuomet miRNR-komplementari DNR dalis nukreiptų zondą link taikinio miRNR, kuri savo ruožtu galėtų būti pažymėta HEN1 pagalba, pvz., fluoroforu jos vizualizacijai, o streptavidino aptameras (SA) analogiškai biotino liekanai leistų ištraukti / praturtinti tokį substratą, naudojant magnetines daleles.

Patikrinus, ar 29-33 nt ilgio DNR grandinės 3'-galo išsikišimas, papildomai sudarantis savo erdvinę struktūrą (Pav. 3.31, SA dalis), iš tikrųjų, netrukdo HEN1 katalizei, nustatėme, jog visais ištirtais atvejais tokie substratai buvo bent dalinai arba net pilnai modifikuoti, naudojant AdoMet [1], Ado-6-amine [2] arba Ado-11-amine [3] kofaktorius (Pav. 3.32).

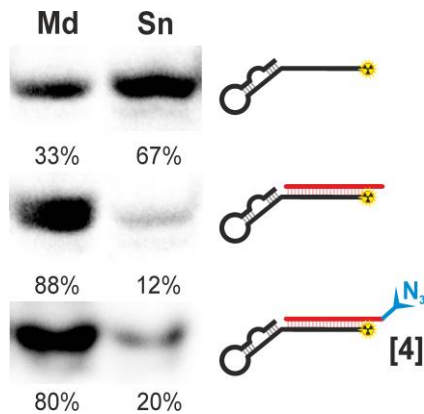


Pav. 3.32. miRNR grandinės, sulydytos su SA turinčiu DNR zonu, HEN1 katalizuojama modifikacija. miR173 (kairėje) arba miR-210 (dešinėje) buvo sulydyta su komplementariu DNR zonu (SA173 arba SA210, atitinkamai), turinčiu per 4 nt jungtuką (viršutiniai geliai) arba tiesiogiai (apatiniai geliai) ir modifikuota HEN1, naudojant AdoMet [1], Ado-6-amine [2] arba Ado-11-amine [3] kofaktorius.

Skirtingai nuo įprastinės struktūros miRNR/DNR duplexų, miRNR/SA-DNR atveju 2 nt išsikišęs galas buvo modifikuojamas geriau už buką, tikėtina, kad tam įtakos turėjo erdvinis DNR aptamero dalies išsidėstymas. Taip pat buvo nustatyta, kad jungtukinė dalis, esanti tarp

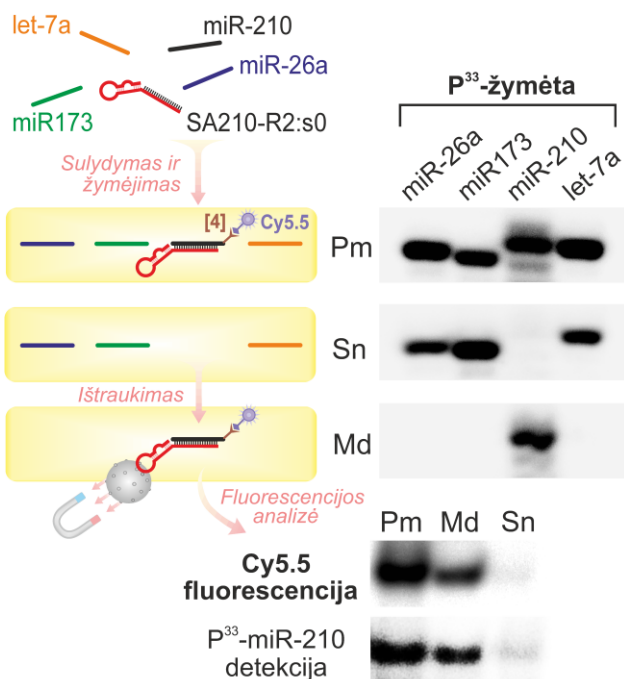
aptamero ir miRNR-komplementaraus fragmento, yra svarbi buko galo atveju, bet neturi didesnės įtakos 2 nt išsikišusio substrato modifikacijai. Pavyzdžiui, išsikišimą turintis miR173/SA173 substratas su 4 nt tarpu buvo modifikuotas panašiu efektyvumu kaip ir šio tarpo neturintis (57 % ir 60 %, atitinkamai), tačiau buko galo atveju substratas su tarpu buvo modifikuotas kur kas geriau (53 % ir 10 %, atitinkamai). Matyt tarpas leidžia „nelanksčiam“ bukam galui įgauti tinkamesnę erdvinę orientaciją į HEN1 metiltransferazinio domeno aktyvųjį centrą, tačiau pastarasis nėra toks svarbus 2 nt išsikišusio galo atveju. Geriausius rezultatus pavyko gauti su 2 nt išsikišimą turinčiais miR-210/SA210-R2:s0 ir miR-210/SA210-R2:s4 heterodupleksais, todėl tolimesniems tyrimams buvo pasirinkti būtent šie substratai (Pav. 3.32).

Iš kitos pusės, ne mažiau svarbu buvo ištirti, ar miRNR/DNR duplekso dalis netrukdo SA aptamerui įgauti tinkamą sąveiką su streptavidinu erdvinę orientaciją. Substrato miR-210/SA210-R2:s0 tyrimai parodė, kad miRNR buvimas ne tik netrukdo SA-DNR ištraukimui magnetinėmis dalelėmis, tačiau šiam procesui netgi padeda. Vos 33 % laisvo DNR aptamero buvo ištraukta su magnetinių dalelių frakcija ir net du trečdaliai išliko supernatante (Pav. 3.33, viršutinis gelio vaizdas). Tačiau heteroduplekse su miR-210, kuri matomai stabilizuoja visą struktūrą, prie magnetinių dalelių prikibusi DNR zondo dalis beveik patrigubėjo – išsitraukė net 88 % mėginio (Pav. 3.33, centrinis gelio vaizdas). Nuo Ado-6-azide [4] kofaktoriaus ant miR-210 pernešta šoninė grandinė taip pat netrukdo sąveikai su magnetinėmis dalelėmis – modifikuoto substrato ištraukimo efektyvumas sudarė 80 % (Pav. 3.33, apatinis gelio vaizdas). Tokiu būdu, aptamero dalį turintis DNR zondas gali būti naudojamas efektyviam taikinio miRNR ištraukimui.



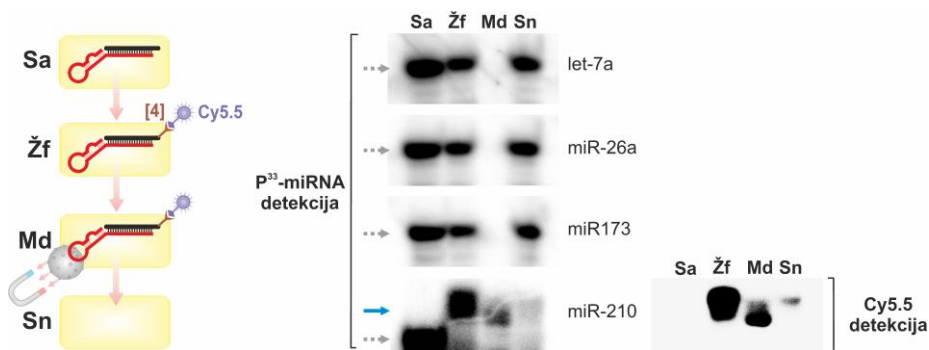
Pav. 3.33. SA210-R2:j0 (viršuje), miR-210/SA210-R2:j0 (centre) ir miR-210^{6'}-azide/SA210-R2:j0, modifikuoto nuo Ado-6-azide [4] kofaktoriaus (apačioje) ištraukimo magnetinėmis dalelėmis tyrimas. Md – mėginio dalis, susirišusi su magnetinėmis dalelėmis, Sn – laisva dalis supernatante.

Galiausiai ištyrėme taikinio miRNR žymėjimo fluoroforu ir ištraukimo magnetinėmis dalelėmis specifiskumą kitų miRNR mišinyje (Pav. 3.34). Į keturis mėginius, susidedančius iš 4 skirtingų miRNR (let-7a, miR-26a, miR173 ir miR-210), kurių tik viena buvo vizualizuojama dPAGE gelyje ³³P izotopo pagalba, buvo pridėtas miR-210-komplementarus DNR zondas, DNA210-R2:s0, ir atlikta sulydymo reakcija. Po modifikacijos HEN1, naudojant su Ado-6-azide [4] kofaktorių, mėginiai buvo paveikti streptavidinu dengtomis magnetinėmis dalelėmis, inkubuoti su Cy5.5-ethyne fluoroforo konjugatu ir išanalizuoti denatūruojančiame gelyje. Kaip ir tikėtasi, būtent taikinio miRNR, miR-210, buvo efektyviai išgryninta iš bendro mišinio magnetinių dalelių pagalba, tuo tarpu kitos trys miRNR išliko supernatante (Pav. 3.34).



Pav. 3.34. Specifinis taikinio miRNR ištraukimas, naudojant DNR aptamero zondą. Eksperimento schema (kairėje) ir dPAGE analizės rezultatai (dešinėje). Keturi mišiniai, sudaryti iš let-7a, miR-26a, miR173 ir miR-210, kuriuose tik viena iš miRNR buvo ^{33}P -žymėta, suldyti su aptamero dalį turinčiu DNR zonu SA210-R2:j0, komplementariu miR-210 taikiniui. Mėginiai buvo modifikuoti Ado-6-azide [4], pažymėti Cy5.5-ethyne fluoroforu ir paveikti magnetinėmis dalelėmis. Po praleidimo dPAGE gelyje pradiniai mėginiai (Pm), magnetinių dalelių frakcija (Md) ir supernatantas (Sn) buvo išanalizuoti ^{33}P -miRNR ir Cy5.5 signalams nustatyti.

Tuo pačiu miR-210 pavyko efektyviai pažymėti fluoroforu (Pav. 3.35). Tai, kad taikinio miRNR yra specifiškai modifikuojama Cy5.5-ethyne konjugatu, galima aiškiai matyti iš miR-210 mobilumo denatūruojančiame gelyje pokyčio po dviejų žingsnių žymėjimo stadijos – fluoroforu modifikuota miRNR gelyje judėjo lėčiau. Tuo tarpu kitos trys miRNR (let-7a, miR-26a ir miR173), prieš kurias nebuvo įdėta DNR zondų, išliko viengrandinės struktūros ir nebuvo HEN1 modifikuojamos azido grupę turinčia šonine grandine, todėl po inkubacijos su Cy5.5-ethyne konjugatu jų mobilumas nepakito. Taikinio miR-210 modifikaciją fluoroforu taip pat patvirtina po žymėjimo stadijos atsiradusi fluorescencija (Pav. 3.34 ir 3.35).



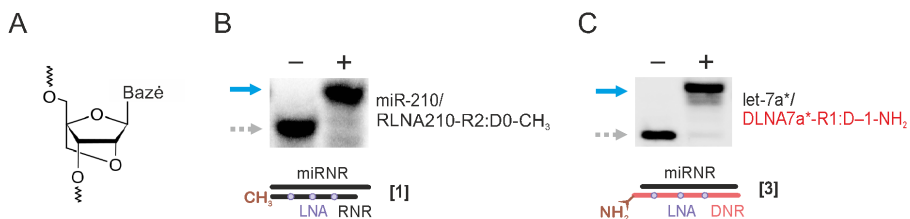
Pav. 3.35. Specifinis taikinio miRNR žymėjimas fluoroforu, naudojant DNR aptamero zondą. Reakcijos sąlygos analogiškos eksperimentui, aprašytam Pav. 3.34. Sa – mėginys po sulydymo su SA stadijos; Žf – po dviejų žingsnių žymėjimo Ado-6-azide [2] ir Cy5.5-ethyne fluoroforo konjugatu; Md – magnetinių dalelių frakcija; Sn – supernatanto frakcija. Fluoroforu pažymėto mėginio dalis nurodyta mėlyna rodykle, nežymėta dalis – pilka taškuota rodykle.

3.3.3 Modifikacijos turinčių dupleksų žymėjimas

3.3.3.1 Substratų, turinčių uždarus nukleotidus (LNA), modifikacijos tyrimas

Uždari nukleotidai LNA (angl. *locked nucleic acids*) – tai sintetiniai RNR nukleotidai, kurie turi papildomą tiltelinį ryšį tarp ribozės 2'-O ir 4-C atomų (Pav. 3.36, A). Net kelių LNA nukleotidų buvimas RNR arba DNR zondo sekoje ženkliai padidina jo specifiskumą taikinio miRNR. Papildomai didėja viso duplekso stabilumas, kas gali būti naudinga apsaugant RNR nuo degradacijos ir išlaikant dvigrandinę struktūrą, svarbią modifikacijai HEN1 fermentu (Fontenete et al., 2013).

Norėdami įrodyti, kad LNA netrukdo HEN1 modifikacijai, atlikome miRNR/RNR ir miRNR/DNR su zondo grandinėje inkorporuotais LNA nukleotidais metilinimo ir alkilavimo tyrimus. Abiem atvejais tokie substratai buvo modifikuoti efektyvumu artimu 100 % (Pav. 3.36, B ir C). Modifikacijai taip pat nesutrukdė ir zondo grandinės 3'-gale esančios modifikacijos – metilo arba amino grupė. Esant reikalui, šis galas galėtų būti papildomai pritaikytas dvigubam substratinio duplekso žymėjimui.



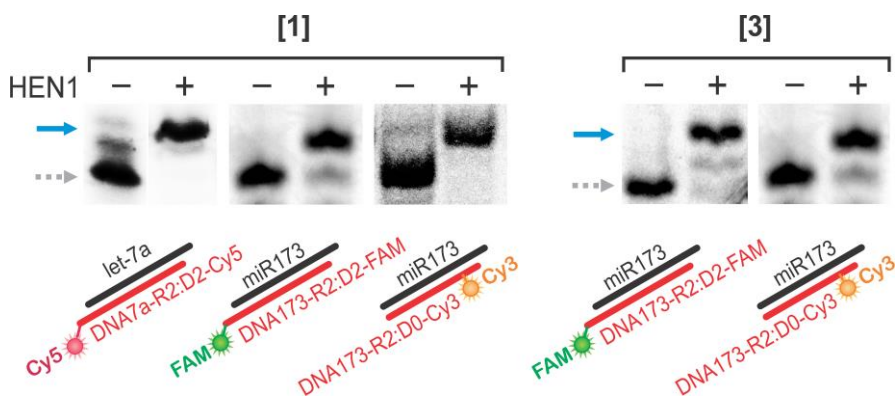
Pav. 3.36. Substratų, turinčių uždarus (LNA) nukleotidus, modifikacija. A. Uždaro nukleotido (LNA) struktūra. B. HEN1 metilina miR-210, sualydyta su RNR zonu, turinčiu metilo grupę 3'-gale (CH₃) ir tris vidinius LNA nukleotidus. C. HEN1 perneša šoninę grandinę nuo Ado-11-amine [3] ant let-7a*, kuri yra sualydyta su DNR zonu, turinčiu amino grupę 3'-gale (NH₂) ir kelis vidinius LNA nukleotidus.

3.3.3.2 miRNR/DNR substratų, turinčių inkorporuotą fluoroforą, modifikacijos tyrimas

Ankstesniame skyriuje buvo ištirtas netikėtas ir prieš tai literatūroje neaprašytas HEN1 metiltransferazės sugebėjimas toleruoti substratus, turinčius žymiai ilgesnius nei 2 nt miRNR taikiniui komplementarios grandinės išsikišimus (žr. skyrių 3.3.2.3). Šios žinios leido sukurti naują technologiją mažųjų RNR tyrimams, paremtą streptavidino aptamero sekos inkorporavimu į DNR zondą, tinkantį taikinio RNR ištraukimui / praturtinimui magnetinėmis dalelėmis (žr. skyrių 3.3.2.4). Hipotetiškai DNR grandinės 3'-pozicijoje lokalizuotas fluoroforas taip pat neturėtų trukdyti HEN1 reakcijai, ir galėtų būti panaudotas duplekso vizualizavimui. Be to, remiantis HEN1-RNR-AdoHcy kristalografiniu modeliu, DNR grandinės ketvirtas nuo 5'-galo nukleotidas irgi yra eksponuotas į išorę, todėl prie šios pozicijos prikabintas fluoroforas taip pat neturėtų trukdyti HEN1 modifikacijos reakcijoms (Pav. 3.28).

Norėdami patikrinti šias hipotezes, sukūrėme kelis skirtingus fluoroforais modifikuotus DNR zondus, iš ištyrėme, kokią įtaką jie daro miRNR modifikacijos reakcijai (Pav. 3.37). Paaiškėjo, jog visi išbandyti variantai yra modifikuojami beveik 100 % efektyvumu, metilinimo reakcijai nesutrukdė nei Cy5 arba FAM fluoroforai, prijungti prie 3'-galo, nei vidinis

fluoroforas Cy3, lokalizuotas 4-oje nuo DNR 5'-galo pozicijoje (Pav. 3.37, kairėje). Substratų alkilinimas, naudojant Ado-11-amine [3] kofaktorių, taip pat buvo pilnas, vadinasi nei zondo 3'-gale esantis, nei vidinis fluoroforas netrukdo HEN1 katalizuojamai modifikacijai (Pav. 3.37, dešinėje). Įvairių dvigrandinių substratų alkilinimo reakcijos, naudojant kitus sintetinius kofaktorius, buvo detaliai ištirtos skyriuose 3.2.1.1, 3.2.1.2, 3.3.1.2, 3.3.1.3, 3.3.2.2 ir 3.3.2.4, todėl šioje dalyje papildomai tyrinėtos nebuvo.



Pav. 3.37. Substratų, turinčių į DNR zondą inkorporuotą fluoroforą (Cy5 ar FAM – zondo 3'-gale arba Cy3 – 4-oje pozicijoje nuo zondo 5'-galo) metilinimas, naudojant AdoMet [1] (kairėje) ir alkilinimas, naudojant Ado-11-amine [3] (dešinėje). Modifikuota dalis nurodyta mėlyna rodykle, nemodifikuota – pilka taškine rodykle.

3.3.3.3 Dvigubai žymėto miRNR/DNR substrato FRET analizė

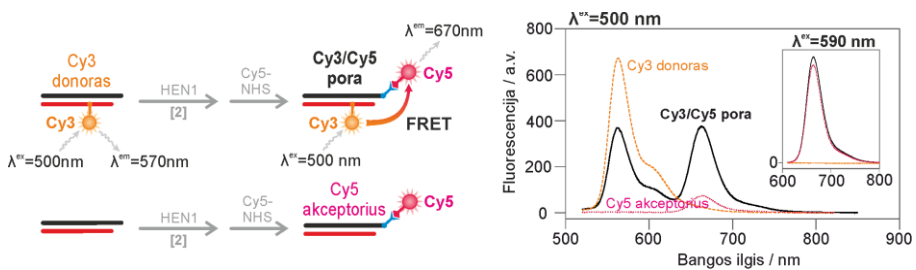
Kadangi miRNR/DNR dupleksų su 4-oje DNR pozicijoje inkorporuotu fluoroforu modifikacija buvo artima 100 %, o antrą fluoroforą mes galėjome pernešti ant RNR 3'-galo, panaudojant dviejų žingsnių žymėjimo metodiką, nusprendėme ištirti ar šiuos du fluoroforus įmanoma pritaikyti Försterio energijos rezonanso pernešimo technologijai, FRET (angl., *Förster Energy Resonance Transfer*). FRET yra vadinamas energijos perdavimo tarp dviejų šviesai jautrių molekulių (chromoforų) procesas, kuomet trumpesnės bangos ilgio šviesa sužadina donoras perduoda energiją kitam, ilgesniu bangos ilgiu sužadina akceptoriui. Tokiu būdu, jeigu atstumas tarp donoro ir

akceptorius yra pakankamai mažas, sužadinus donoro molekulę, mes pamatysime akceptorius išspinduliuojamą šviesą. Kadangi energijos perdavimo efektyvumas yra atvirkščiai proporcingas šeštame laipsnyje atstumui tarp donoro ir akceptorius, minėtas metodas yra labai jautrus net ir menkiausiam pokyčiui atstumui tarp jų. Dėl šios savybės FRET metodas yra gana plačiai taikomas, norint ypatingai jautriai ir tiksliai nustatyti fluoroforais pažymėto mėginio signalą *in vivo* ir *in vitro*, atsikratant nespecifinio laisvos žymės švytėjimo. Pasiėkus teigiamą rezultatą, specialiai mažosioms RNR adaptuota FRET technologija galėtų būti ypač reikšminga šių molekulių tyrimams.

Viena iš klasikinių fluoroforų porų FRET technologijai yra Cy3 donoro-Cy5 akceptorius. Donorinio Cy3 fluoroforo ekscitacijos (sugerties) maksimumas yra prie 530 nm, o emisijos (išspinduliavimo) maksimumas – prie 570 nm. Savo ruožtu, akceptorinio Cy5 ekscitacijos maksimumas yra prie 640 nm (su antriniu sugerties maksimumu prie 600 nm), o emisijos maksimumas yra prie 670 nm. Tokiu būdu, jeigu mes turime artimai erdvėje išdėstytus Cy3 ir Cy5 fluoroforus (pavyzdžiui, Cy3, inkorporuotą 4-oje pozicijoje nuo DNR grandinės 5'-galo ir Cy5, prijungtą prie RNR grandinės 3'-galo), tai apšvietus mėginį 500 nm ilgio šviesa, sužadintas Cy3 perduos energiją Cy5 fluoroforui ir mes stebėsime pastarojo išspinduliuojamą ~670 nm bangos ilgio šviesą, t. y. FRET reiškinį. Tačiau jeigu Cy3 donoro tirpale nėra arba jis yra erdviškai nutolęs nuo Cy5 akceptorius (pavyzdžiui, kai DNR grandinėje Cy3 nėra inkorporuotas arba grandinės nėra susilydžiusios), apšvietus mėginį su 500 nm, akceptorius sužadinas praktiškai nebus.

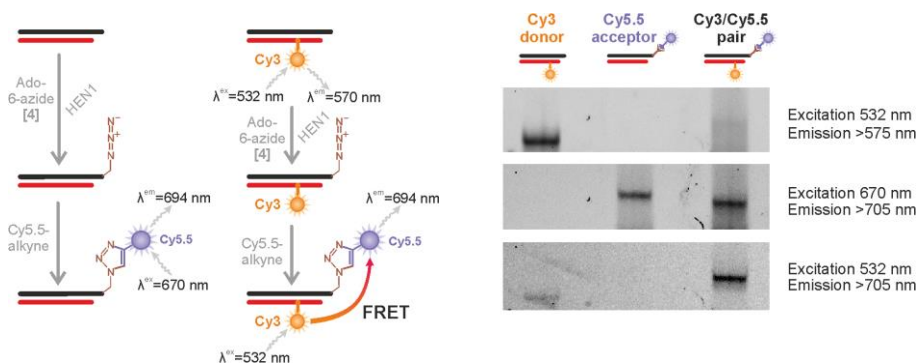
Norėdami tai patikrinti mes paruošėme tris skirtingus tirpalus: viename miR173 buvo sušlydyta su komplementaria DNR, turinčia inkorporuotą Cy3 fluoroforą (Cy3 donoro mėginys), kitame – tokio RNR/DNR substrato miR173 grandinė buvo dar papildomai per dvi stadijas užmodifikuota Cy5 fluoroforu (Cy3/Cy5 pora), trečiame – Cy5 pažymėto RNR/DNR duplekso

DNR grandinė neturėjo Cy3 modifikacijos (Cy5 akceptorius mėginys) (Pav. 3.38, kairėje). Išanalizavus visus tris mėginius fluorimetru FluoroMax-3 (Jobin Yvon Horiba), paaiškėjo, kad apšvietus tirpalus 500 nm bangos ilgio šviesa Cy3 donoro mėginyje stebimas stiprus emisijos signalas, kurio maksimumas yra ties 570 nm, kas atitinka šio fluoroforo emisiją. Tuo tarpu, Cy5 akceptorius mėginyje stebimas tik nedidelis signalas ties 670 nm – akceptorius yra labai silpnai sužadinas prie 500 nm bangos ilgio. Cy3/Cy5 poros mėginyje yra stebimas maždaug dvigubai žemesnis nei pirmame mėginyje Cy3 emisijos signalas, o taip pat panašaus stiprumo Cy5 emisijos signalas, kuris yra maždaug 5 kartus didesnis, nei akceptorius mėginyje (Pav. 3.38, dešinėje). Tai yra paaiškinama tuo, kad Cy3/Cy5 poros mėginyje maždaug pusė energijos pereina iš Cy3 fluoroforo į Cy5, todėl Cy3 fluorescencija sumažėja perpus, o Cy5 fluorescencija padidėja iki Cy3 švytėjimo lygio. Apšvietus tuos pačius mėginius su 590 nm bangos ilgio šviesa, galime matyti, kad Cy5 akceptorius ir Cy3/Cy5 poros mėginių emisijos signalo stiprumas praktiškai sutampa, kas rodo, jog abiejose mėginiuose Cy5 fluoroforo koncentracija yra vienoda, ir Cy3/Cy5 mėginyje prie 500 nm iš tikrųjų buvo stebimas būtent FRET reiškinys (Pav. 3.38, dešinėje).



Pav. 3.38. Dviejų reporterių FRET technologija selektyviai miRNR detekcijai tirpale. Kairėje: schematinis eksperimento pavaizdavimas. Dešinėje: mėginių emisijos spektrai, nustatyti prie $\lambda^{ex} = 500$ nm ir $\lambda^{ex} = 590$ nm sužadavimo. Fluorescencija nurodyta absorbcijos vienetais (a. v.). Cy3 donoras – miR173/DNA173-R2:D0-Cy3; Cy5 akceptorius – miR173-Cy5/DNA173-R2:D0; Cy3/Cy5 pora – miR173-Cy5/DNA173-R2:D0-Cy3.

Įrodžius tirpale vykstantį FRET reiškinį tarp Cy3 ir Cy5 poros, buvo įdomu iširti ar vyks energijos perdavimas tarp Cy3 ir toliau pagal savo ekstinkcijos ir emisijos koeficientus nutolusio Cy5.5 fluoroforo, išspinduliuojančio ne ~670 nm, kaip Cy5, bet 694 nm šviesą. Be to, šį kartą nusprendėme patikrinti ar pavyks FRET signalą detektuoti elektroforetiniame gelyje. Paruošėme 3 mėginius, analogiškus aukščiau aprašytam eksperimentui (Cy3 donoro, Cy5.5 akceptorius ir Cy3/Cy5.5 poros), tačiau vietoj mėginių modifikacijos Ado-6-amine kofaktoriumi, po kurio sekė Cy5-NHS esterio prijungimas, šį kartą mėginiai buvo pažymėti Ado-6-amine kofaktoriumi ir Cy5.5-ethyne fluoroforo konjugatu per „click“ cheminę reakciją (Pav. 3.39, A). Mėginiai buvo užnešti į 12 % natyvų poliakrilamidinį gelį, kuris nuskenuotas 3 būdais: 1) naudojant sužadintą žaliu 532 nm lazeriu ir virš 575 nm bangos ilgio šviesą praleidžiantį žalią filtrą Cy3 detekcijai; 2) naudojant sužadintą tolimai raudonu 670 nm lazeriu ir virš 705 nm bangos ilgio spektrą praleidžiantį tolimai raudoną filtrą Cy5.5 detekcijai; 3) naudojant žalią 532 nm lazerį ir tolimai raudoną > 705 nm filtrą FRET signalo detekcijai (Pav. 3.39, B).



Pav. 3.39. Dviejų reporterių FRET technologija selektyviai miRNA detekcijai natyviame gelyje. A. schematinis eksperimento pavaizdavimas. B. Fluorescencijos gelyje nuotrauka (iš kairės į dešinę): Cy3 donoras – miR173/DNA173-R2:D0-Cy3; Cy5 akceptorius – miR173-Cy5/DNA173-R2:D0; Cy3/Cy5 pora – miR173-Cy5/DNA173-R2:D0-Cy3.

Kaip matome iš nuskenuotų gelio vaizdų, Cy3 detekcija yra ryškiai stebima Cy3 donoro mėginyje ir žymiai silpniau – Cy3/Cy5 mėginyje (Pav. 3.39, B, viršutinis gelio vaizdas). Tai galima paaiškinti tuo, kad, jeigu netoli Cy3 donoro randasi Cy5.5 akceptorius, dalis Cy3 išspinduliuojamos energijos tenka akceptorius sužadanimui, todėl mes matome silpnesnę Cy3 fluorescenciją Cy3/Cy5.5 mėginyje. Savo ruožtu, Cy5.5 signalas yra detektuojamas abiejose mėginiuose, kurie buvo per dvi stadijas pažymėti šiuo fluoroforu, ir yra panašaus stiprumo (Pav. 3.39, B, centrinis gelio vaizdas). Galiausiai Cy3/Cy5 mėginyje yra stebimas ryškus FRET signalas (Pav. 3.39, B, apatinis gelio vaizdas).

Tokiu būdu, mes parodėme, jog mažąją RNR galima sulydyti su komplementaria DNR, turinčia mūsų norimą fluoroforą, kas leidžia pažymėti ją kitu mūsų pasirinktu fluoroforu, ir kad tarp šių fluoroforų gali vykti FRET reiškinys.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1 Disertacijos darbo fundamentinė reikšmė

Šis darbas yra svarbus, visų pirma norint geriau suprasti *Arabidopsis thaliana* metiltransferazės HEN1 vykdomos modifikacijos mechanizmą. Minėtas fermentas dalyvauja miRNR ir siRNR biogenezės keliuose, metilindamas subrendusių mažųjų RNR dupleksus prieš pat vienos iš duplekso grandinių įtraukimą į RNR indukuotus nutildymo kompleksus (RISC) (Ji and Chen, 2012). Tyrimų pradžioje dar nebuvo iki galo aišku, kaip augalų ląstelėse yra pasirenkama, kuri iš miRNR/miRNR* duplekso grandinių bus įtraukta į RISC kompleksus augaluose ir taps kreipiančiąja miRNR, o kuri – lydinčiąja miRNR* ir bus sudegraduota. Viena iš tuometinių hipotezių buvo ta, kad būtent HEN1 apsprendžia grandinių pasirinkimą. Kadangi HEN1 vykdomas RNR 3'-galo metilinimas apsaugo šią RNR nuo degradacijos *in vivo* (Ji and Chen, 2012), buvo manoma, kad HEN1 pasižymi metilinimo prioritetu kreipiančiai grandinei, o lydinčioji grandinė yra metilinama rečiau, todėl paprastai yra sudegraduojama. Vis dėlto mūsų tyrimai parodė, kad *in vitro* HEN1 dažniau gali metilinti, kaip kreipiančiąją (miR-210), taip ir lydinčiąją (miR173*) grandinę, tuo tarpu, pilno duplekso komplementarumo atveju abi grandinės buvo metilinamos panašiu dažnumu (siR173 atveju). Tai rodo, kad *in vitro* HEN1 gali teikti prioritetą vienai iš grandinių pagal duplekso susiporavimą, tačiau pats savaime fermentas „nesirenka“, kuri iš grandinių bus įtraukta į RISC, nors *in vivo* tam procesui gali turėti įtakos kiti su HEN1 sąveikaujantys baltymai (Baranauskė et al., 2015).

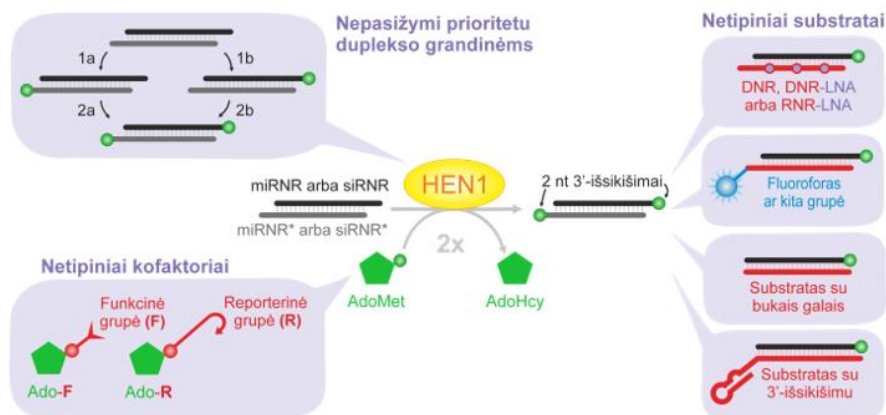
Viena svarbiausių disertacijos užduočių buvo pritaikyti HEN1 metiltransferazę miRNR ir siRNR dupleksų žymėjimui panaudojant sintetinius AdoMet analogus su tikslu sukurti metodą (-us) šių molekulių detekcijai arba gryninimui iš daugiakomponenčių mišinių. Ši technologija, vadinama mTAG (angl., *methyltransferase-directed transfer of activated*

groups) anksčiau jau buvo sėkmingai pritaikyta nuo sekos priklausomam DNR žymėjimui (Lukinavičius et al., 2007), nuo sekos priklausomam tRNR ir pre-iRNR žymėjimui (Motorin et al., 2011; Tomkuvienė et al., 2012), histoninio H3 baltymo lizino aminorūgšties modifikacijai (Binda et al., 2011), žmogaus arginino metiltransferazės PRMT1 substratų žymėjimui (Wang et al., 2011), nehistoninių baltymų žymėjimui (Islam et al., 2012) ir net modifikacijų genomo GC sekose profiliavimui (Staševskij et al., 2017). Vis dėlto būtent šios disertacijos tyrimais pirmą kartą buvo parodytas nukleorūgščių mTAG žymėjimas, priklausantis nuo substrato struktūros ir ilgio, tačiau nepriklausantis nuo pastarojo sekos. Iš HEN1 struktūros tyrimų yra žinoma, kad fermentas atpažįsta savo substratus pagal ilgį ir dvigrandinę struktūrą, ir neturi prioriteto duplexo sekai (Huang et al., 2009). Mūsų atlikti fundamentiniai HEN1 metiltransferazės reakcijos mechanizmo tyrimai papildomai parodė, kad modifikacija nepriklauso nuo metilinamo ar alkilino 3'-galinio nukleotido heterociklinės bazės, ar nuo metilo grupės buvimo kitos grandinės 3'-gale, kas leidžia teigti, kad būtent HEN1 tapo pirmąja metiltransferaze, kuri parodė mTAG technologijos panaudojimą žymint nukleorūgštis 3'-galuose, atpažįstant substratą ne pagal seką, bet iš pastarojo dvigrandinės RNR struktūros ir 21-24 bp ilgio. Be to, toks metiltransferazei būdingas substrato atpažinimo mechanizmas leido pirmą kartą istorijoje pritaikyti mTAG technologiją atskirai RNR molekulių grupei – miRNR ir siRNR duplexams, kaip gyvūninės, taip ir augalinės kilmės. Galiausiai reikėtų pažymėti išskirtinai aukštą HEN1 substratų žymėjimo efektyvumą. Ankstesni mTAG technologijos pritaikymo metu substrato žymėjimas niekada nebuvo pilnas ir siekdavo nuo kelių iki keliasdešimties procentų modifikuojamų substrato molekulių, o kai kuriais atvejais net buvo poreikis vykdyti atskirų metiltransferazių mutagenezę su tikslu pritaikyti žymėjimui (Lukinavičius et al., 2012; Lukinavičius et al., 2007). Šios disertacijos tyrimuose praktiškai su visais iširtais sintetiniais kofaktoriais,

kaip turinčiais funkcines grupes (Ado-6-amine, Ado-11-amine, Ado-6-azide, Ado-6-ethyne), taip ir turinčiais reporterinę biotino grupę (Ado-13-biotin), pirmą kartą pavyko pasiekti artimą šimtaprocentiniam mTAG žymėjimo efektyvumą *in vitro*.

Galiausiai šios disertacijos tyrimų metu pirmą kartą buvo parodyta, kad HEN1 metilina ir alkilina miRNR arba siRNR grandinę heteroduplekse su DNR, kas leido dar labiau praplėsti mTAG technologijos taikymą mažosioms RNR (žr. skyrių 4.2). Pirmąkart buvo parodyta įvairias chemines modifikacijas (sintetinius LNA nukleotidus, pirminio amino grupę arba net fluoroforo molekulę DNR grandinės 3'-gale arba ketvirtoje nuo 5'-galo pozicijoje) turinčių substratų žymėjimas HEN1 metiltransferaze. Taip pat visai netikėtai eksperimentų metu buvo nustatyta, kad HEN1 modifikacijai nėra būtinas 2 nt RNR 3'-galo išsikišimas, kaip buvo manyta iki šiol (Yang et al., 2006). Tyrimai parodė, jog ir miRNR/RNR, ir miRNR/DNR substratų su bukais galais RNR grandinės yra efektyviai modifikuojamos. Dar didesnę nuostabą sukėlė faktas, jog dažnai bukas galas buvo modifikuojamas net efektyviau už turintį 2 nt išsikišimą (išskyrus atvejus su SA-DNR aptameriais, kuomet SA dalis matyt darė įtaką miRNR išsidėstymui ir laisvas 2 nt RNR 3'-galas galėjo įgauti tinkamesnę orientaciją į HEN1 metiltransferazinį domeną negu bukas). Šie naujausi duomenys paneigia ankstesnę teiginį dėl išsikišimų dupleksų 3'-galuose būtinumo HEN1 modifikacijai. Ypatingai naudingas praktinio pritaikymo prasme tapo fundamentinis atradimas, kad HEN1 metilina ir alkilina dupleksus, turinčius ilgus (iki kelių-keliasdešimties nukleotidų ilgio) DNR grandinės 3'-galo išsikišimus.

Apibendrinti duomenis apie nustatytą fundamentinių duomenų naujumą parodyti pav. 4.1.



Pav. 4.1. Disertacijos atradimų naujumas ir sąsajos su ankstesniais duomenimis. Natūrali HEN1 reakcija vyksta, kuomet metiltransferazė perneša metilo grupes nuo AdoMet kofaktoriaus ant miRNR/miRNR* arba siRNR/siRNR* duplekso 3'-galinių 2 nt išsikišimų (centre). Disertacijos tyrimų metų nustatyta, kad HEN1 be kitų baltymų *in vitro* neteikia prioriteto, kurią iš duplekso grandinių, kreipiančiąją ar lydinčiąją, modifikuoti pirma (kairėje viršuje). Be to, parodyta, kad metiltransferazė perneša ne tik metilo, bet ir ilgesnes grupes nuo sintetinių AdoMet analogų su funkcinėmis arba reporterinėmis grupėmis (kairėje apačioje). Tai yra pirmas mTAG technologijos pritaikymas, kuomet substratas atpažįstamas ne pagal nukleorūgšties seką, bet pagal jo ilgį ir dvigrandinę struktūrą. Be to, tai yra pirmas mTAG pritaikymas atskirai RNR molekulių grupei – miRNR ir siRNR dupleksams. Taip pat disertacijos tyrimų metu buvo parodyta, kad HEN1 gali modifikuoti netipinius substratus: miRNR arba siRNR, suldytą su DNR, DNR-LNA, RNR-LNA arba su oligonukleotidu, turinčių cheminių modifikacijų (du viršutiniai blokai dešinėje, atitinkamai). Galiausiai įrodyta, kad HEN1 gali modifikuoti substratus bukais galais arba turinčius ilgus nmodifikuojamos grandinės 3'-galo išsikišimus (du apatiniai blokai dešinėje, atitinkamai).

4.2 Disertacijos darbo praktinė reikšmė

Nemažėjančios mažųjų RNR tyrimų apimtys reikalauja vis naujų molekulinį įrankių jų analizei. Šios disertacijos pagrindinis tikslas buvo praplėsti tokių įrankių sąrašą, papildant jį *Arabidopsis thaliana* mažųjų RNR metiltransferaze HEN1, kurią buvo bandyta pritaikyti mTAG technologijai. Minėto fermento savybės, tokios kaip specifiškumas 21-24 nt ilgio RNR dupleksams, daro HEN1 tobulu molekulinio įrankiu specifiniam miRNR ir siRNR žymėjimui.

HEN1 metiltransferazės miRNR/miRNR* metilinimo mechanizmo tyrimas padėjo mums suprasti šio fermento savybes *in vitro*. Nustatyta, kad metilo grupės buvimas vienoje iš grandinių netrukdyt kitos grandinės modifikacijai. Vadinasi, net jeigu HEN1 teikia prioritetą kitai grandinei nei ta, kuri yra mums svarbi, mūsų tikslinė grandinę vis tiek bus modifikuota, ir galiausiai žymėjimo metu modifikuotos bus abi duplekso grandinės, kaip kreipiančioji, taip ir lydinčioji, kas gali būti svarbu sukurtoms mažųjų RNR žymėjimo technologijoms, priklausomai nuo konkretaus eksperimento tikslų. Mes nustatėme, jog visi keturi 3'-nukleotidų variantai yra modifikuojami panašiu efektyvumu, reiškia, kad HEN1 žymėjimo technologija gali būti pritaikyta visoms galimoms miRNR ir siRNR molekulėms, ir gali padėti atrasti naujus, dar kol kas nežinomus, jų variantus.

Perėjus prie alkilavimo tyrimų, paaiškėjo, kad HEN1 buvo aktyvus su visais išbandytais sintetiniais AdoMet analogais, o daugeliu atvejų net neoptimizuojant sąlygų pavyko pasiekti artimą 100-ai procentų alkilavimo efektyvumą. Kaip buvo rašyta 4.1 dalyje, daugelio kitų metiltransferazių ir jų mutantinių variantų, specifinių kitokiems nei mažųjų RNR dupleksai substratams, ir pritaikytų mTAG technologijai, taikinių žymėjimas buvo nepilnas (Motorin et al., 2011; Tomkuvienė et al., 2012). Metiltransferazės HEN1 atveju ypatingai aukštas substratų modifikacijos efektyvumas leido sukurti vieno ir dviejų žingsnių mažųjų RNR žymėjimo metodus mažųjų RNR išgryninimui ir fluoroforų prijungimui. Visi duomenys rodo, kad esant poreikiui HEN1 gali būti panaudotas ir kitų, šiame darbe neišbandytų, reporterinių molekulių pernašai, tokiu būdu dar labiau praplečiant mažųjų RNR analizės metodų sąrašą.

Technologine prasme įdomus yra dupleksų su LNA (angl. *locked nucleic acid*) nukleotidais lydinčiojoje zondo grandinėje žymėjimas. Šių sintetinių nukleotidų struktūroje yra dvigubas ribozės žiedas, pasižymintis stipria hidrofobine sąveika su kita grandine, todėl LNA nukleotidus turintis

zondas pasižymi ženkliai išaugančia savybe hibridizuotis prie taikinio, aukštesniu afiniškumu ir išaugusiu specifiškumu jam, bei greitesne hibridizacijos kinetika (Fontenete et al., 2013). Tai suteikia stabilumo viso duplekso dvigrandinėi struktūrai, kuri yra svarbi HEN1 vykdomai katalizei, be to, apsaugo tokį dupleksą nuo degradacijos, kadangi dvigrandinėje struktūroje RNR yra pastebimai atsparesnės RNaziniam poveikiui, o patys sintetiniai LNA tipo nukleotidai yra atsparūs kaip RNazėms, taip ir DNazėms. Bet tai dar yra ne viskas – į oligonukleotidinį zondą įterpti LNA gali atlikti ir papildomas funkcijas. Kaip yra žinoma iš šio darbo eksperimentinių duomenų, HEN1 metiltransferazė nėra ypatingai jautri vieno ar kelių nekomplementarių nukleotidų buvimui duplekso viduryje – panašiu efektyvumu yra modifikuojamos ir pilnai komplementarios siRNR, ir vieną ar daugiau kilpų ar pūpsų turinčios miRNR. Tačiau LNA įvedimas į RNR ar DNR zondą nesuporuotų nukleotidų pozicijoje ar prie pat jo turėtų stipriai pakeisti substratinio duplekso lydymosi temperatūrą (Mishra et al., 2016). Optimizavus sąlygas, toks pokytis gali būti pakankamai reikšmingas, kad leistų atskirti vos 1-2 nt besiskiriančias miRNR izoformas, taip vadinamus izomiR'us.

Kristalografiniame HEN1-RNR-AdoHcy modelyje yra matoma, kad tam tikros sritys vidinėje nemonifikuojamos grandinės dalyje, įskaitant 4-tą nuo 5'-galo poziciją, yra eksponuotos į išorinę erdvę, todėl šioje pozicijoje lokalizuotas fluoroforas (kaip ir 3'-gale lokalizuotas fluoroforas) neturėtų trukdyti HEN1 modifikacijai. Tai leido pritaikyti FRET technologiją mažųjų RNR tyrimams. Šios technologijos rėmuose miRNR/DNR dupleksas turi vieną fluoroforą DNR grandinės 4-oje nuo 5'-galo pozicijoje, o kitas yra pernešamas ant RNR 3'-galo HEN1 metiltransferazės pagalba. Žymėjimas dviem fluoroforais yra pranašesnis už viengubą miRNR ir siRNR žymėjimą, kadangi fluorescencijos signalo detekcijai yra svarbus abiejų fluoroforų, donoro ir akceptoriaus, artimas erdvinis išsidėstymas. Tai leidžia labai

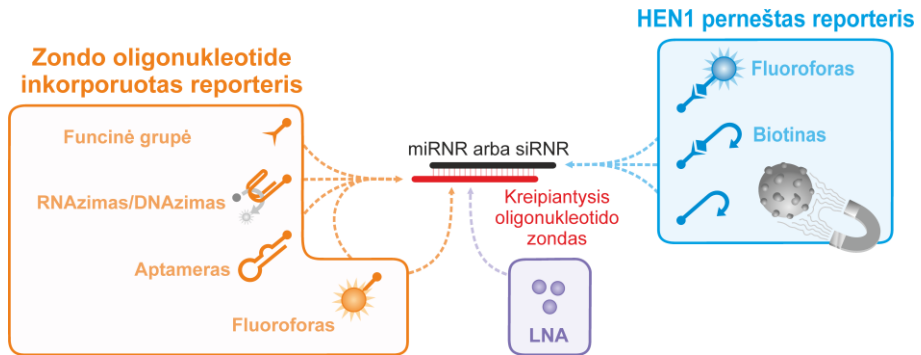
ženkliai sumažinti nespecifinę fluoroforų emisiją, kas yra svarbu, norint gauti jautrius specifinius tiriamo taikinio signalus.

Kitas svarbus praktine prasme atradimas buvo padarytas parodžius, kad HEN1 gali modifikuoti substratą su bet kokio ilgio zondo grandinės 3'-išsikišimu. Gauti duomenys jau yra įdomūs savaime, kadangi niekad iki šiol nebuvo aprašyti mokslinėje literatūroje. Vis dėlto šių tyrimų kontekste HEN1 metiltransferazės sugebėjimas modifikuoti miRNR/DNR duplexus su DNR 3'-galiniu išsikišimu davė mums naujas idėjas dėl kuriamo metodo tolimesnio pritaikymo galimybių. Pastebėjus, kad net 7 nt ilgio DNR 3'-išsikišimas iš tikrųjų nedaro jokios pastebimos įtakos HEN1 katalizuojamoms metilinimo ir alkilavimo reakcijoms, buvo nuspręsta pabandyti į šią sritį inkorporuoti 29 nt ilgio streptavidinui specifiską DNR aptamerą. Kaip ir buvo tikėtasi, miRNR, sulydyta su tokiu zonu gali būti praktiškai pilnai modifikuota HEN1 pagalba, o pernešta šoninė grandinė nedaro didesnės įtakos aptamero funkcionalumui. Įdomu, jog magnetinių dalelių pagalba su miR-210 susiporuotas SA-DNR zondas išsitraukia kur kas efektyviau už viengrandinį SA-DNR (ištraukto zondo kiekis patrigubėja). Šie rezultatai rodo, kad miRNR galbūt stabilizuoja DNR zondo 5'-galą, susiporuodama su juo, kuris matyt trukdo SA dalies sąveikai su magnetinėmis dalelėmis. Galiausiai mums pavyko sukurti ir eksperimentais įrodyti specifinį miRNR žymėjimą fluoroforu ir jos ištraukimą iš įvairių kitų miRNR mišinio.

Galimybė inkorporuoti funkcionalų streptavidino aptamerą zondo 3'-gale, kuris netrukdo miRNR (siRNR) grandinės žymėjimui HEN1 pagalba, rodo, kad ateityje ši technologija galėtų būti pritaikyta inkorporuojant ir kitokias funkcinėmis savybėmis pasižyminčias sekas, tokias kaip su specifinėmis DNR ar RNR arba baltymais sąveikaujančios sekos arba katalizinėmis savybėmis pasižymintys RNAzimai ir DNAzimai (Pav. 4.2).

Apibendrinant visos disertacijos rezultatus galima būtų išskirti visų čia aprašytų darbų praktinę reikšmę. Dauguma šių tyrimų, turinčių ir savo

fundamentinę svarbą, galiausiai buvo pritaikyti kuriant miRNR ir siRNR analizės metodus ar gali būti pritaikyti artimoje ateityje (Pav. 4.2). Dėl mažųjų RNR svarbos žmogaus biologinėms reakcijoms yra neabejojama, kad disertacijoje aprašyti nauji metodai bus sėkmingai adaptuoti ir naudojami mokslinėse, biotechnologinėse ir klinikinėse laboratorijose.



Pav. 4.2. Disertacijos tyrimų metu sukurtų ir potencialiai galimų technologijų apžvalga. HEN1 katalizuoja įvairių funkcinių ir biotino arba fluoroforų reporterinių grupių pernašą ant miRNR ir siRNR (mėlynas blokas). Kita funkcinė ar reporterinė grupė arba funkcionali/katalizuojanti RNR arba DNR dalis gali būti inkorporuota komplementarioje grandinėje (oranžinis blokas). Uždari LNA nukleotidai (purpurinis blokas) papildomai gali padidinti dupleksų stabilumą.

IŠVADOS

1. Ištirtas *Arabidopsis thaliana* metiltransferazės HEN1 mažųjų RNR metilinimo mechanizmas *in vitro* ir nustatyti šiai reakcijai įtaką darantys veiksniai. Remiantis gautas duomenimis, pasiūlytas minėto fermento metilinimo mechanizmo modelis.
2. Įrodyta, kad metiltransferazė HEN1 gali pernešti didesnę nei metilo grupę nuo sintetinių jos kofaktoriaus S-adenozil-L-metionino analogų, tokių kaip Ado-6-amine, Ado-11-amine, Ado-6-azide, Ado-6-ethyne, Ado-13-biotin ir Ado-18-biotin, ant miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleksų.
3. Nustatyta, kad metiltransferazė HEN1 geba modifikuoti ne tik tipinius RNR/RNR dupleksus, tačiau ir RNR grandinę, sulydytą su DNR, RNR-LNA arba DNR-LNA zondų. Eksperimentiškai įrodyta, kad fermento metilinami ir alkilinami dupleksai gali turėti kaip 2 nt išsikišusį, taip ir buką modifikuojamos RNR 3'-galą, taip pat tariamai neriboto ilgio, bet ne mažesnę nei 33 nt šiame cikle nemodifikuojamos grandinės 3'-galą, o taip pat daugybę kovalentinių modifikacijų, įskaitant nemodifikuojamos grandinės 3'-gale esančią metilo arba amino grupę, FAM arba Cy5 fluoroforą arba vidinį Cy3 fluoroforą.
4. Remiantis padarytais atradimais, buvo sukurtos vieno ir dviejų žingsnių mažųjų RNR žymėjimo biotinu technologijos, tinkančios šių molekulių ištraukimui ir praturtinimui ir specifiniam žymėjimui fluoroforais, įskaitant Cy5, Cy5.5 ir eterneoną. Taip pat sukurta mažųjų RNR ištraukimo ir praturtinimo streptavidinui specifišku aptameru technologija bei FRET analizei tinkanti dvigubo žymėjimo fluoroforais technologija.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Appel, C.D., and Maxwell, E.S. (2007). Structural features of the guide:target RNA duplex required for archaeal box C/D sRNA-guided nucleotide 2'-O-methylation. *RNA* 13, 899–911.
2. Arif, M., Islam, S.U., Adnan, M., Anwar, M., Ali, H., and Wu, Z. (2018). Recent progress on gene silencing/suppression by virus-derived small interfering RNAs in rice viruses especially Rice grassy stunt virus. *Microb. Pathog.* 125, 210–218.
3. Baranauskė, S., Mickutė, M., Plotnikova, A., Finke, A., Venclovas, Č., Klimašauskas, S., and Vilkaitis, G. (2015). Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase: HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins. *Nucleic Acids Res.* 43, 2802–2812.
4. Billi, A.C., Alessi, A.F., Khivansara, V., Han, T., Freeberg, M., Mitani, S., and Kim, J.K. (2012). The *Caenorhabditis elegans* HEN1 Ortholog, HENN-1, Methylates and Stabilizes Select Subclasses of Germline Small RNAs. *PLoS Genet.* 8.
5. Binda, O., Boyce, M., Rush, J.S., Palaniappan, K.K., Bertozzi, C.R., and Gozani, O. (2011). A Chemical Method for Labeling Lysine Methyltransferase Substrates. *Chembiochem* 12, 330–334.
6. Bing, T., Yang, X., Mei, H., Cao, Z., and Shanguan, D. (2010). Conservative secondary structure motif of streptavidin-binding aptamers generated by different laboratories. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 1798–1805.
7. Bohnsack, M.T., and Sloan, K.E. (2018). Modifications in small nuclear RNAs and their roles in spliceosome assembly and function. *Biol. Chem.* 399, 1265–1276.
8. Bologna, N.G., Iselin, R., Abriata, L.A., Sarazin, A., Pumplin, N., Jay, F., Grentzinger, T., Dal Peraro, M., and Voinnet, O. (2018). Nucleocytoplasmic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. *Mol. Cell* 69, 709-719.e5.
9. Boutet, S., Vazquez, F., Liu, J., Béclin, C., Fagard, M., Gratias, A., Morel, J.B., Créte, P., Chen, X., and Vaucheret, H. (2003). Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Curr. Biol. CB* 13, 843–848.

10. Carè, A., Bellenghi, M., Matarrese, P., Gabriele, L., Salvioli, S., and Malorni, W. (2018). Sex disparity in cancer: roles of microRNAs and related functional players. *Cell Death Differ.* 25, 477–485.
11. Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642–655.
12. Carvalho de Oliveira, J., Molinari Roberto, G., Baroni, M., Bezerra Salomão, K., Alejandra Pezuk, J., Sol Brassesco, M., Carvalho de Oliveira, J., Molinari Roberto, G., Baroni, M., Bezerra Salomão, K., et al. (2018). MiRNA Dysregulation in Childhood Hematological Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2688.
13. Castanotto, D., and Rossi, J.J. (2009). The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 457, 426–433.
14. Catalanotto, C., Cogoni, C., and Zardo, G. (2016). MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
15. Chan, J.J., and Tay, Y. (2018). Noncoding RNA:RNA Regulatory Networks in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
16. Chatterjee, K., Nostramo, R.T., Wan, Y., and Hopper, A.K. (2018). tRNA dynamics between the nucleus, cytoplasm and mitochondrial surface: Location, location, location. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1861, 373–386.
17. Chen, X., Liu, J., Cheng, Y., and Jia, D. (2002). HEN1 functions pleiotropically in Arabidopsis development and acts in C function in the flower. *Dev. Camb. Engl.* 129, 1085–1094.
18. Chiyomaru, T., Fukuhara, S., Saini, S., Majid, S., Deng, G., Shahryari, V., Chang, I., Tanaka, Y., Enokida, H., Nakagawa, M., et al. (2014). Long Non-coding RNA HOTAIR Is Targeted and Regulated by miR-141 in Human Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 289, 12550–12565.
19. Christopher, A.F., Kaur, R.P., Kaur, G., Kaur, A., Gupta, V., and Bansal, P. (2016). MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect. Clin. Res.* 7, 68–74.
20. Costa, A., Osório, C., and Dias, S. (2009). MicroRNA expression profiling in bone marrow: implications in hematological malignancies. *Biotechnol. J.* 4, 88–97.

21. Dalhoff, C., Lukinavičius, G., Klimašauskas, S., and Weinhold, E. (2006). Direct transfer of extended groups from synthetic cofactors by DNA methyltransferases. *Nat. Chem. Biol.* 2, 31.
22. Dang, K., and Myers, K.A. (2015). The Role of Hypoxia-Induced miR-210 in Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 6353–6372.
23. Deng, J., Yang, M., Jiang, R., An, N., Wang, X., and Liu, B. (2017). Long Non-Coding RNA HOTAIR Regulates the Proliferation, Self-Renewal Capacity, Tumor Formation and Migration of the Cancer Stem-Like Cell (CSC) Subpopulation Enriched from Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 12.
24. Djuranovic, S., Nahvi, A., and Green, R. (2011). A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Science* 331, 550–553.
25. Eastberg, J.H., Pelletier, J., and Stoddard, B.L. (2004). Recognition of DNA substrates by T4 bacteriophage polynucleotide kinase. *Nucleic Acids Res.* 32, 653–660.
26. Fang, R., Moss, W.N., Rutenberg-Schoenberg, M., and Simon, M.D. (2015). Probing Xist RNA Structure in Cells Using Targeted Structure-Seq. *PLoS Genet.* 11.
27. Feng, X., Zhou, S., Wang, J., and Hu, W. (2018). microRNA profiles and functions in mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12.
28. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–114.
29. Fontenete, S., Guimarães, N., Leite, M., Figueiredo, C., Wengel, J., and Filipe Azevedo, N. (2013). Hybridization-Based Detection of *Helicobacter pylori* at Human Body Temperature Using Advanced Locked Nucleic Acid (LNA) Probes. *PLoS ONE* 8.
30. Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.
31. Garofalo, M., and Croce, C.M. (2011). microRNAs: Master Regulators as Potential Therapeutics in Cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 25–43.

32. Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 94–108.
33. Guo, L., and Chen, F. (2014). A challenge for miRNA: multiple isomiRs in miRNAomics. *Gene* *544*, 1–7.
34. Hansen, T.B., Venø, M.T., Jensen, T.I., Schaefer, A., Damgaard, C.K., and Kjems, J. (2016). Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nat. Commun.* *7*.
35. Herkenhoff, M.E., Oliveira, A.C., Nachtigall, P.G., Costa, J.M., Campos, V.F., Hilsdorf, A.W.S., and Pinhal, D. (2018). Fishing Into the MicroRNA Transcriptome. *Front. Genet.* *9*.
36. Hirose, T., Mishima, Y., and Tomari, Y. (2014). Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy. *EMBO Rep.* *15*, 489–507.
37. Huang, Y., Ji, L., Huang, Q., Vassilyev, D.G., Chen, X., and Ma, J.-B. (2009). Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature* *461*, 823–827.
38. Islam, K., Bothwell, I., Chen, Y., Sengelaub, C., Wang, R., Deng, H., and Luo, M. (2012). Bioorthogonal Profiling of Protein Methylation (BPPM) Using Azido Derivative of S-adenosyl-L-methionine. *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 5909–5915.
39. Islam, M.M., Sinha, R., and Kumar, G.S. (2007). RNA binding small molecules: Studies on t-RNA binding by cytotoxic plant alkaloids berberine, palmatine and the comparison to ethidium. *Biophys. Chem.* *125*, 508–520.
40. Islam, W., Noman, A., Qasim, M., and Wang, L. (2018). Plant Responses to Pathogen Attack: Small RNAs in Focus. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 515.
41. Ji, L., and Chen, X. (2012). Regulation of small RNA stability: methylation and beyond. *Cell Res.* *22*, 624–636.
42. Jinek, M., and Doudna, J.A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* *457*, 405–412.
43. Kirino, Y., and Mourelatos, Z. (2007). The mouse homolog of HEN1 is a potential methylase for Piwi-interacting RNAs. *RNA* *13*, 1397–1401.

44. Kishore, S., Gruber, A.R., Jedlinski, D.J., Syed, A.P., Jorjani, H., and Zavolan, M. (2013). Insights into snoRNA biogenesis and processing from PAR-CLIP of snoRNA core proteins and small RNA sequencing. *Genome Biol.* *14*, R45.
45. Klimašauskas, S., and Weinhold, E. (2007). A new tool for biotechnology: AdoMet-dependent methyltransferases. *Trends Biotechnol.* *25*, 99–104.
46. Kumar, V., Khare, T., Shriram, V., and Wani, S.H. (2018). Plant small RNAs: the essential epigenetic regulators of gene expression for salt-stress responses and tolerance. *Plant Cell Rep.* *37*, 61–75.
47. Kurth, H.M., and Mochizuki, K. (2009). 2'-O-methylation stabilizes Piwi-associated small RNAs and ensures DNA elimination in *Tetrahymena*. *RNA* *15*, 675–685.
48. Laitinen, O.H., Hytönen, V.P., Nordlund, H.R., and Kulomaa, M.S. (2006). Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *63*, 2992–3017.
49. Li, Z., and M Rana, T. (2014). Li Z, Rana TMTherapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov* *13*(8): 622-638.
50. Li, D., Li, Y.-P., Li, Y.-X., Zhu, X.-H., Du, X.-G., Zhou, M., Li, W.-B., and Deng, H.-Y. (2018). Effect of Regulatory Network of Exosomes and microRNAs on Neurodegenerative Diseases. *Chin. Med. J. (Engl.)* *131*, 2216–2225.
51. Liang, T., Yu, J., Liu, C., and Guo, L. (2017). IsomiR expression patterns in canonical and Dicer-independent microRNAs. *Mol. Med. Rep.* *15*, 1071–1078.
52. Libri, V., Miesen, P., van Rij, R.P., and Buck, A.H. (2013). Regulation of microRNA biogenesis and turnover by animals and their viruses. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 3525–3544.
53. Liu, L., Cheng, Z., and Yang, J. (2018). miR-23 regulates cell proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells in coronary heart disease. *Pathol. - Res. Pract.*
54. Lózsa, R., Csorba, T., Lakatos, L., and Burgyán, J. (2008). Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and

- temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. *Nucleic Acids Res.* *36*, 4099–4107.
55. Lukinavičius, G., Lapienė, V., Staševskij, Z., Dalhoff, C., Weinhold, E., and Klimašauskas, S. (2007). Targeted Labeling of DNA by Methyltransferase-Directed Transfer of Activated Groups (mTAG). *J. Am. Chem. Soc.* *129*, 2758–2759.
 56. Lukinavicius, G., Lapinaite, A., Urbanaviciute, G., Gerasimaite, R., and Klimasauskas, S. (2012). Engineering the DNA cytosine-5 methyltransferase reaction for sequence-specific labeling of DNA. *Nucleic Acids Res.* *40*, 11594–11602.
 57. Martin, J.L., and McMillan, F.M. (2002). SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *12*, 783–793.
 58. Masevičius, V., Nainytė, M., and Klimašauskas, S. (2016). Synthesis of S-adenosyl-L-methionine analogs with extended transferable groups for methyltransferase-directed labeling of DNA and RNA. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. Ed. Serge Beaucage Al 64*, 1.36.1-1.36.13.
 59. Michlewski, G., and Caceres, J.F. (2018). Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA rna.068692.118*.
 60. Mickutė, M., Nainytė, M., Vasiliauskaitė, L., Plotnikova, A., Masevičius, V., Klimašauskas, S., and Vilkaitis, G. (2018). Animal Hen1 2'-O-methyltransferases as tools for 3'-terminal functionalization and labelling of single-stranded RNAs. *Nucleic Acids Res.* *46*, e104.
 61. Mishra, S., Lahiri, H., Banerjee, S., and Mukhopadhyay, R. (2016). Molecularly resolved label-free sensing of single nucleobase mismatches by interfacial LNA probes. *Nucleic Acids Res.* *44*, 3739–3749.
 62. Moro, B., Chorostecki, U., Arikiti, S., Suarez, I.P., Höbartner, C., Rasia, R.M., Meyers, B.C., and Palatnik, J.F. (2018). Efficiency and precision of microRNA biogenesis modes in plants. *Nucleic Acids Res.*
 63. Motorin, Y., Burhenne, J., Teimer, R., Koynov, K., Willnow, S., Weinhold, E., and Helm, M. (2011). Expanding the chemical scope of RNA:methyltransferases to site-specific alkynylation of RNA for click labeling. *Nucleic Acids Res.* *39*, 1943–1952.

64. Nakajima, K., Kitazume, S., Angata, T., Fujinawa, R., Ohtsubo, K., Miyoshi, E., and Taniguchi, N. (2010). Simultaneous determination of nucleotide sugars with ion-pair reversed-phase HPLC. *Glycobiology* *20*, 865–871.
65. Navari, M., Etebari, M., Ibrahimi, M., Leoncini, L., and Piccaluga, P. (2018). Pathobiologic Roles of Epstein–Barr Virus-Encoded MicroRNAs in Human Lymphomas. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 1168.
66. Nepal, C., Coolen, M., Hadzhiev, Y., Cussigh, D., Mydel, P., Steen, V.M., Carninci, P., Andersen, J.B., Bally-Cuif, L., Müller, F., et al. (2016). Transcriptional, post-transcriptional and chromatin-associated regulation of pri-miRNAs, pre-miRNAs and moRNAs. *Nucleic Acids Res.* *44*, 3070–3081.
67. Oliver, C., Pradillo, M., Jover-Gil, S., Cuñado, N., Ponce, M.R., and Santos, J.L. (2017). Loss of function of Arabidopsis microRNA-machinery genes impairs fertility, and has effects on homologous recombination and meiotic chromatin dynamics. *Sci. Rep.* *7*, 9280.
68. Osipenko, A., Plotnikova, A., Nainytė, M., Masevičius, V., Klimašauskas, S., and Vilkaitis, G. (2017). Oligonucleotide-Addressed Covalent 3'-Terminal Derivatization of Small RNA Strands for Enrichment and Visualization. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *56*, 6507–6510.
69. Plotnikova, A., Baranauskė, S., Osipenko, A., Klimašauskas, S., and Vilkaitis, G. (2013). Mechanistic insights into small RNA recognition and modification by the HEN1 methyltransferase. *Biochem. J.* *453*, 281–290.
70. Plotnikova, A., Osipenko, A., Masevičius, V., Vilkaitis, G., and Klimašauskas, S. (2014). Selective Covalent Labeling of miRNA and siRNA Duplexes Using HEN1 Methyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 13550–13553.
71. Pradhan, A.K., Emdad, L., Das, S.K., Sarkar, D., and Fisher, P.B. (2017). The Enigma of miRNA Regulation in Cancer. *Adv. Cancer Res.* *135*, 25–52.
72. Quijano, E., Bahal, R., Ricciardi, A., Saltzman, W.M., and Glazer, P.M. (2017). Therapeutic Peptide Nucleic Acids: Principles, Limitations, and Opportunities. *Yale J. Biol. Med.* *90*, 583–598.

73. Rana, T.M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 23–36.
74. Ren, G., Xie, M., Zhang, S., Vinovskis, C., Chen, X., and Yu, B. (2014). Methylation protects microRNAs from an AGO1-associated activity that uridylyates 5' RNA fragments generated by AGO1 cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 6365–6370.
75. Roberts, J.T., and Borchert, G.M. (2017). Computational Prediction of MicroRNA Target Genes, Target Prediction Databases, and Web Resources. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1617, 109–122.
76. Rojas-Ríos, P., and Simonelig, M. (2018). piRNAs and PIWI proteins: regulators of gene expression in development and stem cells. *Dev. Camb. Engl.* 145.
77. Romano, G., Veneziano, D., Acunzo, M., and Croce, C.M. (2017). Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis* 38, 485–491.
78. Rorbach, G., Unold, O., and Konopka, B.M. (2018). Distinguishing mirtrons from canonical miRNAs with data exploration and machine learning methods. *Sci. Rep.* 8, 7560.
79. Rupaimoole, R., and Slack, F.J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 203–222.
80. Singh, A., Gautam, V., Singh, S., Sarkar Das, S., Verma, S., Mishra, V., Mukherjee, S., and Sarkar, A.K. (2018). Plant small RNAs: advancement in the understanding of biogenesis and role in plant development. *Planta* 248, 545–558.
81. Skalsky, R.L., and Cullen, B.R. (2010). Viruses, microRNAs, and Host Interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 123–141.
82. Staševskij, Z., Gibas, P., Gordevičius, J., Kriukienė, E., and Klimašauskas, S. (2017). Tethered Oligonucleotide-Primed Sequencing, TOP-Seq: A High-Resolution Economical Approach for DNA Epigenome Profiling. *Mol. Cell* 65, 554-564.e6.
83. Szymczyk, A., Macheta, A., and Podhorecka, M. (2018). Abnormal microRNA expression in the course of hematological malignancies. *Cancer Manag. Res.* 10, 4267–4277.

84. Tkaczuk, K.L., Obarska, A., and Bujnicki, J.M. (2006). Molecular phylogenetics and comparative modeling of HEN1, a methyltransferase involved in plant microRNA biogenesis. *BMC Evol. Biol.* 6, 6.
85. Tomkuvienė, M., Clouet-d'Orval, B., Černiauskas, I., Weinhold, E., and Klimašauskas, S. (2012). Programmable sequence-specific click-labeling of RNA using archaeal box C/D RNP methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 40, 6765–6773.
86. Tomkuvienė, M., Kriukienė, E., and Klimašauskas, S. (2016). DNA Labeling Using DNA Methyltransferases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 945, 511–535.
87. Tomkuvienė, M., Ličytė, J., Olendraitė, I., Liutkevičiūtė, Z., Clouet-d'Orval, B., and Klimašauskas, S. (2017). Archaeal fibrillarin-Nop5 heterodimer 2'-O-methylates RNA independently of the C/D guide RNP particle. *RNA N. Y. N* 23, 1329–1337.
88. Vilkaitis, G., Plotnikova, A., and Klimašauskas, S. (2010). Kinetic and functional analysis of the small RNA methyltransferase HEN1: The catalytic domain is essential for preferential modification of duplex RNA. *RNA* 16, 1935–1942.
89. Wang, M., Yu, F., Wu, W., Zhang, Y., Chang, W., Ponnusamy, M., Wang, K., and Li, P. (2017). Circular RNAs: A novel type of non-coding RNA and their potential implications in antiviral immunity. *Int. J. Biol. Sci.* 13, 1497–1506.
90. Wang, R., Zheng, W., Yu, H., Deng, H., and Luo, M. (2011). Labeling Substrates of Protein Arginine Methyltransferase with Engineered Enzymes and Matched S-Adenosyl-L-methionine Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 7648–7651.
91. Wang, X., Zhang, S., Dou, Y., Zhang, C., Chen, X., Yu, B., and Ren, G. (2015). Synergistic and Independent Actions of Multiple Terminal Nucleotidyl Transferases in the 3' Tailing of Small RNAs in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 11.
92. Wang, X., Wang, Y., Dou, Y., Chen, L., Wang, J., Jiang, N., Guo, C., Yao, Q., Wang, C., Liu, L., et al. (2018). Degradation of unmethylated miRNA/miRNA*s by a DEDDy-type 3' to 5' exoribonuclease Atrimmer 2 in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E6659–E6667.

93. Westholm, J.O., and Lai, E.C. (2011). Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* 93, 1897–1904.
94. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* 11, 228–234.
95. Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B., and Chen, X. (2006). HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res.* 34, 667–675.
96. Yu, B., Bi, L., Zhai, J., Agarwal, M., Li, S., Wu, Q., Ding, S.-W., Meyers, B.C., Vaucheret, H., and Chen, X. (2010). siRNAs compete with miRNAs for methylation by HEN1 in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 38, 5844–5850.
97. Yu, D., Ma, X., Zuo, Z., Wang, H., and Meng, Y. (2018). Classification of Transcription Boundary-Associated RNAs (TBARs) in Animals and Plants. *Front. Genet.* 9.
98. Zhai, L., Wang, L., Teng, F., Zhou, L., Zhang, W., Xiao, J., Liu, Y., and Deng, W. (2016). Argonaute and Argonaute-Bound Small RNAs in Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
99. Zhang, X., Jayaweera, D., Peters, J.L., Szecsi, J., Bendahmane, M., Roberts, J.A., and González-Carranza, Z.H. (2017). The Arabidopsis thaliana F-box gene HAWAIIAN SKIRT is a new player in the microRNA pathway. *PLoS ONE* 12.
100. Zhao, Y., and Srivastava, D. (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem. Sci.* 32, 189–197.
101. Zheng, B., Jeong, S., Zhu, Y., Chen, L., and Xia, Q. (2017). miRNA and lncRNA as biomarkers in cholangiocarcinoma(CCA). *Oncotarget* 8, 100819–100830.
102. miRBase. <http://www.mirbase.com>

PRIEDAI

SUMMARY

LIST OF ABBREVIATIONS

AdoHcy – S-adenosyl-homocysteine
AdoMet – S-adenosyl-L-methionine
BME – beta mercaptoethanol
BSA – bovine serum albumin
DTT – dithiothreitol
DMSO – dimethyl sulfoxide
dPAGE – denaturing polyacrylamide gel electrophoresis
EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid
ESI-MS – electrospray ionisation mass spectrometry
FRET – Förster Energy Resonance Transfer
HEN1 – small RNA 2'-O-methyltransferase HuaEnhancer 1
HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC – High-Performance Liquid Chromatography
LNA – locked nucleic acid
miRNA – microRNA
miRNA/miRNA* – miRNA duplex from guide miRNA strand and passenger miRNA* strand
mTAG – methyltransferase-directed Transfer of Activated Groups
NHS – N-hydroxysuccinimide
piRNA – PIWI-interacting RNA
pre-miRNA – hairpin-shaped miRNA precursor
PTGS – posttranscriptional gene silencing
RISC – RNA-induced silencing complex
RNase – ribonuclease
SA – streptavidin-specific aptamer DNA
SDS – sodium dodecyl sulfate
sRNA – small non-coding RNA
siRNA – small interfering RNA

INTRODUCTION

Small non-coding RNAs are RNAs that are found in most of eukaryotic organisms, including plants (Singh et al., 2018) and animals (Herkenhoff et al., 2018), as well as even some viruses (Navari et al., 2018). According to its structure, length, origin and biological functions, small non-coding RNAs (sRNAs) are classified into three main groups: 21-24 nt double-stranded microRNAs (miRNAs) and small-interfering RNAs (siRNAs) and also 20-35 nt single-stranded PIWI-interacting RNAs (piRNAs) (Hirose et al., 2014). Two groups of them, miRNAs that regulate up to 50 % of all protein-coding genes in mammals (Carè et al., 2018), and siRNAs that protect genome from viruses and transposable elements (Islam et al., 2018), are especially important (thus latter in this work “small RNAs” will mean primarily “miRNAs and siRNAs”).

Dysregulated expression of sRNAs (especially miRNAs) leads to pathological processes, including neurogenerative (Li et al., 2018) and cardiovascular (Liu et al., 2018) diseases or even cancer (Carvalho de Oliveira et al., 2018). Detection of changes in sRNAs profiles could allow diagnosing of mentioned diseases in early stages by so improving the chances for patients' survival. Unfortunately, there are no such method for quick and specific detection of sRNAs nowadays since all of existing ones are facing many practical difficulties, to mention some, unspecific detection of DNA molecules, inaccurate separation of sRNA fraction by RNA length shorter than 200 nt (although miRNAs and siRNAs are much shorter, 21-24 nt) and as a result impurities of other types of RNAs, like tRNAs and rRNAs, impossibility to distinguish mature sRNA from its precursors, long lasting procedures and as a result sRNA degradation, etc (Yu et al., 2018). Because of all these problems, obtained results can differ drastically from

the real sRNAs profiles that could lead to false diagnosis and incorrect treatment prognosis.

During the research of the doctoral dissertation, novel methods for miRNA and siRNA detection and/or purification using recombinant *Arabidopsis thaliana* methyltransferase HEN1 (further – HEN1) were in process of developing. The enzyme has preference to 21-24 nt RNA duplexes with 1-2 nt overhangs on its 3'-ends (Yang et al., 2006), in other words is specific to miRNA/miRNA* and siRNA/siRNA* molecules, which 2'-OH positions of 3'-ends are methylated by it from S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) cofactor in plants. Differently, animal miRNAs and siRNAs usually lack 2'-O-methylation *in vivo* (Libri et al., 2013), yet have similar structure to plant sRNAs, and so might be suitable for HEN1-catalysed modifications *in vitro*. We decided to exploit HEN1 high level specificity to its substrates and tried to adapt the enzyme for the Methyltransferase-Directed Transfer of Activated Groups (mTAG) (Lukinavičius et al., 2007) for targeted labeling of plant and animal miRNAs and siRNAs.

The studies will start from the evaluation of the natural miRNA/miRNA* and siRNA/siRNA* methylation process catalyzed by HEN1. The obtained data will let us to create the model of substrate modification by the methyltransferase that could later on be used for adapting of HEN1 to transfer other than methyl groups from synthetic AdoMet analogs. After that, we will study HEN1 ability to methylate (using AdoMet as a group donor) and alkylate (using AdoMet analogs) non-typical substrates to examine the possibility of using different DNA or LNA (locked nucleic acid) probes with different covalent modifications. Finally, all the data will be used for developing method(s) suitable for analysis of miRNA and siRNA molecules.

Aim of the study – to create an effective and specific method for labeling of miRNA and siRNA duplexes, suitable for detection and/or purification of these molecules, using recombinant small RNA methyltransferase HEN1 from *Arabidopsis thaliana* and synthetic its cofactor S-adenosil-L-methionine (AdoMet) analogs.

Main tasks of the study:

1. To investigate the methylation mechanism of recombinant *Arabidopsis thaliana* methyltransferase HEN1 and factors that are essential to the reaction.
2. To apply the methyltransferase HEN1 for transferring of side chains containing functional or reporter groups from synthetic AdoMet analogs to miRNA/miRNA* and siRNA/siRNA* duplexes.
3. To determine if methyltransferase HEN1 is able to modify miRNA and siRNA annealed to DNA, DNA-LNA or RNA-LNA strand. To study the ability of the methyltransferase to modify blunt-ended duplexes and substrates with different length overhangs. To evaluate the influence of covalent modifications incorporated in the substrates to the HEN1 reaction.
4. To develop novel miRNA and siRNA labeling technique(s) suitable for their purification, and/or specific visualization with fluorophores.

Scientific novelty and practical value of the study

For the first time the detailed HEN1 methylation *in vitro* mechanism was explained in this study. It was also proven that the methyltransferase is able to transfer side chains with different functional or reporter groups from synthetic AdoMet analogs (Ado-6-amine, Ado-6-azide, Ado-6-ethyne, Ado-11-amine, Ado-13-biotin and Ado-18-biotin) to miRNAs and siRNAs annealed with complimentary RNA, as well as DNA, DNA-LNA or RNA-LNA strand. Finally, it was showed that 1-2 nt 3'-overhangs are not obligatory to HEN1-catalized reactions: the enzyme is able to methylate and alkylate both blunt-ended duplexes, so as substrates with long non-modified strand 3'-overhangs, at least 33 nt in length.

All the mentioned discoveries about HEN1 catalysis mechanism and its abilities allowed us to create several new methods for miRNA and siRNA analysis. Novel HEN1-catalized one and two-steps specific covalent sRNA labeling with biotin conjugates allows to extract modified miRNAs and siRNAs with streptavidin-coated magnetic beads, thus purify and enrich the fraction of these molecules. Farther the two-step labeling of sRNAs with fluorophores (Cy5, Etherneone, etc.) could be used for targeted visualization of miRNAs and siRNAs. Moreover, the double-labeling of sRNAs with fluorophores let us apply highly sensitive FRET (Förster Energy Resonance Transfer) method specifically for miRNAs and siRNAs. Finally, the ability of HEN1 to modify miRNAs and siRNAs annealed to DNA with long 3'-end overhangs can be exploited for extraction of the methyltransferase-labeled sRNA using streptavidin-specific DNA aptamer probe.

Statements to be defended:

1. Recombinant *Arabidopsis thaliana* methyltransferase HEN1 is able to transfer *in vitro* side chains with functional or reporter groups from its cofactor S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) synthetic analogs to miRNA/miRNA* and siRNA/siRNA* duplexes.
2. Methyltransferase HEN1 is able to methylate and alkylate *in vitro* miRNA or siRNA strand, pre-annealed to DNA oligonucleotide or to oligonucleotide with chemical modifications.
3. Two-nucleotides overhangs on 3'-ends of substrate duplexes are not essential to HEN1 for methylation and alkylation. The methyltransferase is able to modify blunt-ended substrates or duplexes with long (at least several nucleotides) 3'-overhang of non-modified strand, which can incorporate functional nucleic acids, for example, aptamer sequence.
4. Methyltransferase HEN1 could be applied for specific labeling of miRNAs or siRNAs with a view to detection or extraction of these molecules.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of oligonucleotides and nucleic acids

All single stranded RNA, DNA and chemically modified oligonucleotides were obtained from Metabion, IDT, IBA and Exiqon. Double-stranded substrates were prepared by annealing of corresponding complementary single-stranded oligonucleotides. Total RNA from U2OS cell line and *E. coli* ER1727 was purified using TRIzol (Invitrogen) reagent. C/D box small RNA sR47-A31 and pre-miR173 RNA were produced by *in vitro* transcription using TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Fisher).

Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (dPAGE) analysis

Alkylation reactions were performed using 0.1 μM synthetic double-stranded nucleic acid substrates with 5'-³³P-labeled strand of interest in the presence of 0.25 μM HEN1 and 100 μM of corresponding cofactor in the Reaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.25 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, 0.2 u/ μl Thermo Fisher Ribolock RNase Inhibitor) for 1 h at 37°C. The reactions were quenched by addition of Proteinase K to final concentration of 1 mg/ml in Quench buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1.5 % SDS, pH 7.5). Samples were denatured for 5 min at 85°C and resolved on 12 % denaturing polyacrylamide gel with 7 M urea under denaturing conditions. Phosphor imaging plates exposed to radioactive gels were scanned by FLA-5100 Image Reader with a red 635 nm laser and IP filter and analyzed using Multi Gauge software (Fujifilm).

Kinetic analysis of modification reaction

Modification reactions under single-turnover conditions were carried out with 0.25 μM of HEN1, 0.1 μM duplex RNA or RNA/DNA with 5'-³³P-labeled strand of interest and 20-4000 μM AdoMet or needed concentration of other cofactor. Reactions were quenched using a Rapid Quench-Flow instrument

RQF-3 (KinTek) or manually and analyzed by dPAGE. Kinetic parameters were obtained by fitting experimental data to a single-exponential or double-exponential equation using GraFit software.

HPLC-MS analysis of alkylation products

1 μM of synthetic miRNA annealed with complimentary RNA or DNA strand and incubated with 1 μM HEN1 and 100 μM of corresponding cofactor. Samples were digested with 0.01 $\text{u}/\mu\text{l}$ P1 nuclease (Sigma-Aldrich) and dephosphorylated by 0.02 $\text{u}/\mu\text{l}$ FastAP (*Thermo Fisher*) in the Digestion buffer (10 mM NaAc, 1 mM ZnAc, pH 6.5) overnight at 37°C. Mixtures analyzed on a 1290 Infinity HPLC system (Agilent Technologies) and Q-TOF 6520 mass spectrometer in positive ion mode.

One-step biotin labeling

0.2 μM of corresponding double-stranded substrate was incubated with 0.5 μM HEN1 and 200 μM Ado-13-biotin or Ado-18-biotin. Reactions were quenched and samples incubated with streptavidin-coupled magnetic beads Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (*Thermo Fisher*) or Dynabeads M-270 Streptavidin (*Invitrogen*). For detaching of extracted biotinylated miRNA from magnetic beads samples incubated in 47.5 % formamide, 10 mM EDTA at 85°C for 5 minutes and analyzed by dPAGE as described above.

Two-step biotin labeling

0.2 μM of corresponding double-stranded substrate was incubated with 0.5 μM HEN1 and 200 μM Ado-6-amine or Ado-11-amine. Modified RNA was precipitated, resuspended in the Borate buffer (pH 9.5) and incubated with 20 mg/ml of biotin N-hydroxysuccinimide ester at room temperature for 150 min. Then samples were precipitated and treated with streptavidin-coupled magnetic beads and analyzed by dPAGE as described above.

Two-step fluorescent labeling

2 μM of corresponding double-stranded substrate was incubated with 1 μM HEN1 and 200 μM of Ado-6-amine (for Cy5 labeling) or Ado-6-ethyne (for Eterneon labeling) in the Reaction buffer for 1 h at 37°C. Samples incubated with 0.1 mg/ml Cy5 NHS-ester (GE Healthcare) in Borate buffer (pH 9) or with 0.25 mM Eterneon-480/635 azide (BaseClick) in the freshly prepared Click-chemistry buffer (0.2 M triethylammonium acetate, pH 7, 50 % dimethyl sulfoxide, 2 mM ascorbic acid, 0.5 mM Tris(benzyltriazolylmethyl)-amine, 0.25 mM CuSO_4), respectively. Mixtures resolved on native 12 % polyacrylamide gel. Fluorophore was detected with FLA-5100 Image Reader (Fujifilm) using a 635 nm laser (Cy5) or 473 nm laser (Eterneon), then gels stained with ethidium bromide and RNA was visualized using a 473 nm laser.

Selective miRNA labeling with fluorophore in a mixture of RNAs

The mixture of pre-miR173, C/D box small RNA sR47-A31 and animal piR3 (1 μM each) was added to 0.5 μM miR173/miR173* with 100 nM HEN1 and 100 μM Ado-6-ethyne. Precipitated RNAs were incubated with 250 μM Eterneon-480/635-azide (BaseClick) and the samples were analyzed by dPAGE. Eterneon fluorescence was detected by FLA-5100 Image Reader (Fujifilm) with a 473 nm laser. RNA was stained with ethidium bromide and visualized using a 473 nm laser.

Selective methylation of miRNA/DNA in mixture with *E. coli* total RNA

0.1 μM 5'-³³P-labeled miR173 or miR-210 mixed up with the total RNA pre-extracted from *E. coli* ER1727 in ratios of 1:10, 1:50 and 1:100 and 0.12 μM single-stranded corresponding complementary DNA-R2:D2. Obtained mixtures were re-annealed and incubated with 100 μM AdoMet and 0.25 μM HEN1 or without the protein. All the samples were treated with NaIO_4 , denatured for 5 min at 85°C and analyzed by dPAGE as described above.

Selective DNA-directed miRNA alkylation with U2OS total RNA

0.1 μM $5'$ - ^{33}P -labeled miR173 spike-in premixed with total RNA U2OS cells in 1:10 ratio and was re-annealed with complementary DNA(-FAM). Samples were alkylated for 1 hour at 37°C with 0.25 μM HEN1 and 100 μM Ado-11-amine cofactor and analyzed by dPAGE as described above.

Selective DNA-directed miRNA alkylation in a mixture of miRNAs

Mixtures composed of miR173, miR-26a* and let-7a* (0.1 μM each) with only one of them $5'$ - ^{33}P -labeled were annealed with 0.12 μM DNA173-R2:D2, DNA26a*-R2:D2 or DNA7a*-R2:D2. Six obtained mixtures were incubated with 100 μM Ado-6-amine and 0.25 μM HEN1. Samples analyzed by dPAGE.

Analysis of RNA/SA-DNA modification

miRNA of interest was annealed with complementary DNA oligonucleotide, containing streptavidin-specific aptamer (SA) on its $3'$ -terminus. 0.2 μM of corresponding $5'$ - ^{33}P -miRNA/SA-DNA substrate was incubated with 0.25 μM of HEN1 and 100 μM of corresponding cofactor. The reactions were quenched and the samples were analyzed by dPAGE as described above.

Analysis of RNA/SA-DNA extraction

2 μM of single-stranded SA-DNA or double-stranded miRNA/SA-DNA substrate with $5'$ - ^{33}P -labeled either RNA or DNA strand were treated with streptavidin-coupled magnetic beads Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Thermo Fisher). Alternatively, 2 μM $5'$ - ^{33}P -labeled miRNA was hybridized with 2 μM of complementary SA-DNA, incubated with 100 μM Ado-6-amine together with 0.5 μM HEN1 and then treated with streptavidin-coupled magnetic beads. Input, magnetic beads fraction and supernatant were analyzed by dPAGE as described above.

Selective miRNA labeling with fluorophore and SA-based extraction

Four mixtures composed of let-7a, miR-26a, miR173 and miR-210 (9 μM each) with only one of them 5'- ^{33}P -labeled in each mixture were annealed with 18 μM SA210-R2:s0. Then all four mixtures were incubated with 0.4 μM HEN1 and 200 μM Ado-6-azide. After that samples were treated with magnetic beads and incubated with CuBr : TBTA (3.3 mM : 6.6 mM) DMSO solution and 0.5 mg/ml Cy5.5-alkyne in 50 % DMSO. Mixtures were analyzed by dPAGE. Cy5.5 detected using 670 nm laser with R705 LPFR filter and 5'- ^{33}P -labeled RNA detected with 635 nm laser with IP filter.

Förster resonance energy transfer (FRET) assay in solution

0.1 μM of miR173/DNA173-R2:D0 or miR173/DNA173-R2:D0-Cy3 was incubated with 0.25 μM HEN1 and 100 μM Ado-6-amine. Then mixtures were treated with 1 mg/ml Cy5-NHS ester (GE Healthcare) for 3 h at 37°C. The fluorescence was measured with spectrofluorimeter FluoroMax-3 (Jobin Yvon Horiba) at 500 nm excitation and 520-580 nm emission as well as at 590 nm excitation and 610-580 nm emission, 1 nm increment, 0.2 sec integration time and 5 nm excitation/emission slit. Data analyzed with GraFit software.

Förster resonance energy transfer (FRET) assay on a gel

The alkylation reaction was performed using 0.1 μM of miR173/DNA173-R2:D0 or miR173/DNA173-R2:D0-Cy3 heteroduplexes, 0.25 μM HEN1 and 100 μM Ado-6-azide cofactor. The click-chemistry labeling was performed and samples fractionated by dPAGE. The gel was scanned with Fujifilm FLA-5100 Image Reader using 532 nm laser with O575 LPG filter for Cy3 donor detection, 670 nm laser with R705 LPFR filter for Cy5.5 acceptor detection and 532 nm laser with R705 LPFR filter for FRET detection.

RESULTS AND DISCUSSION

Study of HEN1 methylation mechanism

In order to apply HEN1 methyltransferase for developing of novel specific methods for labeling of miRNAs and siRNAs, which regulate considerable number of biological functions in our bodies, we needed to investigate the mechanism of action of the enzyme first. HEN1 crystallographic analysis shows that the methyltransferase have double-stranded RNA binding domains (dsRBD1 and dsRBD2) and also incorporates its substrate between its methyltransferase (MTase) and La motif containing (LCD) domains and by so “measures” the length of the substrate, which makes the enzyme highly specific towards 21-24 nt miRNA/miRNA* and siRNA/siRNA* duplexes (Huang et al., 2009) (Figure S1).

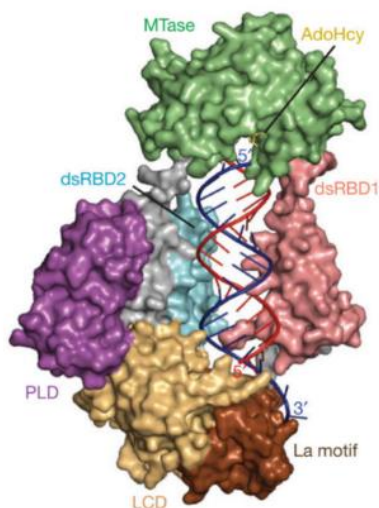


Figure S1. Structure of HEN1 in complex with a small RNA duplex and AdoHcy. dsRBD1 (pink) and dsRBD2 (cyan) – double-stranded RNA binding domains 1 and 2, respectively; PLD (purple) – PPIase-like domain; LCD (wheat) – La motif (chocolate) containing domain; MTase (green) – methyltransferase domain. Modified small RNA strand in red, non-modified – blue. AdoHcy – yellow (from Huang et al., 2009).

Since HEN1 has only one methyltransferase (MTase) domain but methylates double-stranded RNAs (dsRNAs) and each substrate molecule contains two targets for modification – 2'-OH groups on both the 3'-ends, consequently the full duplex methylation occurs in two steps via intermediate hemimethylated step. First, the strand, which appears in MTase domain, is modified, then HEN1-RNA/RNA^{CH₃}-AdoHcy complex disassembles and another substrate strand traps into MTase domain for methylation (Figure S2).

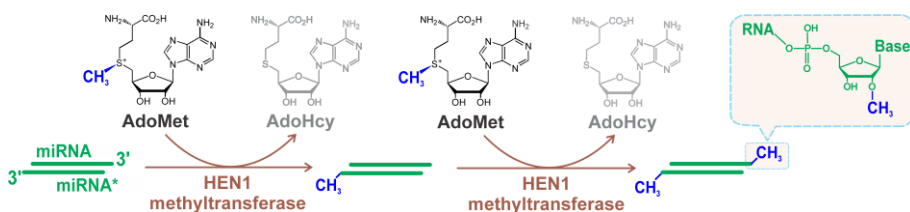


Figure S2. The scheme of HEN1-catalyzed methylation of miRNA/miRNA*. First, only one of duplex strands is 2'-O-methylated on its 3'-terminus, then hemimethylated substrate changes its orientation in MTase domain of HEN1 and another strand is modified so the duplex becomes fully-methylated.

To evaluate if HEN1 has preference which of the duplex strand to methylate first, guide miRNA or passenger miRNA*, what could influence which of them would be associated with RNA-induced silencing complexes (RISC), we produced a series of kinetic experiments. We figured out that in 4/5 of all the cases passenger miR173* is methylated first and in only 1/5 of all the cases guide miR173, which is usually associated with RISC, is methylated first (Table S1). Thus it looks unlikely that *in vitro* HEN1 alone is able to „decide“ which of miR173/miR173* strands will become guide strand associated with RISC, however *in vivo* other proteins in the complex might alter HEN1 preferences. It is seen as well that methylation parameters of hemimethylated substrates are similar to non-methylated ones (Table S1). Such results mean that the presence of methyl group on 3'-end of non-modified strand makes no influence to modification process of the strand which 3'-end is located in the methyltransferase domain of HEN1.

Table S1. Kinetic parameters of modification of non-methylated and hemimethylated guide (left) and passenger (right) strands of miR173/miR173* duplex. The amplitude of the rate constant is expressed as a percentage of the total amplitude: amplitude of the passenger strand methylation shows the percentage of cases when this strand is methylated first (75-86 % in non-methylated duplex and 86-94 % in hemimethylated duplex). Reaction rates (min^{-1}) depending on AdoMet concentrations (20-2000 μM) are indicated. The guide and passenger strand methylation data sets were fitted using a single- or two-exponential model, respectively.

AdoMet	Guide strand		miR173/miR173* ^{CH3}		Passenger strand		miR173 ^{CH3} /miR173*	
	miR173/miR173*		miR173/miR173* ^{CH3}		miR173/miR173*		miR173 ^{CH3} /miR173*	
	Rate (min^{-1})	Amplitude (%)	Rate (min^{-1})	Amplitude (%)	Rate (min^{-1})	Amplitude (%)	Rate (min^{-1})	Amplitude (%)
2000 μM					199 ± 12	86 ± 3	167 ± 12	94 ± 3
					7.2 ± 3	14 ± 3	11 ± 13	6 ± 3
1000 μM					152 ± 6	84 ± 1	154 ± 10	91 ± 5
					6.0 ± 1	16 ± 1	20 ± 13	9 ± 4
500 μM					91 ± 3	79 ± 1	86 ± 5	86 ± 4
					6.0 ± 1	21 ± 1	13 ± 6	12 ± 4
300 μM					58 ± 3	83 ± 3	55 ± 3	87 ± 4
					4.6 ± 1	17 ± 2	7.8 ± 3	13 ± 4
100 μM	4.5 ± 0.2	100	7.0 ± 0.2	100	35 ± 3	79 ± 3	38 ± 3	87 ± 5
					2.9 ± 1	21 ± 3	3.3 ± 2	13 ± 5
50 μM					15 ± 1	75 ± 4	16 ± 2	86 ± 12
					2.0 ± 1	25 ± 4	3.8 ± 3	14 ± 11
20 μM	1.8 ± 0.1	100	6.6 ± 0.2	100	5.5 ± 1	81 ± 21	7.0 ± 1	87 ± 13
					1.4 ± 1	19 ± 19	3.2 ± 2	13 ± 13

HEN1 homologs in animals show preferences to some 3'-terminal nucleobases comparing with another, for example *Drosophila melanogaster* Hen1 prefers adenosine ~ 5 times more than guanosine: A (269 %) > C (137 %) > U (100 %) > G (44 %) (Kirino and Mourelatos, 2007). To investigate if the chemical base of the modified nucleotide would influence the reaction parameters of *Arabidopsis thaliana* HEN1 the methylation of miR173 with different 3'-terminal nucleobases were compared (Table S2).

Table S2. Methylation parameters of miR173/miR173* with different 3'-terminal nucleobase of miR173 strand. Methylation reaction rates (min^{-1}) and amplitudes (%) are indicated.

Guide strand			Passenger strand		
miRNA	Rate (min^{-1})	Amplitude (%)	miRNA	Rate (min^{-1})	Amplitude (%)
miR173-C (wt)	4.5 ± 0.2	100	miR173*	35 ± 3.0	79 ± 3
miR173-G	5.7 ± 0.2	100		2.9 ± 0.6	21 ± 3
miR173-A	37 ± 7.0	45 ± 7	miR173*	35 ± 2.0	78 ± 3
	5.4 ± 0.8	55 ± 7		4.6 ± 0.9	22 ± 3
miR173-U	3.7 ± 0.2	100			

Obtained data showed that in the methylation rates are similar between all the four substrates that means that 3'-terminal nucleobase makes little influence to methylation reaction by HEN1.

On the other hand, in case with miR173-A although the methylation rates were similar to other substrates the amplitude was different meaning that HEN1 might change its priority in the orientation of its binding with the substrate. Thence we decided to study the influence of impaired nucleotides within the duplex, which may change the secondary and tertiary structures of the substrate. This was important because usually animal miRNA/miRNA* duplexes (and the aim of the study was to create a method for human miRNA labeling) have more impaired nucleotides than plant miRNA/miRNA do (<https://www.mirbase.com>), so we needed the proof that plant methyltransferase HEN1 is able to act on animal RNAs.

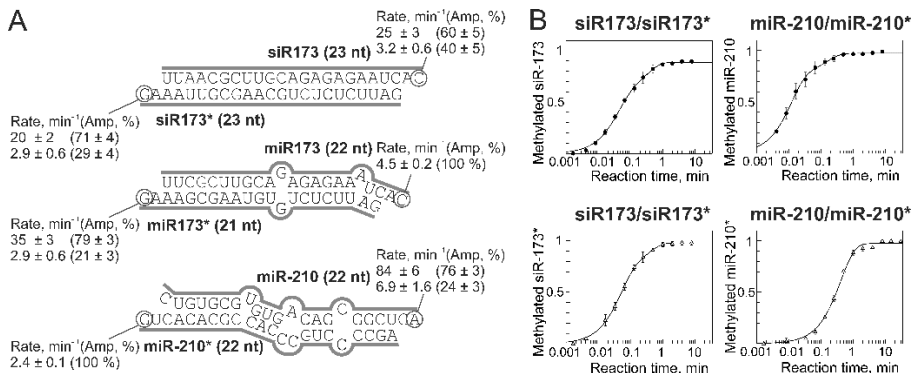


Figure S3. HEN1 methylation of the substrates. A. Sequences, secondary structures and methylation reaction parameters of siR173/siR173* (top), miR173/miR173* (center) and miR-210/miR-210* (bottom). B. Methylation charts fitted in GraFit.

After the experiments, we figured out that the methylation rate of the human miR-210/miR-210* which contains six unpaired nucleotides within the duplex is similar or even higher than plant miR173/miR173 methylation rate (Fig. S3). Differently in this case guide miR-210 strand was methylated first in 3/4 of the cases. In case of the fully-complimentary siR173/siR173* the methylation rates were similar, however HEN1 showed no preference which

of the duplex strand methylate first, thus probably the structure of the substrate may influence the preference for HEN1 binding orientation, but not the rate of the reaction (Fig. S3).

HEN1 application for miRNA/miRNA* labeling

During the study of the dissertation HEN1 methyltransferase was adapted for mTAG (Methyltransferase-directed Transfer of Activated Groups) technology, which exploits methyltransferase specificity to its substrate to transfer other than methyl groups from synthetic AdoMet analogs (Figure S4).

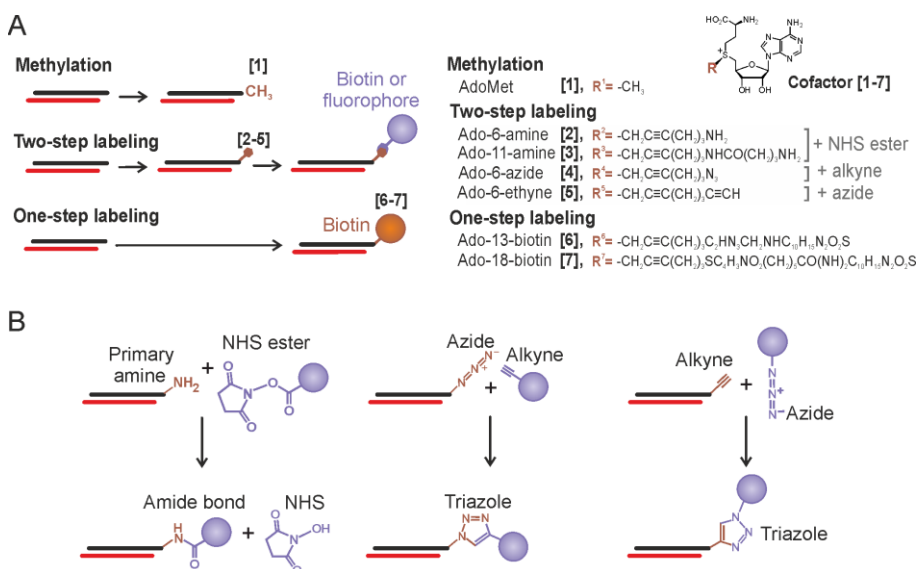


Figure S3. One and two-steps labeling of miRNA and siRNA duplexes by HEN1. A. The adaptation of HEN1 for mTAG technology scheme (left) and formulas of the synthetic cofactors studied (right). B. The second step chemical reactions of the two-step labeling schemes.

The experiments showed that HEN1 is able to transfer side chains from all the studied AdoMet analogs, that was confirmed by the modified RNA shift in denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (dPAGE) and by High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (HPLC-MS) assay (Fig. S4, A and B, respectively).

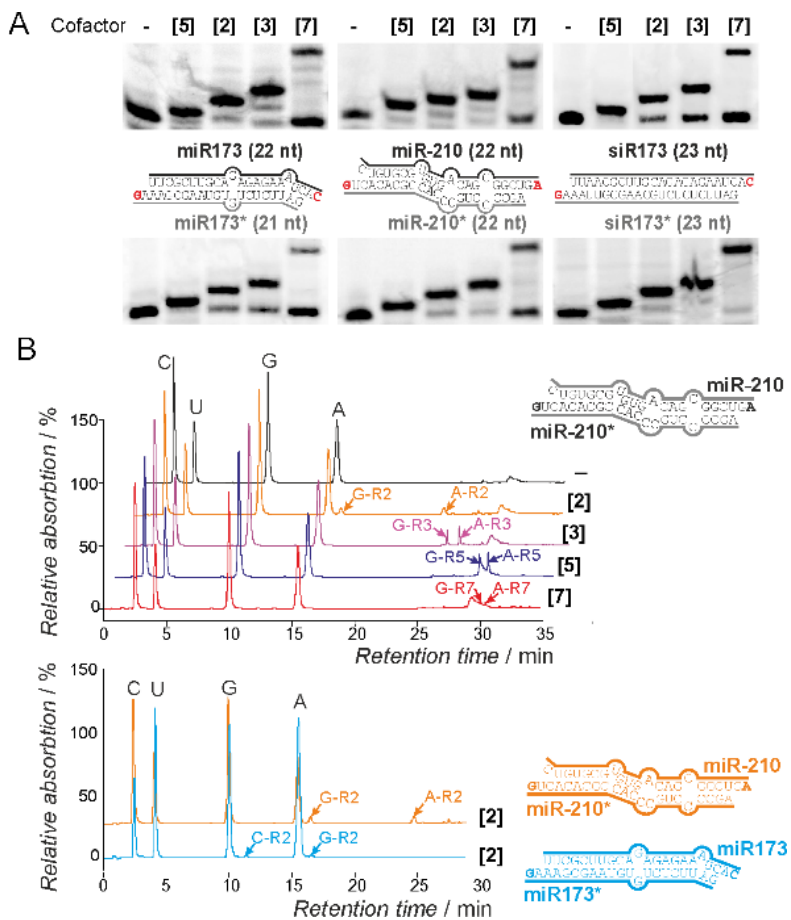


Figure S4. HEN1 alkylates miRNA/miRNA* and siRNA/siRNA* duplexes using synthetic AdoMet analogs. **A.** dPAGE analysis of modified miR173 and miR173* (left), miR-210 and miR-210* (center) or siR173 and siR173* strands (right). Sequences and secondary structures of the substrates are given, modified 3'-terminal nucleotides are indicated in red. Alkylated part of the sample is seen by the shift in electrophoretic gel. Cofactors: [2] – Ado-6-amine, [3] – Ado-11-amine, [5] – Ado-6-ethyne, [7] – Ado-18-biotin. **B.** HPLC chromatograms of nucleoside-degraded alkylation products. In addition to 4 types of non-modified nucleosides derived from the central part of the duplexes, two cofactor-specific peaks of alkylated 3'-terminal nucleosides are observed in each chromatogram.

Moreover, the modification of substrates with synthetic AdoMet analogs was very effective and in most cases was close to 100 %. Even the lowest alkylation percentage observed with Ado-18-biotin [7] cofactor, containing the longest side chain, was 50 % or more of substrate molecules

alkylated. This fact is even more unexpected having in mind that other methyltransferases previously adapted to mTAG technology showed only partial substrate modification, starting from only few percent of modified molecules and in some cases even mutagenesis of wild-type methyltransferase was required to adapt the enzyme's active center for larger cofactors (Lukinavicius et al., 2012; Lukinavičius et al., 2007). Such high efficiency of the alkylation reactions produced by HEN1 allowed us to create methods for one- and two-step small RNA labeling with biotin (Fig. S5).

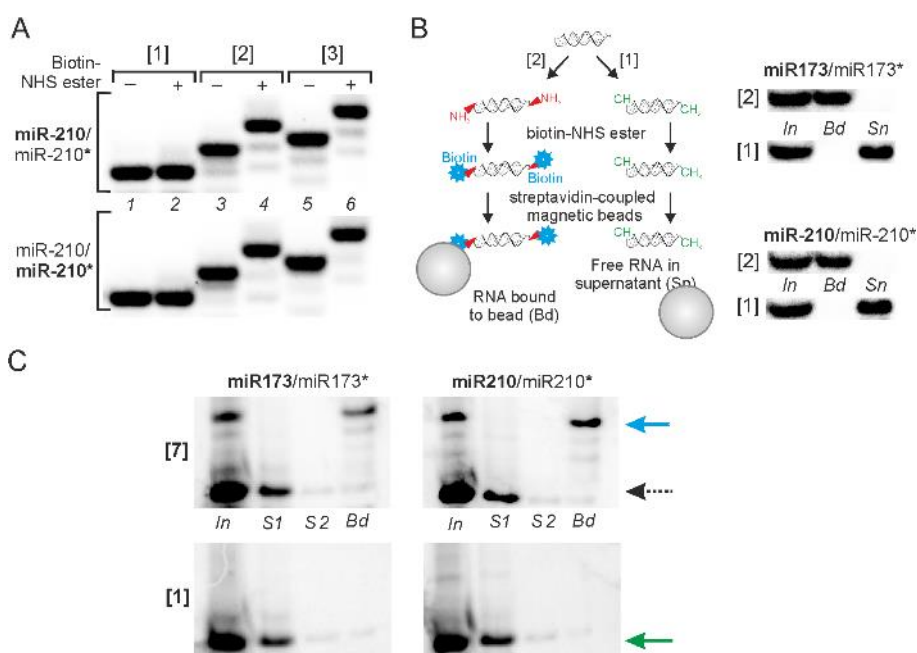


Figure S5. Two-step (A and B) and one-step (C) miRNA/miRNA* labeling with biotin conjugates. A. miR-210/miR-210* with ^{33}P -labeled miR-210 strand (top) or miR-210* strand (bottom) was incubated with HEN1 and AdoMet [1], Ado-6-amine [2] or Ado-11-amine [3]. Then samples 2, 4 and 6 were labeled with biotin-NHS ester. B. Experiments scheme (left) and results (right) of two-step ^{33}P -miRNA/miRNA* biotinylation with subsequent extraction using streptavidin-coupled magnetic beads. In – starting input, Bd – magnetic beads fraction, Sn – supernatant. C. One-step miR173 (left) or miR-210 (right) biotinylation using HEN1 and Ado-18-biotin [7] or AdoMet [1] (control) with subsequent extraction using magnetic beads. In – starting input, S1 – reaction supernatant, S2 – after-wash supernatant. Bd – magnetic beads fraction. Methylated sample indicated with green arrow, biotinylated – blue arrow, non-modified black dotted arrow.

In two-step biotinylation method miRNA/miRNA* or siRNA/siRNA* duplex is first alkylated by HEN1 with a cofactor side chain incorporating a functional group, usually primary amine from Ado-6-amine or Ado-11-amine cofactors. During the second step modified substrate is incubated with biotin conjugate, such as biotin-N-hydroxysuccinimide ester (NHS ester). NHS ester reacts with primary amine (Fig. S3, B) and the biotinylated RNA might be purified from various solutions using streptavidin-coupled magnetic beads. All the stages, miRNA labeling with functional groups from AdoMet analogs, primary amine reaction with biotin conjugates and biotinylated substrate extraction turned up to be very specific and effective – up to 100 % of ³³P-labeled miRNR was extracted with magnetic beads (Fig. S5, A and B). One-step biotinylation of small RNAs is even faster since the biotin reporter group is transferred directly with side chain from Ado-18-biotin cofactor, then substrates also are extracted effectively (Fig. S5, C).

After successful covalent joining of biotin via NHS ester to the primary amine on RNR, we decided to adopt this technology for two-step small RNA labeling with fluorophore-NHS esters. Covalent attachment of a fluorophore targeted to miRNA/miRNAs* and siRNA/siRNAs* due to HEN1 specificity to these molecules could allow derivation of selective small RNA visualization techniques.

miRNA/miRNA* two-step modification labeling with Cy5-NHS ester was effective and specific (Fig. S6, A). We also tried modification of substrates with different cofactor Ado-6-ethyne for highly specific click-chemistry reaction with Eterneon-azide. It was successful as well (Fig. S6, B). Finally, we showed that the reaction of miR173/miR173* labeling with Eterneon azide is selective and might be produced in mixture of different types RNAs (Fig. S6, C). Interestingly, even the precursor of miRNR, pre-miR173 was not labeled with the fluorophore, and only mature duplexes, ready for association with RISC, are detected using this method.

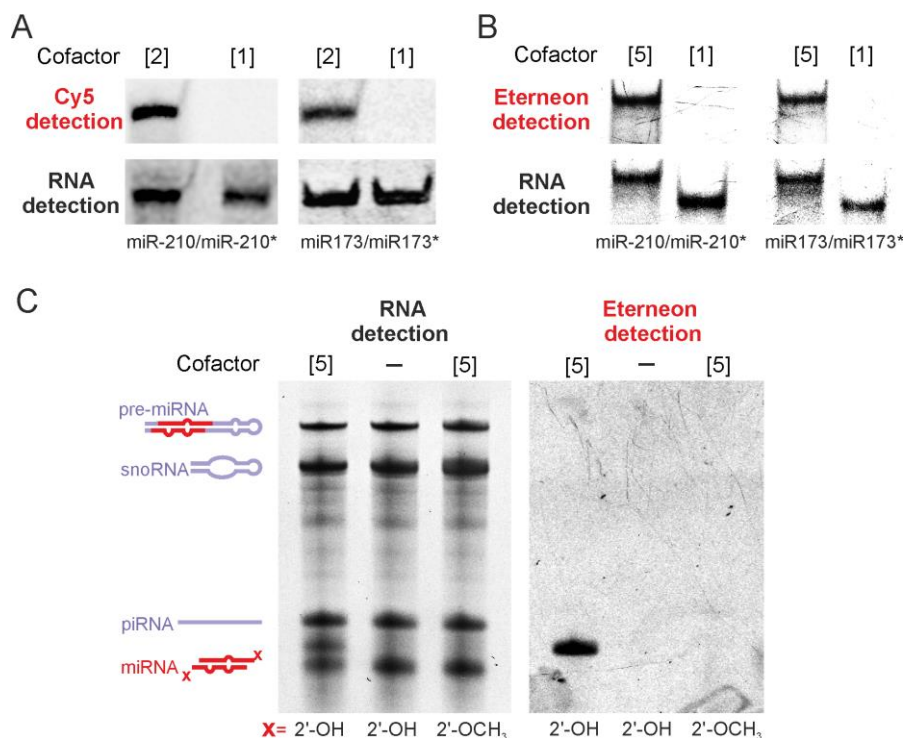


Figure S6. Two-step miRNA/miRNA* labeling with fluorophores. A. miR-210/miR-210* (left) or miR173/miR173* (right) was alkylated with HEN1 and Ado-6-amine [2] or methylated with AdoMet (control). During the second step, primary amine which was transferred with the side chain from Ado-6-amine reacted with Cy5-NHS ester. Methylated control didn't react with fluorophore conjugate. B. Analogical experiment of substrate alkylation from Ado-6-ethyne [5] cofactor with subsequent incubation together with Eterneon-azide for Click-chemistry reaction. C. miR173/miR173* (22/22 nt) was ethyne-modified by HEN1 and then eterneon-labeled in the mixture of RNAs: pre-miR173 (102 nt), mRNA sR47-A31 (64 nt) and piR3 (28 nt). Only substrate with free 2'-OH incubated with HEN1 and Ado-6-ethyne [5] is fluorophore-labeled, no reaction is observed in absence of cofactor (-) or with methyl-blocked substrate's 2'-O-CH₃ group.

DNA-based miRNA labeling with HEN1

After the research of miRNA/miRNA* and siRNA/siRNA* labeling techniques we checked if the HEN1 is able to modify miRNA(*) or siRNA(*) strand annealed to DNA oligonucleotide. Surprisingly, the modification efficiency of RNA/DNA substrates was similar to labeling of natural RNA/RNA duplexes (Fig. 7).

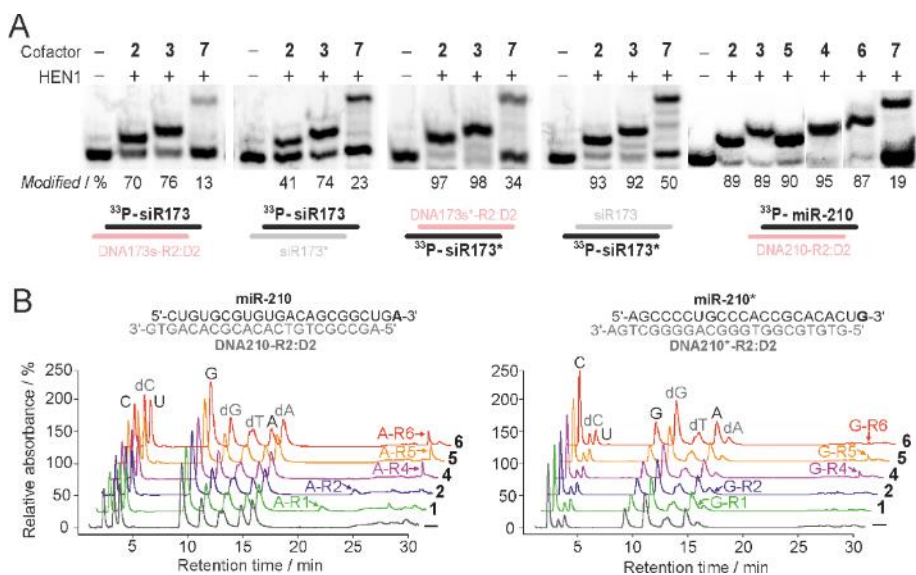


Figure S7. Alkylation of miRNA/DNA substrates with 2 nt 3'-overhangs. A. Comparison of alkylation of siR173 (first two blocks) and siR173* (second two blocks) in duplexes with DNA or RNA, respectively, and miR-210 alkylation in duplex with complimentary DNA (last block). Cofactors: Ado-6-amine [2], Ado-11-amine [3], Ado-6-azide [4], Ado-6-ethyne [5], Ado-13-biotin [6], Ado-18-biotin [7]. Percentages of the modified samples are indicated. B. HPLC chromatograms of nucleoside-degraded alkylation products. In addition to 4 types of ribonucleosides (C, U, G, A) and 4 types of deoxyribonucleosides (dC, dT, dG, dA) derived from the central part miRNA or DNA strand, respectively, one cofactor-specific peak of alkylated 3'-terminal ribonucleoside is observed in each chromatogram.

We also showed that alkylation reaction only slightly depends on chemical basis of modified 3'-terminal nucleotide (Fig. S8), thus, the method might be used with all the miRNAs and siRNAs independently from its sequence.

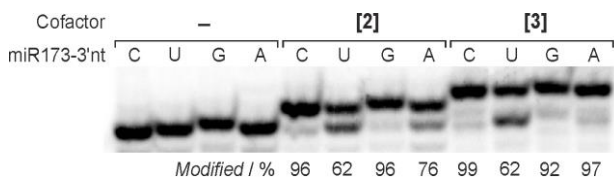


Figure S8. Alkylation dependence on 3'-terminal nucleobase. Different variant of miR173 with 3'-terminal C, U, G or A was annealed to complimentary DNA and alkylated with HEN1 and Ado-6-amine [2] or Ado-11-amine [3]. Percentages of the modified samples are indicated.

The ability of HEN1 to modify the whole group of nucleic acid substrates independently from its sequence is determined by the mechanism of substrate recognition of the enzyme. First of all, HEN1 is 2'-O-methyltransferase meaning that the position of modification is specific only to RNA molecules, since DNA molecules has no 2'-OH group. Secondly, the methyltransferase has two double-stranded RNA-binding motifs thus has preference to double-stranded, but not single-stranded RNA (Huang et al., 2009; Vilkaitis et al., 2010). Finally, HEN1 incorporates the substrate molecule inwards and interacts with both of the duplex ends by so „measuring“ the substrate length with maximal preference to 21-24 nt double-stranded RNAs (Huang et al., 2009).

All this makes HEN1 highly specific to its substrates, miRNA/miRNA* and siRNA/siRNA* duplexes, and as it was shown in this study miRNA/DNA and siRNA/DNA duplexes as well. Thus this study was the first time when mTAG technology was applied to potentially all the sequences of a separate group of nucleic acids, but not to a specific sequence recognition of different groups of RNA or DNA molecules.

Such HEN1 abilities allowed us to develop DNA-addressed specific miRNA and siRNA one- and two-step biotinylation techniques (Fig. S9) and two-step labeling with fluorophore techniques (Fig. S10).

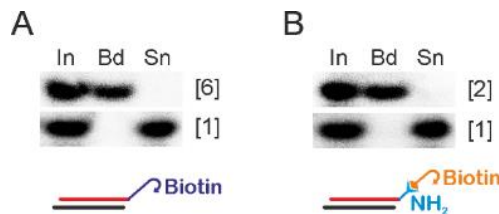


Figure S9. Purification of one- or two-step biotinylated miRNA/DNA using magnetic beads. A. miR-210/DNA210-R2:D2 substrate incubated with HEN1 and Ado-13-biotin [6] or AdoMet [1] (control) and treated with magnetic beads. B. miR-210/DNA210-R2:D2 incubated with HEN1 and Ado-6-amine [2] or AdoMet [1] (control), then labeled with biotin-NHS ester and treated with magnetic beads. In – primary input, Bd – magnetic beads fraction, Sn – supernatant.

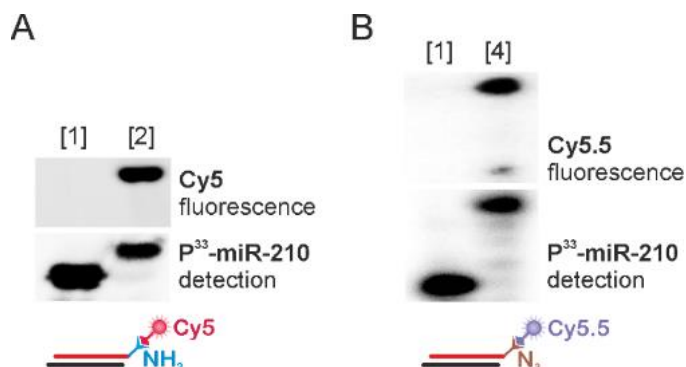


Figure S10. Two-step labeling of miRNA/DNA with fluorophores. A. miR-210/DNA210-R2:D2 substrate incubated with HEN1 and Ado-6-amine [2], labeled with Cy5-NHS ester and visualized on gel. B. miR-210/DNA210-R2:D2 was incubated with HEN1 and Ado-6-azide [4], then treated with Cy5.5-ethyne and visualized on gel.

We also found out that 2 nt 3'-overhangs of substrate RNAs are not always preferred by HEN1, as it was proposed earlier (Yang et al., 2006) and that the methyltransferase is able to modify blunt-ended substrates as well, and that some blunt-ended duplexes are modified even better than ones with overhangs (Fig. S11).

Finally, we showed that DNA strand in miRNA/DNA duplex might have up to 7 nt 3'-overhang which doesn't interfere with modification reaction and probably even longer overhang, since this substrate terminus is exposed to outer surface of the enzyme (Fig. S12). This HEN1-substrate interaction feature was exploited when DNA 3'-terminus was elongated by 29-33 nt overhang, incorporating streptavidin-specific aptamer (SA). miR173 and miR-210 annealed to such DNA-SA probe was partially or fully-methylated and alkylated by HEN1 (Fig. S13, A). On the other hand, the SA part could bind streptavidin-coupled magnetic beads so that it could be extracted together with the complimentary miRNA after the HEN1 labeling stage. The extraction of miRNA-binded DNA-SA was even more effective than of free DNA-SA, probably double-stranded structure stabilized the molecule orientation, and even the Ado-6-azide side chain on miRNA didn't interfere (Fig. S13, B).

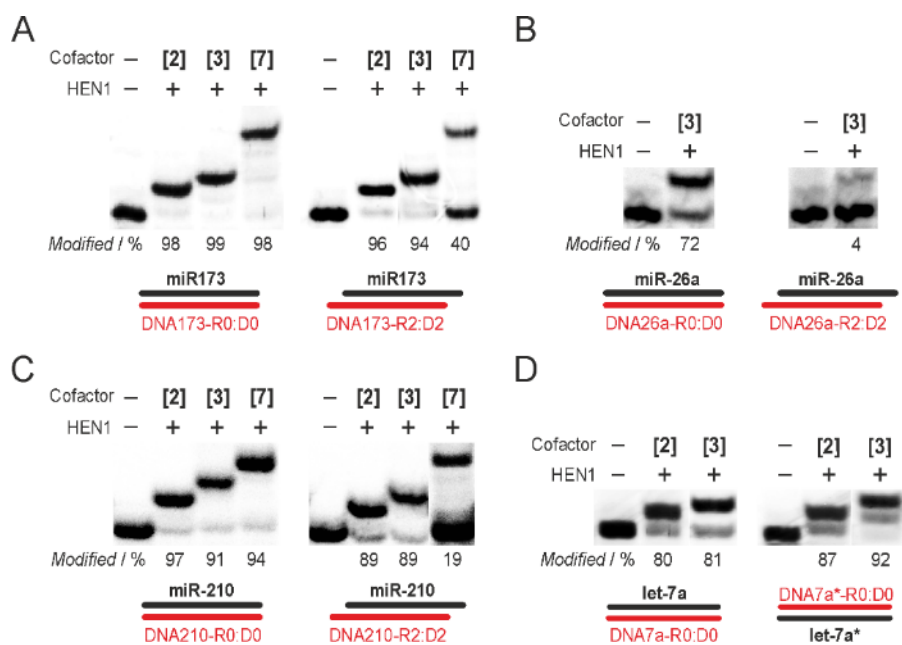


Figure S11. Comparison of modification of miRNA/DNA substrates with blunt ends (-R0:D0) and substrates with 2 nt overhangs on DNA and RNA 3'-termini (-D2:R2). miR173 (A), miR-26a (B) or miR-210 (C) alkylated in blunt-ended heteroduplex (left blocks) or 2 nt overhanged one (right blocks). D. let-7a (left block) or let-7a* (right block) alkylated in blunt-ended heteroduplexes. Cofactors: Ado-6-amine [2], Ado-11-amine [3], Ado-18-biotin [7]. Percentages of the modified samples are indicated.

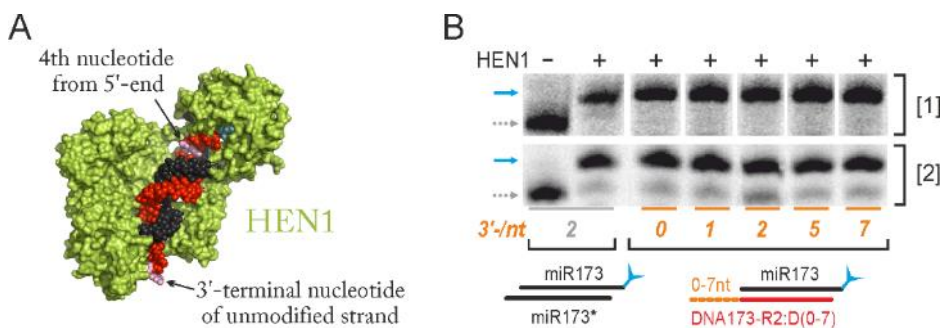


Figure S12. Modification of miRNA/DNA substrates with long DNA 3'-overhang. A. HEN1-miRNA duplex-AdoHcy tertiary complex. 3'-terminus of non-modified strand and 4th position of it are exposed outside from the enzyme. B. Methylation and alkylation of miR173 annealed to DNA with 0-7 nt 3'-overhangs. Cofactors: AdoMet [1], Ado-6-amine [2].

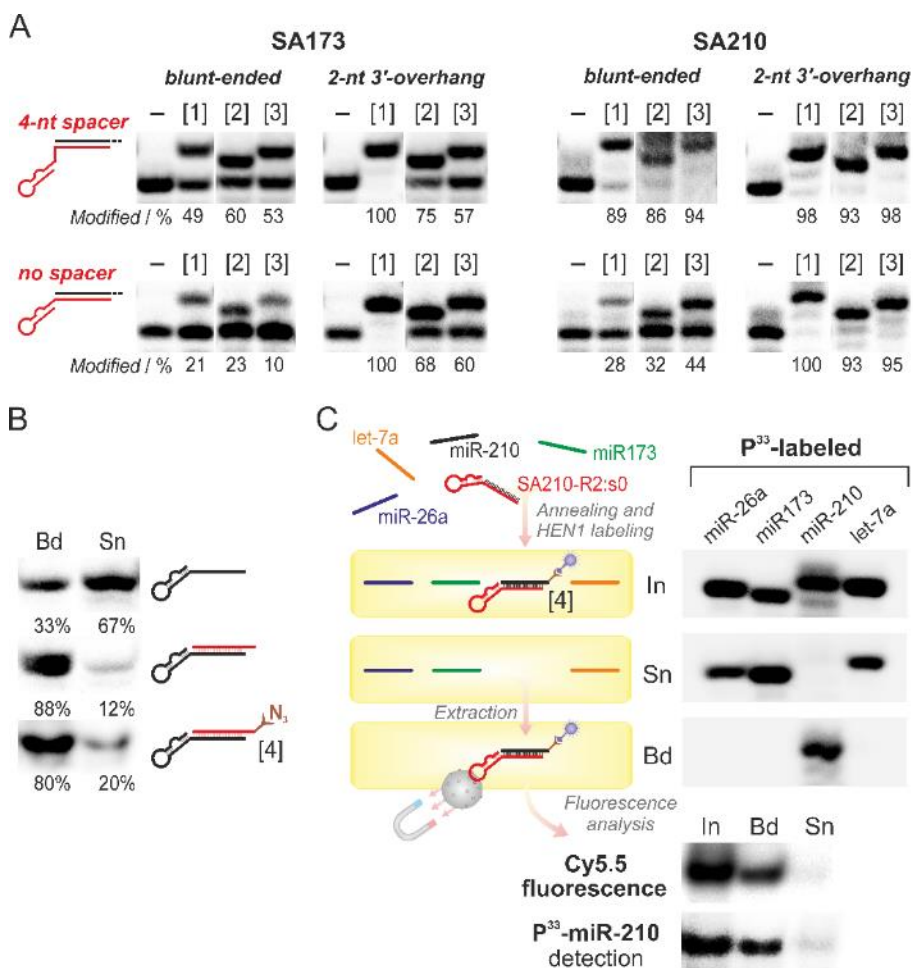


Figure S13. Application of DNA-SA probe for miRNA labeling and extraction. A. HEN1 modifies miR173 (left block) and miR-210 (right blocks) annealed to DNA probes with 29 nt streptavidin-specific aptamer on its 3'-terminus, joined via 4 nt spacer (top row) or directly (bottom row). Cofactors: AdoMet [1], Ado-6-amine [2], Ado-11-mine [3]. Percentages of the modified samples are indicated. B. Extraction of DNA-SA with magnetic beads. Single stranded SA210-R2:j0 (top), double-stranded miR-210/SA210-R2:j0 (center) or pre-incubated with HEN1 and Ado-6-azide [4] double-stranded miR-210/SA210-R2:j0 (bottom) were extracted with magnetic beads fraction (Bd) or left in the supernatant (Sn). Percentages of extracted samples are indicated. C. Specific miRNA extraction with DNA-SA. Mixture made up of 4 miRNAs (let-7a, miR-26a, miR173 and miR-210) and miR-210-complementary SA210-R2:j0 DNA was annealed and incubated with HEN1 and Ado-6-azide [4], then with Cy5.5-ethyne and treated with magnetic beads. miR-210 was selectively labeled with fluorophore and purified from the mixture with magnetic beads. In –input, Bd –magnetic beads fraction, Sn – supernatant.

Finally, we tried to label miR-210 with Ado-6-azide and Cy5.5-ethyne in a mixture with three other miRNAs and to extract it with magnetic beads using DNA-SA probe (Fig. S13, C, see the schematic representation of the experiment on the left). As we expected, miR-210 sample was fully extracted from the mixture with magnetic beads fraction (Bd) and all the other three miRNA didn't bind to the beads and were left in supernatant (Sn) (Fig. S13, C, top three gels). The fluorescence of Cy5.5 was observed in the same fractions (In and Bd) and with similar intensity, in which the ^{33}P -miR-210 signal was detected, meaning that miR-210 was effectively labeled with fluorophore (Fig. S13, C, bottom two gels).

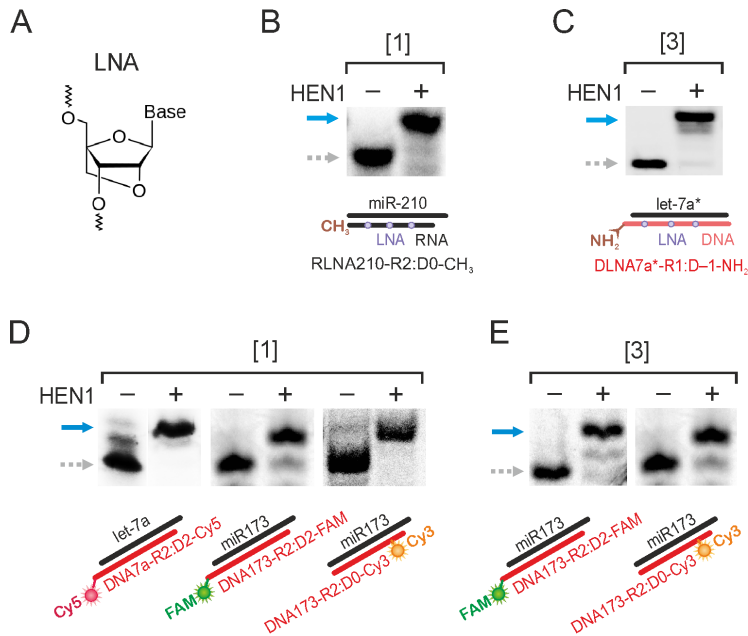


Figure S14. Labeling of substrates with incorporated chemical modifications. A. Locked nucleotide structure. B. Modification of miR-210 annealed to 3'-methylated RNA with 3 incorporated LNA nucleotides with AdoMet [1]. C. Alkylation of miR-210 annealed to 3'-NH₂-modified DNA with incorporated LNA nucleotides with Ado-11-amine [3]. D. Methylation of miRNA/DNA substrates with 3'-terminal fluorophore - Cy5 (left) or FAM (center) or with internal Cy3 fluorophore (right). E. Alkylation of miRNA/DNA with 3'-terminal FAM (left) or internal Cy3 (right) fluorophore using Ado-11-amine [3] cofactor. Blue arrow – modified RNA, grey dotted arrow – intact.

Locked nucleic acids (LNA) are synthetic mono- and oligonucleotides, which has chemical bridge between 2'-O or 4'-C (Fig. S14, A) and that are stable against RNase and DNase degradation (Fontenete et al., 2013). LNA-containing oligonucleotides are characterized by increased ability of primer to hybridise with target nucleic acid, elevated affinity and specificity to the target and is by faster hybridization kinetics (Fontenete et al., 2013). The incorporation of few LNA nucleotides within the DNA or RNA probe significantly increases the stability of double-stranded structure and even might be used to distinguish oligonucleotide variants which sequences differ by just one or few positions (Mishra et al., 2016). For example, this technology might be used in the future to separate isomiRs – miRNA isomers, different by one or few nucleotides.

We decided to study if HEN1 is able to modify substrates with LNA nucleotides. It was shown that HEN1 fully-methylates miR-210 pre-annealed with 3'-CH₃-modified RNA oligonucleotide, incorporating three LNA nucleosides (Fig. S14, B). In addition, HEN1 is able to fully-alkylate let-7a miRNA, pre-annealed with 3'-NH₂-modified DNA oligonucleotide containing LNA nucleotides using Ado-11-amine cofactor (Fig. S14, C).

3'-methyl (-CH₃) or 3'-amine (-NH₂) on the probe oligonucleotide are not the only modifications which are tolerated by HEN1 methyltransferase. Since these positions are exposed to the surface (Fig. S12, A) and that 29-33 nt DNA-SA 3'-overhang doesn't interfere with HEN1 reaction we decided that even large fluorophore molecules could be located in this position. As it is seen in Fig. S14 D and E, let-7a and miR173 miRNAs are fully methylated and alkylated in heteroduplexes with Cy5 or FAM fluorophore 3'-labeled DNA strand. The internal Cy3 fluorophore, located in the 4th DNA probe position from the 5'-terminus also is fully-modified by HEN1 (Fig. S14, D, last block) since the fluorophore is exposed to the outer surface of the methyltransferase (Fig. S12, A)

The latter finding allowed us to adapt highly sensitive FRET (Förster Energy Resonance Transfer) technology for miRNAs and siRNAs. Cy3 on the 4th position of DNA strand acts as the donor fluorophore and when excited with 500-532 nm light it transfers the energy to Cy5 or Cy5.5 acceptor fluorophore, attached by two-step labeling technique to miRNA 3'-terminus, which emits 670 nm or 694 nm light, respectively (Fig. S15).

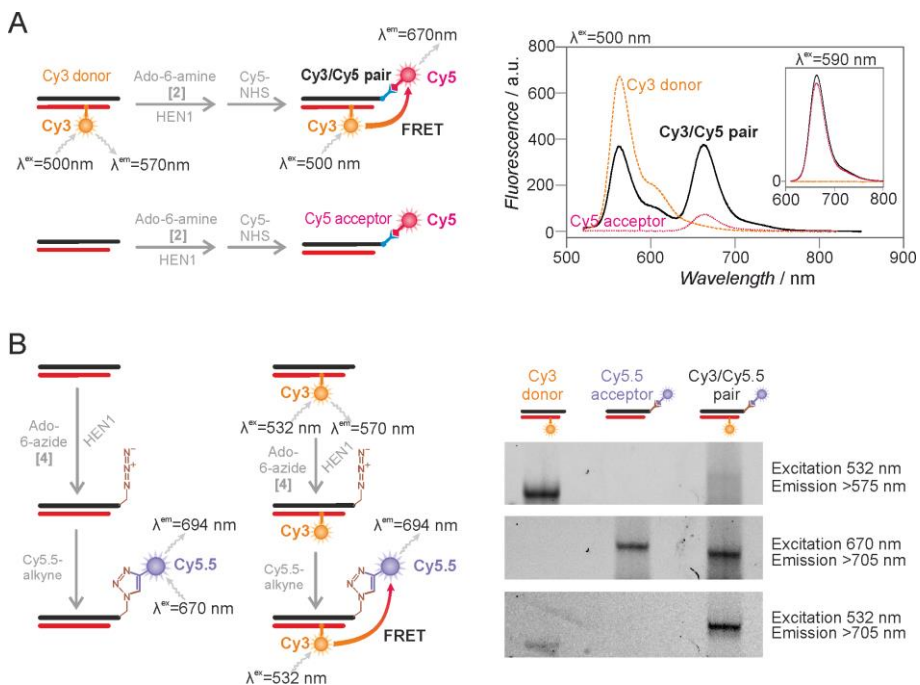


Figure S15. Adaptation of FRET technology for miRNAs. A. On the left: schematic representation of the experiment. On the right: FRET signal in the solution between the probe-incorporated Cy3 donor and Cy5 acceptor, transferred by two-step labeling with HEN1 and Ado-6-amine [2]. B. On the left: schematic representation of the experiment. On the right: FRET signal in the gel between the probe-incorporated Cy3 donor and Cy5.5 acceptor, transferred by two-step labeling with HEN1 and Ado-6-azide [4].

Concluding all the results of the dissertation study, we might specify as its fundamental value with all the findings about the mechanism of 2'-O-methyltransferases, particularly HEN1, so as wide practical aspects, which allowed us to adapt or develop a bundle of small RNA analysis methods.

CONCLUSIONS

- 1) The mechanism of *in vitro* methylation of *Arabidopsis thaliana* methyltransferase HEN1 investigated and the factors making influence to the reaction determined. The methylation model of the enzyme created based on the data obtained.
- 2) Methyltransferase HEN1 adapted for transfer of side chains containing functional or reporter group from synthetic its cofactor S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) analogs, including Ado-6-amine, Ado-11-amine, Ado-6-azide, Ado-6-ethyne, Ado-13-biotin and Ado-18-biotin, to miRNA/miRNA* and siRNA/siRNA* duplexes.
- 3) It was found out that methyltransferase HEN1 is able to modify not only typical miRNA/miRNA* or siRNA/siRNA* substrates, but also miRNA or siRNA strand annealed with DNA, DNA-LNA or RNA-LNA probe. Experimentally proven that enzyme-methylated or alkylated duplexes may contain both 2 nt overhang or blunt 3'-end of modified strand, as well as supposedly undetermined length, but not shorter than 33 nt 3'-overhang of non-modified strand. Methylated and alkylated substrate can contain different covalent modifications as well, including methyl or primary amine chemical groups, either FAM or Cy5 fluorophore on non-modified strand's 3'-end, also internally incorporated Cy3 fluorophore.
- 4) Novel one and two-steps labeling techniques created for covalent modification of miRNAs and siRNAs with biotin conjugates suitable for their latter purification and enrichment, as well as labeling with fluorophores, including Cy5, Cy5.5 and etherneon, for their visualization. Also new methods developed for purification and enrichment of HEN1-modified miRNAs and siRNAs using streptavidin-specific DNA probe and for double-fluorophore labeling for FRET analysis.

REFERENCES

1. Carè, A., Bellenghi, M., Matarrese, P., Gabriele, L., Salvioli, S., and Malorni, W. (2018). Sex disparity in cancer: roles of microRNAs and related functional players. *Cell Death Differ.* 25, 477–485.
2. Carvalho de Oliveira, J., Molinari Roberto, G., Baroni, M., Bezerra Salomão, K., Alejandra Pezuk, J., Sol Brassesco, M., Carvalho de Oliveira, J., Molinari Roberto, G., Baroni, M., Bezerra Salomão, K., et al. (2018). MiRNA Dysregulation in Childhood Hematological Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2688.
3. Fontenete, S., Guimarães, N., Leite, M., Figueiredo, C., Wengel, J., and Filipe Azevedo, N. (2013). Hybridization-Based Detection of *Helicobacter pylori* at Human Body Temperature Using Advanced Locked Nucleic Acid (LNA) Probes. *PLoS ONE* 8.
4. Herkenhoff, M.E., Oliveira, A.C., Nachtigall, P.G., Costa, J.M., Campos, V.F., Hilsdorf, A.W.S., and Pinhal, D. (2018). Fishing Into the MicroRNA Transcriptome. *Front. Genet.* 9.
5. Hirose, T., Mishima, Y., and Tomari, Y. (2014). Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy. *EMBO Rep.* 15, 489–507.
6. Huang, Y., Ji, L., Huang, Q., Vassilyev, D.G., Chen, X., and Ma, J.-B. (2009). Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature* 461, 823–827.
7. Islam, W., Noman, A., Qasim, M., and Wang, L. (2018). Plant Responses to Pathogen Attack: Small RNAs in Focus. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 515.
8. Kirino, Y., and Mourelatos, Z. (2007). The mouse homolog of HEN1 is a potential methylase for Piwi-interacting RNAs. *RNA* 13, 1397–1401.
9. Li, D., Li, Y.-P., Li, Y.-X., Zhu, X.-H., Du, X.-G., Zhou, M., Li, W.-B., and Deng, H.-Y. (2018). Effect of Regulatory Network of Exosomes and microRNAs on Neurodegenerative Diseases. *Chin. Med. J. (Engl.)* 131, 2216–2225.
10. Libri, V., Miesen, P., van Rij, R.P., and Buck, A.H. (2013). Regulation of microRNA biogenesis and turnover by animals and their viruses. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3525–3544.

11. Liu, L., Cheng, Z., and Yang, J. (2018). miR-23 regulates cell proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells in coronary heart disease. *Pathol. - Res. Pract.*
12. Lukinavičius, G., Lapienė, V., Staševskij, Z., Dalhoff, C., Weinhold, E., and Klimašauskas, S. (2007). Targeted Labeling of DNA by Methyltransferase-Directed Transfer of Activated Groups (mTAG). *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2758–2759.
13. Lukinavicius, G., Lapinaite, A., Urbanaviciute, G., Gerasimaite, R., and Klimasauskas, S. (2012). Engineering the DNA cytosine-5 methyltransferase reaction for sequence-specific labeling of DNA. *Nucleic Acids Res.* 40, 11594–11602.
14. Mishra, S., Lahiri, H., Banerjee, S., and Mukhopadhyay, R. (2016). Molecularly resolved label-free sensing of single nucleobase mismatches by interfacial LNA probes. *Nucleic Acids Res.* 44, 3739–3749.
15. Navari, M., Etebari, M., Ibrahim, M., Leoncini, L., and Piccaluga, P. (2018). Pathobiologic Roles of Epstein–Barr Virus-Encoded MicroRNAs in Human Lymphomas. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1168.
16. Singh, A., Gautam, V., Singh, S., Sarkar Das, S., Verma, S., Mishra, V., Mukherjee, S., and Sarkar, A.K. (2018). Plant small RNAs: advancement in the understanding of biogenesis and role in plant development. *Planta* 248, 545–558.
17. Vilkaitis, G., Plotnikova, A., and Klimašauskas, S. (2010). Kinetic and functional analysis of the small RNA methyltransferase HEN1: The catalytic domain is essential for preferential modification of duplex RNA. *RNA* 16, 1935–1942.
18. Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B., and Chen, X. (2006). HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res.* 34, 667–675.
19. Yu, D., Ma, X., Zuo, Z., Wang, H., and Meng, Y. (2018). Classification of Transcription Boundary-Associated RNAs (TBARs) in Animals and Plants. *Front. Genet.* 9.

SANTRAUKA

Praktiškai visų ištirtų eukariotinių organizmų ląstelėse yra aptinkamos 20-30 nt ilgio mažosios nekoduojančios RNR, skirstomos į mikroRNR (miRNR), mažas interferuojančias RNR (siRNR) ir su PIWI baltymais sąveikaujančias RNR (piRNR). Kiekybiniai ir kokybiniai šių molekulių pokyčiai yra stebimi daugelio įvairių ligų patologijų atvejais, įskaitant neurologinius, širdies-kraujagyslių ir vėžinius susirgimus. Ankstyvas mažųjų RNR pokyčių nustatymas galėtų padėti diagnozuoti minėtas ligas dar pradinėse stadijose, taip ženkliai padidinant jų sėkmingo išgydymo tikimybę.

Disertacijos tyrimų tikslas buvo sukurti efektyvų ir specifiską miRNR bei siRNR dupleksų žymėjimo metodą, tinkantį šių molekulių detekcijai arba grynimui, panaudojant rekombinantinę *Arabidopsis thaliana* mažųjų RNR metiltransferazę HEN1 bei sintetinius jos kofaktoriaus S-adenozil-L-metionino (AdoMet) analogus.

Visų pirma buvo ištirtas metiltransferazės HEN1 katalizuojamas miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleksų natūralaus metilinimo mechanizmas ir nustatyti šiai reakcijai įtaką darantys veiksniai. Remiantis gautais duomenimis, sukurtas detalus minėto fermento *in vitro* metilinimo mechanizmo modelis. Toliau metiltransferazė buvo pritaikyta šoninių grandinių, turinčių funkcinę arba reporterinę grupę, pernašai nuo sintetinių jos kofaktoriaus AdoMet analogų ant miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleksų. Be to, pavyko nustatyti, kad HEN1 geba modifikuoti ne tik tipinius RNR/RNR dupleksus, tačiau ir RNR grandinę, suldyta su DNR, RNR-LNA (uždara aminorūgštimi) arba DNR-LNA zonu. Eksperimentiškai įrodyta, kad fermento metilinami ir alkilinami dupleksai gali turėti kaip 2 nt išsikišusį, taip ir buką modifikuojamos RNR 3'-galą, taip pat tariamai neriboto ilgio, bet ne mažesnį, nei 33 nt, šiame cikle nemonifikuojamos grandinės 3'-galą, o taip pat daugybę kovalentinių modifikacijų, įskaitant nemonifikuojamos grandinės 3'-gale esančią metilo arba amino grupę, FAM arba Cy5 fluoroforą arba vidinį

Cy3 fluoroforą. Remiantis padarytais atradimais, buvo sukurtos vieno ir dviejų žingsnių mažųjų RNR žymėjimo biotinu technologijos, tinkančios šių molekulių ištraukimui ir praturtinimui ir specifiniam žymėjimui fluoroforais, įskaitant Cy5, Cy5.5 ir eterneoną. Taip pat sukurta mažųjų RNR ištraukimo ir praturtinimo streptavidinui specifišku aptameru technologija bei FRET analizei tinkanti dvigubo žymėjimo fluoroforais technologija.

Šio darbo mokslinis naujumas, visų pirma, pasižymėjo detaliu HEN1 metiltransferazės metilinimo mechanizmo *in vitro* išaiškinimu. Taip pat pirmą kartą buvo pademonstruota, kad HEN1 metiltransferazė yra tinkama pernešti šonines grandines nuo sintetinių AdoMet analogų ant dvigrandinių miRNR/miRNR* ir siRNR/siRNR* dupleksų, taip pat ant miRNR ar siRNR grandinių, sulydytų su komplementariomis DNR grandinėmis. Be to, buvo parodyta, kad priešingai nei buvo manoma iki šiol, 1-2 nt substrato grandinių 3'-išsikišimai nėra būtini: HEN1 gali modifikuoti kaip bukus galus, taip ir turinčius mažiausiai 33 nt bemosifikuojamos grandinės 3'-galo išsikišimą. Atlikto darbo praktinė reikšmė yra sukurti naujoviški mažųjų RNR (miRNR ir siRNR) dupleksų žymėjimo įvairiomis reporterinėmis molekulėmis metodai: mažųjų RNR specifinei detekcijai tinkančiais fluoroforais, išgryninimui ir praturtinimui skirtais biotino konjugatais, taip pat dvigubo mažųjų RNR žymėjimo kartu su streptavidinui specifiniu DNR aptameru bei mažosioms RNR pritaikyta FRET technologija.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Plotnikova A, Baranauskė S, **Osipenko A**, Klimašauskas S, and Vilkaitis G. Mechanistic insights into small RNA recognition and modification by the HEN1 methyltransferase. *Biochemical Journal*, 2013, 453: 281-290 (Cituojamumo rodiklis publikavimo metais 4.8).
 2. Plotnikova A*, **Osipenko A***, Masevičius V, Vilkaitis G, and Klimašauskas S. Selective covalent labeling of miRNA and siRNA duplexes using HEN1 methyltransferase. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136: 13550-13553 (Cituojamumo rodiklis publikavimo metais 11.4).
- * Abu autoriai straipsnio ruošimui turėjo vienodą indėlį
3. **Osipenko A***, Plotnikova A*, Nainytė M, Masevičius V, Klimašauskas S, and Vilkaitis G. Oligonucleotide-addressed covalent 3'-terminal derivatization of small RNA strands for enrichment and visualization. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56 (23): 6507-6510 (Cituojamumo rodiklis publikavimo metais 12.1).
- * Abu autoriai straipsnio ruošimui turėjo vienodą indėlį

PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

1. Lietuvos mokslų tarybos Studentų vasaros mokslinės praktikos projekto konferencija, žodinis pranešimas "Mažųjų RNR metiltransferazės HEN1 fermentinės reakcijos mechanizmo tyrimas", Vilnius, Lietuva, 2011 m. kovo 22 d. Abstraktas publikuotas konferencijos pranešimų knygoje.
2. Tarptautinis 5-asis Baltijos šalių genetikų kongresas; standinis pranešimas "Fundamental study of small RNA methyltransferase HEN1", Kaunas, Lietuva, 2012 . spalio 19-22 d. Abstraktas publikuotas konferencijos pranešimų knygoje ir moksliniame žurnale „Biologija“.
3. XII-oji Lietuvos biochemikų draugijos konferencija, žodinis ir standinis pranešimai "Mažųjų RNR metiltransferazės HEN1 fermentinės reakcijos mechanizmo tyrimas", Tolieja, Lietuva, 2012 m. birželio 28-30 d. Abstraktas publikuotas konferencijos pranešimų knygoje.
4. Tarptautinis EMBO/EMBL simpoziumas „The Non-Coding Genome“; standinis pranešimas "Mechanistic insights into small RNA recognition and modification by the HEN1 methyltransferase", Heidelbergas, Vokietija, 2013 m. spalio 9-13 d. Abstraktas publikuotas konferencijos pranešimų knygoje.
5. Tarptautinė gyvybės mokslų konferencija "Vita Scientia 2014", standinis pranešimas "Fundamental study of small RNA methyltransferase HEN1", Vilnius, Lietuva, 2014 m. sausio 2 d.

6. „Biotechnologija ir biofarmacija: fundamentiniai ir taikomieji tyrimai“ projekto konferencija; žodinis pranešimas “HEN1 metiltransferazės taikymas mikroRNR stebėjimui, gryninimui ir sekoskaitai“, Vilnius, Lietuva, 2014 m. balandžio 17 d.
7. Tarptautinė XII-oji Lietuvos biochemikų draugijos konferencija, standinis pranešimas "Novel Techniques for Small RNA Visualization and Extraction", Birštonas, Lietuva, 2014 m. birželio 18-20 d. "Thermo Fisher" apdovanojimas už pristatytus rezultatus.
8. Tarptautinis 14-asis FEBS Jaunųjų mokslininkų forumas ir tarptautinė FEBS-EMBO 2014 konferencija, žodinis ir standinis pranešimai "Specific Labeling of miRNAs and siRNAs by HEN1 Methyltransferase", Paryžius, Prancūzija, 2014 m. rugpjūčio 27-30 d. ir rugpjūčio 30 d. - rugsėjo 4 d., atitinkamai. Finansuota „FEBS Young Scientists‘ Forum“ grantu.
9. Tarptautinė 10-oji gamtos ir gyvybės mokslų konferencija „The Coins‘ 15“, žodinis pranešimas "Targeted Labeling of Small Non-Coding RNAs", Vilnius, Lietuva, 2015 m. kovo 3-7 d. Antros vietos apdovanojimas už geriausią pranešimą.
10. Tarptautinė 58-oji fizikos ir gamtos mokslų konferencija „Open Readings 2015“, žodinis pranešimas "Application of Methyltransferase HEN1 for Analysis of Small Non-Coding Ribonucleic Acids", Vilnius, Lietuva, 2015 m. kovo 24-27 d. Abstraktas publikuotas konferencijos pranešimų knygoje.

11. Tarptautinė EMBO konferencija „Protein Synthesis and Translational Control“, stendinis pranešimas "Selective Covalent Labeling of Small Non-Coding RNA duplexes using HEN1 methyltransferase", Heidelbergas, Vokietija, 2015 m. rugsėjo 9-13 d. Finansuota Lietuvos mokslų tarybos ir EMBL Advanced Training Centre Corporate Partnership Programme stipendijos.
12. Lietuvos mokslų akademijos konferencija "Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos"; žodinis pranešimas "Mažųjų RNR analizės metodų kūrimas", Vilnius, Lietuva, 2015 m. gruodžio 10 d. Abstraktas publikuotas konferencijos pranešimų knygoje.
13. Tarptautinė gyvybės mokslų konferencija „Vita Scientia 2016“, stendinis pranešimas "Methylation of small RNAs", Vilnius, Lietuva, 2016 m. sausio 4 d. Abstraktas publikuotas konferencijos pranešimų knygoje. Vienas iš pagrindinių konferencijos organizatorių.
14. Tarptautinė gyvybės mokslų konferencija „Life Sciences Baltics“, stendinis pranešimas „Modification of small RNAs“, Vilnius, Lietuva, 2016 m. rugsėjos 14-15 d.

PEDAGOGINĖ IR MOKSLO POPULIARINIMO VEIKLA

1. 2012-2016 m. – ekskursijų vedimas Lietuvos, o taip pat Latvijos ir Estijos mokiniams ir mokytojams Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute;
2. 2015 m. – „Nacionalinės moksleivių akademijos“ biochemijos sekcijos užduočių gabiausiems Lietuvos moksleiviams kūrimas ir tikrinimas.
3. 2015 m. – Mokomasis žodinis pranešimas "Biomolecules Almighty" sintetinės biologijos projekto "iGEM" Lietuvos ir Danijos komandoms. Gauta padėka.
4. 2015 m. – Pagalba vedant laboratorinius darbus Medicinos genetikos magistro studijų studentams;
5. 2015 m. – VU BTI doktorantų žodinių pranešimų ir diskusijų vakarai „Journal club“.
6. 2016 m. – Tarptautinės gyvybės mokslų konferencijos "VitaScientia 2016" vienas pagrindinių organizatorių;
7. 2016 m. – „European biotech week“, pažintinė-mokslo populiarinimo paskaita mokiniams.
8. 2016-2017 m. – „Thermo Fisher diena“, ekskursijų vedimas Vilniaus universiteto Gamtos mokslo centre.

DALYVAVIMAS MOKSLINIUOSE PROJEKTUOSE

1. NKP projektas „Biotechnologija ir biofarmacija: fundamentiniai ir taikomieji tyrimai“, paramos sutartis Nr. VP1-3.1-ŠMM-08-K-01-005/KS-560000-1757, jaunesnysis mokslo darbuotojas 2012-2015 m. (projekto vadovas dr. K. Sasnauskas, veiklos vadovas dr. G. Vilkaitis).
2. MIP-15592 projektas „Mažųjų nekoduojančių RNR, reguliuojančių Gram-teigiamų pienenarūgščių bakterijų atsaką į antimikrobinių veiksmų poveikį, nustatymas ir analizė“, tyrėjas 2015-2017 m. (projekto vadovas dr. G. Vilkaitis).

CURRICULUM VITAE (*Lietuviškai*)

Vardas, pavardė: Aleksandr Osipenko
Gimimo data: 1986-05-15
Darbo adresas: DNR modifikacijos tyrimų skyrius,
Biotechnologijos institutas, Gyvybės mokslų centras
Vilniaus universitetas (VU), Saulėtekio al. 7,
Vilnius, Lietuva
Telefonas, el. paštas: +370 67646349;
aleksandr.osipenko@bti.vu.lt, aleks.o@inbox.ru

Išsilavinimas:

- 2005-2009 – Bakalauro laipsnis VU (*Molekulinė biologija*);
- 2009-2011 – Magistro laipsnis VU (*Genetika*);
- 2011-2015 – Daktaro studijos VU (Fiziniai mokslai, *Biochemija, P04*).

Darbo patirtis:

- 2009-2010 – Laborantas (Vilniaus universitetas);
- 2010-2012 – Bioinžinierius (Vilniaus universitetas);
- 2012-2015 – Biologas-tyrėjas (Vilniaus universitetas);
- Nuo 2015 – Jaunesnysis mokslo darbuotojas (Vilniaus universitetas).

Apdovanojimai / Stipendijos:

- 2007, 2008 – Vilniaus universiteto stipendija už puikius ir labai gerus mokymosi rezultatus.
- 2008, 2010, 2011 – Lietuvos mokslų tarybos stipendija Studentų vasaros mokslinės praktikos projektui.
- 2014 – FEBS YSF grantas dalyvavimui 14-ame tarptautiniame Jaunųjų mokslininkų forume ir tarptautinėje FEBS-EMBO 2014 konferencijoje;
- 2014 – „Thermo Fisher Scientific“ apdovanojimas už tyrimus, pristatytus 13-oje tarptautinėje Lietuvos biochemikų draugijos konferencijoje;
- 2014, 2015 – Lietuvos mokslų tarybos doktoranto stipendija už akademinis pasiekimus;
- 2015 – Apdovanojimas už darbus, pristatytus 10-oje tarptautinėje gamtos ir gyvybės mokslų konferencijoje "The Coins";
- 2015 – Lietuvos mokslų tarybos grantas išvykai į užsienį;
- 2015 – EMBL ATCCPP stipendija dalyvavimui tarptautinėje EMBO konferencijoje "Protein Synthesis and Translational Control".

CURRICULUM VITAE (*in English*)

Name, surname: Aleksandr Osipenko
Date of birth: 1986-05-15
Work adress: Department of Biological DNA Modification,
Institute of Biotechnology, Life Sciences Centre,
Vilnius University (VU), Saulėtekio Ave. 7,
Vilnius, Lithuania
Phone; e-mails: +370 67646349;
aleksandr.osipenko@bti.vu.lt, aleks.o@inbox.ru

Education:

- 2005-2009 – Bachelor’s degree at VU (*Molecular Biology*);
- 2009-2011 – Master’s degree at VU (*Genetics*);
- 2011-2015 – PhD studies at VU (Physical Sciences, *Biochemistry, P04*).

Employment:

- 2009-2010 – Part-time Laboratory assistant (Vilnius University);
- 2010-2012 – Part-time Bioengineer (Vilnius University);
- 2012-2015 – Full-time Biologist-researcher (Vilnius University);
- Since 2015 – Full-time Junior researcher (Vilnius University).

Awards / Scholarships:

- 2007, 2008 – Vilnius University Scholarship for Excellent and Very Good Learning Results.
- 2008, 2010, 2011 – Lithuanian Council’s of Science Grant for „Students’ Scientific Research“ project;
- 2014 – FEBS Young Scientists’ Forum grant for 14th Young Scientists Forum and FEBS-EMBO 2014 conference;
- 2014 – „Thermo Fisher Scientific“ award for research presented at 13th International Conference of Lithuanian Biochemical Society;
- 2014, 2015 – Lithuanian Council’s of Science Doctoral Scholarship for Academic Achievements;
- 2015 – Award for research presented at 10th International Conference "The Coins";
- 2015 – Lithuanian Council’s of Science grant for academic mobility;
- 2015 – EMBL Advanced Training Centre Corporate Partnership Programme Fellowship for EMBO conference "Protein Synthesis and Translational Control“.

PUBLICATION 1

*Alexandra Plotnikova, Simona Baranauskė,
Aleksandr Osipenko,
Saulius Klimašauskas, and Giedrius Vilkaitis*

**Mechanistic insights into small RNA
recognition and modification
by the HEN1 methyltransferase**

Biochemical Journal
2013, 453, 281–290

Copyright The Authors Journal compilation.
Copyright 2013 Biochemical Society

PUBLICATION 2

*Alexandra Plotnikova, Aleksandr Osipenko,
Viktoras Masevičius, Giedrius Vilkaitis,
and Saulius Klimašauskas*

**Selective Covalent Labeling of
miRNA and siRNA Duplexes
Using HEN1 Methyltransferase**

Journal of the American Chemical Society
2014, 136, 13550–13553

Copyright 2014 American Chemical Society.

PUBLICATION 3

*Aleksandr Osipenko, Alexandra Plotnikova,
Milda Nainyte, Viktoras Masevičius,
Saulius Klimašauskas, and Giedrius Vilkaitis*

**Oligonucleotide-Addressed Covalent
3'-Terminal Derivatization
of Small RNA Strands
for Enrichment and Visualization**

*Angewandte Chemie
(International Edition in English)
2017, 56, 6507–6510*

Copyright 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Universiteto g. 1, LT-01513 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 10 egz.