

(19)



(10) **LT 6341 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **6341**

(51) Int. Cl. (2016.01): **C12N 15/00**

(21) Paraiškos numeris: **2015 019**

(22) Paraiškos padavimo data: **2015-03-19**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2016-09-26**

(45) Patent paskelbimo data: **2016-12-27**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Saulius KLIMAŠAUSKAS, LT
Giedrius VILKAITIS, LT
Milda MICKUTĖ, LT

(73) Patent savininkas:

VILNIAUS UNIVERSITETAS, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Law, J.Jasinskio g. 16A, LT-03163 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Viengrandės RNR analizė

(57) Referatas:

Išradime pateiktas vgRNR 3' galo modifikacijos metodas, kuris apima grandinės sujungimą su vgRNR 2'-O-metiltransferaze, esant kofaktoriui, tokiomis sąlygomis, kurios leidžia pernešti dalį kofaktoriaus, naudojant vgRNR 2'-O-metiltransferazę, ant vgRNR 3' galo. Tokiu būdu gaunama modifikuota vgRNR. Šiame metode naudojama vgRNR, kurios 3' galinis nukleotidas turi 2'-OH grupę, o dalį pernešamo kofaktoriaus sudaro reporterinė arba funkcinė grupė.

Išradimo sritis

Išradimas susijęs su RNR molekulių žymėjimo metodu ir šio metodo panaudojimu viengrandinės RNR (vgRNR) analizei įvairiuose biologiniuose mėginiuose.

Išradimo technikos lygis

Nekoduojančios RNR, kurios nėra transliuojamos yra dažnos ir svarbios, eukariotiniuose ir prokariotiniuose organizmuose (Lalaouna et al., (2013) Biochim Biophys Acta. 1829, 742-747).

Mažos nekoduojančios RNR, tokios kaip miRNR, siRNR ir piRNR, visos apie 21-32 nukleotidų ilgio, yra vienos iš svarbiausių potranskripcinių genų reguliatorių eukariotuose (Ghildiyal ir Zamore, (2009) Nat Rev Genet. 10, 94-108). Kadangi jų gamyba stipriai reguliuojama vietos ir laiko atžvilgiu, mažos nekoduojančios RNR įtakoja visus organizmo biologijos aspektus, įskaitant jo vystymąsi, metabolizmą ir atsaką į aplinkos sąlygas (Planell-Saguer ir Rodicio, (2011) Anal Chim Acta. 699, 134-152). Dėl to, net mažiausi sutrikimai jų raiškos reguliacijoje sukelia patologinius procesus, pavyzdžiui vėžį, arba yra tokių procesų indikatoriai (Jansson ir Lund, (2012) Mol Oncol., 6, 590-610). Galimybė naudoti mažas RNR, ypač miRNR, žmonių ligų eigos/vystymosi stebėjimui ir jų gydymui yra gerai suprantama ir jau kartais taikoma (Wang et al., (2013) Med Hypotheses. 81, 41-43; Zhao et al., (2013) Oncol. Rep. 30, 276-84). Dar didesnis potencialas siejamas su galimybe naudoti miRNR, kaip neinvazinius biožymenis, kadangi laisvos stabilios miRNR kompleksai yra randami žmogaus kūno skysčiuose (Zen ir Zhang, (2012) Med Res Rev. 32, 326-348).

Kitos klasės mažų nekoduojančių RNR, bakterinių mažų reguliacinių RNR (sRNR, 50-400 nt), svarba tapo akivaizdi visai neseniai dėl intensyvių prokariotų genetikos tyrimų, vykusių pastarąjį dešimtmetį (Lalaouna et al., (2013) Biochim Biophys Acta. 1829, 742-727). Kaip viena pagrindinių po-transkripcinių reguliatorių grupių, sRNR kontroliuoja gyvybiškai svarbius fiziologinius procesus, tokius kaip anglies metabolizmas ar membranų homeostazė, bei reaguoja į augimo fazes ir aplinkos stresą (Mandin ir Guillier, (2013) Curr Opin Microbiol. 16, 125-132; Burke et al., (2014) J Bacteriol. 196, 3756-3767). Kadangi nauji tyrimai pabrėžia mažų reguliacinių RNR svarbą bakterijų virulentiškumui, jų nustatymas ir apibūdinimas yra

galimai naudingas naujos kartos antibiotikų gamybai (Harris et al., (2013) Virulence 15, 785-795).

Didžioji dalis šiuolaikinių mažų viengrandinių RNR (vgRNR) rūšių nustatymo metodų remiasi jų hibridizacija su oligonukleotidų zondais arba padauginimu. Dažniausiai naudojami metodai paremti Northern analize, oligonukleotidų mikrogardelių technologija arba atvirkštinės transkripcijos kiekybine polimerazine grandinine reakcija (AT-kPGR). Tačiau visos šios strategijos turi vidinius techninius trūkumus ir apribojimus:

1. Northern analizė matuoja tikslią, ant kietos (nitroceliuliozinės membranos) imobilizuotą RNR, tiesiogiai hibridizuotą su žymėtu oligonukleotidu. Visa tai atliekama pirmiausia RNR išfrakcionavus poliakrilamidiniame gelyje. Šis metodas yra sąlyginai nebrangus, jam reikalinga įprasta laboratorinė įranga. Tačiau šis metodas dažnai nepasiteisina dėl neefektyvaus trumpų RNR grandinių pernešimo ant membranos ir imobilizacijos. Kadangi neįmanomas tikslinis pagausinimas, analizei reikalingi gana dideli pradinio RNR mėginio kiekiai.

2. Nors mikrogardelių hibridizacijos technologija suteikia galimybę atlikti lygiagrečią įvairių RNR analizę viename mėginyje su daugybiniais zondais, ji reikalauja daug laiko, brangios įrangos, pažangių profesinių įgūdžių ir didelių kiekių tiriamosios medžiagos. Taipogi, mėginių žymėjimas dažnai yra sudėtingas, o analizės rezultatus nesunkiai gali iškreipti mėginyje užsilikusi DNR. Kadangi ši metodologija nėra standartizuota, atsiranda žymūs eksperimentiniai skirtumai tarp skirtingų gamintojų ir laboratorijų, kurie dažnai sudaro ženklus nesutapimus publikuojamuose rezultatuose (Sato et al., (2009) PLoS ONE 4, e5540).

3. AT-kPGR atliekama su mažais kiekiais pradinės medžiagos (naudojami nanogramai totalinės RNR). Tačiau šis metodas atima per daug laiko ir yra per daug techniškai sudėtingas, jog būtų pritaikytas kasdieniniams laboratoriniams tyrimams (Planell-Saguer ir Rodicio, (2013) Clin Biochem. 46, 869-878). Mažų RNR trumpas ilgis trukdo jų gausinimui ir analizei. Kadangi šis metodas nėra specifiškas nukleino rūgščiai (RNR ar DNR), visada išlieka tikimybė, jog mėginys bus užkrėstas genomine

DNR.

Šiuolaikiniai naujų nekoduojančių RNR rūšių radimo metodai yra paremti tikslinių ląstelinės RNR frakcijų klonavimu ir tolimesne jų sekoskaita. Tačiau šie metodai turi tokius trūkumus:

1. Mažos viengrandinės ląstelinės RNR praturtinimas yra išimtinai paremtas nuo dydžio priklausomu totalinės RNR frakcionavimu poliakrilamidiniame gelyje. Taigi šiuo metodu neįmanoma atskirti, kur yra vgRNR, o kur užteršimas trumpais DNR segmentais. Šis žymus trūkumas stabdo naujų vgRNR atradimą ir tinkamą jų analizę. Taipogi, 3' gale neapsaugota viengrandinė RNR yra labai jautri nukleazių, kuriomis gali būti užterštas mėginys, ardančiąjai veiklai, taigi kai kurios vgRNR frakcijos gali būti visiškai prarastos įprastai netrumpos RNR elektroforezės metu

2. Pradmenys turi būti prijungiami prie mažų RNR 3'- galo naudojant T4 RNR ligazę¹ arba 2 norint atlikti AT-PGR ir gausinimą. Kadangi abiejų fermentų vykdomos reakcijos itin priklauso nuo substratinės RNR sekos ir struktūros, kai kurios mažos ląstelinės RNR yra nepakankamai pagausinimos arba visiškai prarandamos klonavimo metu. Nors ir prisijungusios pradmenis, tačiau nepakankamai pagausinimos būna ir 3' galinio nukleotido 2'-O padėtyje metilintos RNR. Taip yra todėl, kad T4 RNR ligazės prisiuva DNR pradmenis prie 2'-O-metilintų RNR substratų ~1,5 karto mažesniu efektyvumu, nei prie 2'-OH turinčių RNR (Munafo ir Robb, (2010) RNR 16, 2537-2552). Kadangi abi T4 RNR ligazės geba naudoti 5'-P DNR galus, kaip donorus, o ligazė¹ taip pat naudoja 3'-OH DNR, kaip akceptorius, užteršimas su DNR tampa neišvengiamas (Zhuang et al., (2012) J Nucleic Acids., epub Jun 20). Dar vienas RNR ligazių naudojimo 3'-pradmens prijungimui trūkumas yra analizuojamos RNR ir pradmens ciklizacija. Tapusios žiedinėmis, abi molekulės nebedalyvauja tolimesnėje analizėje (Hafner et al., (2011) RNR 17, 1697-1712). Nors sekoskaitos metodas sudaro daugybę fermentinių žingsnių, didelė dalis tyrimų nurodo, jog pradmens prisiuvimas yra pagrindinė priežastis, iškreipianti skirtingų RNR raiškos profilius – skirtumas tarp dėl netolygaus pradmens prisiuvimo per dažnai ar per retai į mėginį pakliuvusių, tačiau tokiu pat kiekiu realiai ląstelėje sintetinamų RNR gali siekti net

keletą eilių. (Raabe et al., (2013) Nucleic Acids Res. 42, 1414-1426).

Šio išradimo tikslas ir yra išspręsti prieš tai paminėtus vgRNR analizės metodų trūkumus.

Išradimo esmė

Pirmiausia, šis išradimas pateikia metodą vgRNR 3' galo modifikacijai, kuri remiasi RNR grandinės sujungimu su vgRNR 2'-O-metiltransferaze esant kofaktoriui, tokiomis sąlygomis, kurios leistų pernešti dalį kofaktoriaus naudojant vgRNR 2'-O-metiltransferazę ant vgRNR 3' galo. Tokiu būdu sukuriama modifikuota vgRNR. Šiam metode naudojama ant 3' galinio nukleotido 2'-OH grupę turinti vgRNR, o dalis pernešamo kofaktoriaus yra sudaryta iš reporterinės arba funkcinės grupės.

Išradėjai netikėtai nustatė, jog vgRNR 2'-O-metiltransferazės iš žmogaus ir *Drosophila melanogaster* gali tiesiogiai pernešti prailgintas sulfonių surištas grupes nuo S-adenozil-L-metionino analogų ant natūralių vgRNR substratų, gautų iš virusų, mikroorganizmų, augalų arba gyvūnų (įskaitant žmogų) bei sintetinių įvairaus ilgio vgRNR grandinių. Viena išradimo įgyvendinimo pavyzdyje prailginta sulfonių surišta grupė apima reporterinę grupę, kuri gali būti panaudota tiesioginei vgRNR analizei. Alternatyviame išradimo įgyvendinimo pavyzdyje, prailginta sulfonių surišta grupė, kuri yra pernešama, apima funkcinę grupę, kuri gali būti antrame žingsnyje panaudojama siekiant prijungti reporterinę grupę prie vgRNR.

Taigi, šis išradimas taip pat suteikia galimybę analizuoti vgRNR, esančią įvairiuose biologiniuose mėginiuose, o šis metodas apima tokius žingsnius:

(a) reporterinės grupės prijungimas prie vgRNR 3' galo biologiniame mėginyje, panaudojant metodą pagal pirmąjį išradimo aspektą;

(b) reporterinės grupės, prijungtos prie vgRNR, analizė pagal antrąjį išradimo aspektą.

Taipogi, šis išradimas pateikia rinkinį, skirtą vgRNR žymėjimui, sudarytą iš atskiruose kontaineriuose esančių: (a) kofaktoriaus, turinčio reporterinę arba funkcinę

grupės; ir (b) vgRNR 2'-O-metiltransferazės, gebančios pernešti reporterines arba funkcinės grupės ant vgRNR.

Šio išradimo metodas gali būti naudojamas mažų RNR transkriptomų paieškai ir analizei, bei naujų mažų nekoduojančių RNR rūšių, žiedinės RNR ir kitų vgRNR radimui visuose gyvuose organizmuose, įskaitant ir žmones.

Ypač didelis šio išradimo metodo privalumas yra aukštas vgRNR 2'-O-metiltransferazių specifiškumas vienam nukleino rūgšties tipui, t.y. RNR ir jo galinei 2'-OH grupei. Tokiu būdu panaikinama galimybė, jog bus pažymėti nepageidaujami RNR irimo produktai turintys 2'-P, 3'-P arba 2'3'-ciklinius P galus, bei DNR, kas leidžia atlikti RNR analizę nukleino rūgščių mišinyje.

Dar daugiau, sukurtas metodas yra tinkamas įvairaus ilgio RNR žymėjimui, panaudojant vgRNR 2'-O-metiltransferazę, todėl taikant jį galima analizuoti vgRNR iš skirtingų organizmų, tokių kaip gyvūnai ar bakteriniai patogenai, kurių vgRNR ilgis kinta nuo 21-32 iki 50-400 nt ar netgi iki 81000 nt.

Taipogi, kadangi metodas leidžia žymėti tik 3' gale nemodifikuotas RNR, jis puikiai tinka siekiant nustatyti patologijas organizmuose, audiniuose ar ląstelių linijose, kur vgRNR įprastomis sąlygomis yra 3' metilinta, pavyzdžiui augaluose ar gyvūnų lytinėse ląstelėse, kurios turi piRNR.

Atsižvelgiant į visas išvardintas aplinkybes, šio išradimo metodas - naudingas ir palankus būdas visuminei viengrandinės RNR analizei biologiniuose mėginiuose.

Paveikslų aprašymas

Šis išradimas toliau detaliau aprašomas naudojant paveikslus, kuriuose pateikta:

Pav. 1. *Drosophila melanogaster* ir *Homo sapiens* vgRNR 2'-O-metiltransferazių, Dm-piRMT ir Hs-piRMT, atitinkamai, domeninė struktūra (A) ir jų vaidmuo piRNR biogenezėje (B). A. Dm-piRMT ir Hs-piRMT yra 391 ir 393 ar. ilgio baltymai, sudaryti iš metiltransferazinio (MTase) domeno N gale ir apie 100 ar. ilgio nežinomos funkcijos C-galinės dalies (CTD). B. PIWI baltymo surištos piRNR yra modifikuojamos 3' gale veikiant vgRNR 2'-O-metiltransferazei. Tai yra paskutinis piRNR biogenezės žingsnis.

Pav. 2. Natūraliai Dm-piRMT ir Hs-piRMT vykdomos reakcijos bei išradimo įgyvendimo pavyzdyje pateiktų vgRNR žymėjimo strategijų palyginimas. Schema A (viršuje) pabrėžia natūraliai piRMT vykdomą reakciją - metilo grupė pernešama nuo S-adenozil-L-metionino ant viengrandinės RNR (R=metilas). Schema B (viduryje) iliustruoja dviejų pakopų žymėjimo strategiją, kur funkcinė grupė (pirminis aminas, tiolis, alkinas, azidas, aziridinas, karboksilas, aromatinis angliavandenilis ir t.t.), esanti sintetinio kofaktoriaus šoninėje grandinėje, R., yra pernešama ant vgRNR 3' galo ir sekančiame žingsnyje panaudojama norimos reporterinės grupės prijungimui. Alternatyvi strategija - schema C (apačioje) - iliustruoja vienos pakopos RNR molekulių žymėjimą, pasitelkiant tiesioginį, nuo piRMT priklausomą, reporterinės grupės (pvz., biotino, fluoroforo ir t.t.), esančios sintetinio kofaktoriaus analogo šoninėje grandinėje, R, pernešimą. Trikampiai žymi funkcinės grupės, žvaigždutės - reporterinės grupės.

Pav. 3. Efektyviai Dm-piRMT ir Hs-piRMT katalizei būtini metalų jonų kofaktoriai. A. Iš visų išanalizuotų potencialių metalų jonų kofaktorių, tik Co^{2+} arba Co^{3+} reakcijos mišinyje padeda pasiekti pilną vgRNR substrato metilinimą. Siekiant patikrinti piRMT vykdomos reakcijos priklausomybę nuo skirtingų metalų jonų kofaktorių, buvo ruošiami 20 μl reakcijos mišiniai, sudaryti iš reakcijos buferio [10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA, 5 % (v/v) glicerolio ir 0.05 u/ μl RiboLock (Thermo Scientific)], 0,2 μM ^{32}P -žymėtos miR173.1 (5'-UUCGCUUGCAGAGAGAAAUCAC-3', 22 nt), 0,1 mM AdoMet, 10 mM metalų jonų ir 1 μM piRMT baltymų. Po 30 min. inkubacijos 37°C temperatūroje, modifikuotos RNR dalis nustatyta atlikus NaIO_4/β -eliminacijos reakciją, kurios metu RNR buvo inkubuota 0,2 mM NaIO_4 borakso/boro rūgšties buferyje [0,06 M, pH 8,6] 15 min. bei 75 min. borakso/boro rūgšties buferyje II [0,06 M pH 9,6] esant 42°C. Reakcijos produktai buvo analizuoti 13 %

poliakrilamidiniame gelyje (PAG) denatūruojančiomis sąlygomis ir autoradiografuoti. Mažesniu elektroforetiniu judrumo pasižymėjusios metilintos RNR dalis įvertinta naudojant "Multi Gauge" (versija 3.0) programinę įrangą (Fujifilm). Metalų jonų pašalinimas iš reakcijos mišinio į jį pridėdant EDTA bei mėginio be pridėtų metalų kofaktorių tyrimas papildomai patvirtino, kad veiksmingas piRMT metilinimas vyksta dėl Co^{2+} ir Co^{3+} jonų. B. RNR metilinimo efektyvumo, naudojant skirtingus metalų kofaktorius, stulpelinė diagrama. Pateikti rezultatai – dviejų nepriklausomų eksperimentų vidurkis $\pm$ vidutinis kvadratinis nuokrypis.

Pav. 4. Tinkamas metalo kofaktorius padidina vgRNR substratų su skirtingais 3' galiniais nukleotidais modifikavimo tolygumą. Naudojant Co^{2+} , kaip metalo kofaktorių, Dm-piRMT vienodai efektyviai modifikuoja skirtingus 3' galinius nukleotidus turinčius RNR substratus,, nors yra žinoma, kad kitos homologiškos piRNR metiltransferazės, pvz., pelių piRMT, geriau modifikuoja A nei C, U ir G. A. RNR modifikacijos eksperimentai buvo atliekami kaip aprašyta Pav. 3., išskyrus tai, kad substratu naudota miR173.1 su skirtingais galiniais 3' nukleotidais, t.y. U, C, A ir G, o Dm-piRMT į reakcijos mišinį dėta 2 μM . B. Stulpelinė miR173.1 su skirtingais 3' galiniais nukleotidais modifikavimo efektyvumo diagrama. Pateikti rezultatai – dviejų nepriklausomų eksperimentų vidurkis $\pm$ vidutinis kvadratinis nuokrypis

Pav. 5. Dm-piRMT ir Hs-piRMT gali būti pritaikytos efektyviai įvairių funkcinių grupių pernašai nuo sintetinių kofaktorių analogų ant vgRNR. A. vgRNR 2'-O-metiltransferazės kovalentiškai modifikuoja miR173.1. Reakcijos buvo atliekamos naudojant 2 μM piRMT metiltransferazės ir AdoMet arba sintetinius kofaktoriaus analogus, Ado-6-aminą arba Ado-6-azidą, su prailgintomis šoninėmis grandinėmis, dviejų žingsnių žymėjimui. Visos eksperimentinės detalės pateikiamos 3-ame ir 4-ame paveiksluose. B. Dm-piRMT modifikuoja RNR substratus su skirtingais 3' galiniais nukleotidais esant sintetiniams kofaktoriaus analogams tuo pačiu arba netgi didesniu efektyvumu (k_{chem} , min^{-1}) lyginant su AdoMet. Siekiant išmatuoti modifikacijos reakcijos greitį, 0,2 μM ^{32}P -žymėtų miR173.1 su skirtingais 3' galiniais nukleotidais, 0,1 mM AdoMet arba jo sintetinių analogų, 10 mM Co^{2+} ir 2 μM of Dm-piRMT buvo įdėta į reakcijos buferį [10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA, 5 % (v/v) glicerolis ir 0,05 u/μl RiboLock (Thermo Scientific)] ir inkubuota 37°C temperatūroje.

Tam tikrais momentais reakcijos buvo sustabdytos įdedant Proteinazę K, ruošiamą buferyje [7 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,17 mM EDTA, 3 mM NaCl ir 0.5 % SDS], iki galinės 0,4 mg/ml koncentracijos ir toliau inkubuojama 55°C 20 min. Po šito sekė NaIO₄/β-eliminacijos reakcija ir denatūruojanti PAG elektroforezė, aprašyta Pav. 3. Pateikti rezultatai – dviejų nepriklausomų eksperimentų vidurkis ± vidutinis kvadratinis nuokrypis

Pav. 6. Naudodama sintetinius kofaktoriaus analogus, Dm-piRMT gali alkilinti įvairaus ilgio RNR substratus. A. Principinė 22-80 nt ilgio RNR modifikavimo schema, pasitelkiant Dm-piRMT bei metilo grupę (CH₃) arba prailgintą šoninę grandinę (X) turintį AdoMet, arba sintetinius kofaktoriaus analogus (AdoX), atitinkamai. B. 6A paveiksle pateiktos principinės schemos įrodymas. Eksperimentai buvo atliekami, kaip nurodyta Pav. 3., išskyrus tai, kad buvo panaudota 2 μM Dm-piRMT. 23nt ilgio RNR substratu pasitelkta siR173.1 (5'- UUAACGCUUGCAGAGAGAAUCAC-3'). Ta pati siR173.1 seka sudarė ir 60 bei 80 nt ilgio RNR molekulių 3' galinę dalį.

Pav. 7. Su piRMT modifikuota RNR gali būti naudojama sekoskaitai prie jos prijungus DNR oligonukleotidus bei vykdant atvirkštinę transkripciją. A. Nuo ligavimo nepriklausoma RNR sekoskaita. Mažiausiai 22-80 nt ilgio RNR (juodos linijos), veikiant Dm-piRMT, gali būti modifikuota su pvz., 6-azidu (X), kaip parodyta Pav. 6., tada, pasitelkus "click" chemiją, prijungta prie galinio alkino (Y) modifikaciją turinčio dvigrandinės DNR oligonukleotido (pilka ir šviesiai pilka linijos) ir, pasinaudojant atvirkštine transkripcija, transkribuota į komplementarią DNR (taškuota juoda linija). B ir C. Pav. 7A pateiktos koncepcijos įrodymas. B. DNR-alkinas gali būti sėkmingai prijungtas prie RNR-6-azido, gauto RNR modifikuojant Dm-piRMT metiltransferaze. Vykdant "Click" reakciją 10 μM alkilintos DNR buvo sumaišyta su 10 μM ³²P-žymėtos modifikuotos RNR, ~ 60 % DMSO ir 3,3 mM CuBr-TBTA (3,3 mM CuBr, 3 % DMSO, 7 mM TBTA). Po 1 val. inkubacijos 45°C temperatūroje mėginiai buvo analizuoti 13 % PAGE. C. Nauja DNR grandinė, komplementari tiriamajai RNR, gali būti susintetinta nuo RNR-DNR hibrido. Po "click" reakcijos 0,08 μM RNR-DNR konjugato buvo transkribuota atvirkštinės transkripcijos būdu naudojant 10 u/μl RevertAid RT (RT) (Thermo Scientific) reakcijos mišinyje su 0,4 mM dNTP, 1 u/μl RiboLock (Thermo Scientific) ir 1× RevertAid RT reakcijos buferiu 30°C temperatūroje 2 val. 10 min.

Pav. 8. Pavyzdinio kofaktoriaus, naudojamo dviejų žingsnių žymėjimui, struktūra: $X = -NH_2$ - Ado-6-aminas ir $X = -N_3$ - Ado-6-azidas.

Pav. 9. Nuo Dm-piRMT priklausomo, Pav. 2C asprašyto, vieno žingsnio vgRNR žymėjimo poliakrilamidiniame gelyje analizė. Viengrandinės miR173.1 biotilinimas buvo atliktas kaip nurodyta Pav. 3. Išskyrus tai, kad buvo naudojama 2 μ M Dm-piRMT reakcijos modifikavimo etape ir nebuvo vykdyta $NaIO_4/\beta$ eliminacija.

Detalus išradimo aprašymas

Kaip paaiškinta anksčiau, šis išradimas pateikia metodą vgRNR 3' galo modifikacijai, kuris apima grandinės sujungimą su vgRNR 2'-O-metiltransferaze, esant kofaktoriui, tokiomis sąlygomis, kurios leistų pernešti dalį kofaktoriaus, naudojant vgRNR 2'-O-metiltransferazę ant vgRNR 3' galo. Tokiu būdu sukuriamą modifikuota vgRNR. Šiame metode naudojama vgRNR, kurios 3' galinis nukleotidas turi 2'-OH grupę, o pernešamą kofaktoriaus dalį sudaro reporterinė arba funkcinė grupė.

Fermentas

Išradėjai netikėtai nustatė, jog vgRNR 2'-O-metiltransferazė gali pernešti reporterinę arba funkcinę grupę nuo kofaktoriaus ant vgRNR. Pažymėtina, jog ši vgRNR nėra natūralus šio fermento substratas, ji nėra žmogaus arba *D. melanogaster* piRNR ir yra, pageidautinai, iki 2,5 karto ilgesnė nei įprasta. Naudojant Co^{2+} , kaip metalo kofaktorių, pasiekiamas aukštas modifikacijos reakcijos efektyvumas, net ir modifikuojant skirtingus galinius nukleotidus turinčius substratus.

vgRNR 2'-O-metiltransferazės išskirtinai modifikuoja tik vgRNR (Saito et al., (2007) Genes Dev. 21, 1603-1608). Pagrindė taip yra todėl, kad joms trūksta dvigrandinę RNR surišančių sričių, priešingai nei jų augalų homologams (Huang, (2012) Biochemistry 51, 4087-4095) ir, tikriausiai, skiriasi metiltransferazinio domeno savybėmis (Vilkaitis et al., (2010) RNR 16, 1935-1942). Manoma, kad vgRNR 2'-O-

metiltransferazės substrato ilgis yra apsprendžiamas vykstant sąveikai su fermento partneriais, PIWI baltymais (Horwich et al., (2007) Curr Biol. 17, 1265-1272).

Kadangi vgRNR 2'-O-metiltransferazės homologai naudoja ir Mn^{2+} , ir Mg^{2+} jonus, kaip metalo kofaktorius, yra parodyta, kad ir Hs-piRMT modifikuoja RNR esant Mn^{2+} , tačiau gana mažu efektyvumu (Huang, (2012) Biochemistry 51, 4087-4095; Chan et al., (2009) Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 17699-17704).

vgRNR 2'-O-metiltransferazės fermentai yra tokie, kurie dažniausiai naudoja (arba geba naudoti) S-adenozil-L-metioniną (SAM arba AdoMet), kaip kofaktorių (Huang, (2012) Biochemistry 51, 4087-4095).

Gyvūnų piRNR, o augalų miRNR ir siRNR biogenezėje neišvengiamai vyksta jų modifikacija 3' gale (Kim et al., (2010) Cell 143, 703-709). Viengrandinių RNR 2'-O-metiltransferazių šeima, vykdanči šią modifikaciją gyvūnuose, turi konservatyvų katalizinį domeną, aptinkamą ir augalų bei bakterijų atitinkamuose RNR modifikacijos fermentuose. Žmogaus ir *D. melanogaster* vgRNR 2'-O-metiltransferazės, piRMT, katalizuoja metilo grupės pernašą nuo S-adenozil-L-metionino ant piRNR (Saito et al., (2007) Genes Dev. 21, 1603-1608). Kitaip nei augalų metiltransferazės, kurios suriša išimtinai dvigrandinę RNR (dgRNR) ir veiksmingai metilina abi jos grandines (Vilkaitis et al., (2010) RNR 16, 1935-1942), šie gyvūnų homologai modifikuoja viengrandinės RNR substratus, kurie yra 21-38 nt ilgio (Saito et al., (2007) Genes Dev. 21, 1603-1608). Šis metilinimas yra kritiškai svarbus piRNR stabilumo ir funkcijos palaikymui (Horwich et al., (2007) Curr Biol. 17, 1265-1272).

RNR 2'-O-metiltransferazės fermentas, naudojamas šiame metode, gali būti gaunamas iš gyvūnų ir pageidautina jog būtų Hs-piRMT (gautas iš žmogaus) arba Dm-piRMT (gautas iš vaisinės muselės), katalizinis piRMT domenas arba piRMT homologas (ar jo katalizinis domenas), kaip pvz., pelės piRMT (Kirino ir Mourelatos, (2007) RNR 13, 1397-1401). Laukinių Hs-piRMT ir Dm-piRMT tipų sekos yra randamos GenBank, Accession Nos NP_653185.2 ir NP_610732.1, atitinkamai. Šių

baltymų sekos yra tokios:

SEQ ID Nr: 1 Hs-piRMT:

MEENNLCSSVVDGNFEEVPRETAIQFKPPLYRQRYQFVKNLVDQHEPKKVADLGCGDTSLLRL
LKVNPCEILLVGVDINEDKLRWRGDSLAPFLGDFLKPRDLNLTITLYHGSVVERDSRLLGFDLITCIELIEHLD
GDLARFPEVVFGYLSPSMIVISTPNSEFNPLFPSVTLRDSHDKFEWTRMEFQTWALYVANRYDYSVEFTGV
GEPPAGAENVGYCTQIGIFRKNGGKATESCLSEQHDQHVVYKAVFTTSYPSLQQERFFKLVLVNEVSQQVES
LRVSHLPRRKEQAGERGDKPKDIGGSKAPVPCFGPVFTEVEKAKIENSPTPFCVGDKFFVPLQRLLAYPKL
NRLCANEEMMRSVIADSIPLSSDGSVAVDLRNYFDEQFEF

SEQ ID Nr: 2 Dm-piRMT:

MFSHKFICGSLTKMTETGITFDPPVYEQRYCATIQILEDARWKDQIKKVVEFGCAEMRFFQLMRRI
ETIEHIGLVDIDKSLLMRNLTSVNPLVSDYIRSRASPLKVQILQGNVADSSEELRDTDAVIAIELIEHVYDDVLA
KIPVNIFGFMQPKLVVFSTPNSDFNVIFTRFNPLPNGFRHEDHKFEWSRDEFKNWCLGIVEKYPNYMFSLT
GVGNPPKEYESVGPVSQIAIFVRKDMLEMQLVNPLVSKPNIDKESIPYKLIHTVEYPFYVDTRTEKEKLWTEV
QIELQRFRKRFESSEIEEGTYQDTCNMPIAFLDRLEHVGATKERIEELLENNLTVENECVLIVSSDQSESEW
SDPYKFSDRSSQDDALVDQEQQEERWDQGPES

Pageidautina, kad vgRNR 2'-O-metiltransferazės seka būtų bent 70% panaši, o dar geriau, bent 80% panaši, arba, geriausiai, būtų bent 90% panaši į SEQ ID Nr: 1 arba SEQ ID Nr: 2.

RNR 2'-O-metiltransferazės fermentas, naudojamas šiame išradime aprašomame metode, taip pat gali būti patobulinta (modifikuotas, sutrumpintas ar pailgintas) natūralaus baltymo versija, kuri yra išlaikiusi didžiąją dalį laukinio tipo baltymo katalizinio domeno. Kataliziniai Hs-piRMT ir Dm-piRMT domenai apima 22-280 ar. SEQ ID Nr: 1 ir 16-291 ar. SEQ ID Nr: 2, atitinkamai.

RNR 2'-O-metiltransferazės fermentas, naudojamas šiame metode, gali būti gaunamas iš bakterijų, archėjų ir virusų. Šis fermentas turi pasižymėti nuo AdoMet-priklausomu vgRNR 2'-O-metiltransferaziniu aktyvumu ir priklausyti „Nuo S-adenozil-

L-metionino priklausomų metiltransferazių“ superšeimai (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/cgi-bin/scop.cgi?sunid=53335>), kaip apibūdinta Superšeimų duomenų bazėje HMM bibliotekoje ir genomų paskyrimo serveryje (<http://supfam.cs.bris.ac.uk/SUPERFAMILY/>)

RNR

Išradime aprašytame metode RNR, kuri yra modifikuojama, yra viengrandinė molekulė. Pažymėtina, kad RNR grandinė nėra gyvūno piRNR su 2'-O-metilintu 3' galiniu nukleotidu.

Ši RNR grandinė gali būti iš viruso, mikroorganizmo, augalo arba gyvūno (įskaitant žmogų), jei tik ji turi nemetilintą 3' galinę 2'-OH grupę. Taipogi, šio išradimo metodas gali turėti papildomą žingsnį, kurio metu RNR grandinė yra išgaunama iš biologinio mėginio paimto iš viruso, mikroorganizmo, augalo arba gyvūno (įskaitant žmogų).

RNR grandinė gali būti nuo 20 iki 81000 nukleotidų ilgio. Tai atitinka trumpiausią vgRNR, kurią gali modifikuoti piRMT ir ilgiausią koduojančią seką žmogaus genome (titino geną); pageidautina, kad seka būtų 20-400 nt ilgio, kas atitinka trumpiausią Hs-piRMT modifikuojamą vgRNR ir ilgiausią bakterinę vgRNR; geriausia, kad seka būtų 22-80 nt ilgio, kaip pavaizduota 2 pavyzdyje žemiau.

Viengrandinės RNR, kurios gali būti modifikuotos naudojant išradimo siūlomą metodą, gali būti eukariotinės ilgos nekoduojančios RNR, mažos nekoduojančios RNR, tokios kaip miRNR, siRNR, piRNR; bakterinės mažos reguliatorinės RNR; virusinės RNR; iRNR arba sintetinės vgRNR.

Viename iš išradimo įgyvendinimo pavyzdžių RNR grandinė yra miRNR, siRNR arba piRNR. Pageidautina, kad miRNR, siRNR arba piRNR būtų iš biologinio mėginio paimto iš gyvūno (pvz., žmogaus) arba augalo. Pageidautina, kad RNR grandinė būtų 21-36 nt ilgio. Pageidautina, kad RNR grandinė turėtų nemodifikuotą 3' galino nukleotido 2'-OH grupę

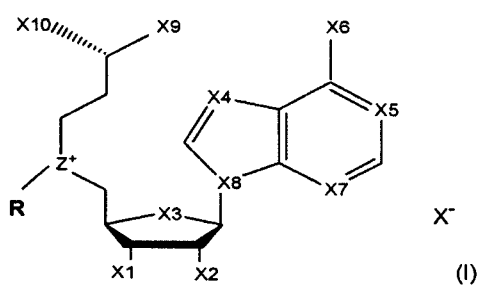
Kitame išradimo įgyvendinimo pavyzdyje RNR grandinė yra sRNR. Pageidautina, kad ši sRNR būtų išskirta iš biologinio mėginio, paimto iš bakterijų. Geriau, kai sRNR yra 50-400 nt ilgio.

Apibendrinant, šis metodas yra pritaikomas iš įvairių organizmų išskirtų RNR žymėjimui, išskyrus tuos, kurie turi 2'-O modifikuotus 3' nukleotidus.

Kofaktorius

Kofaktoriaus, skirto naudoti šiame metode, pagrindą sudaro S-adenozil-L-metionino (SAM arba AdoMet) molekulė - tai yra S-adenozil-L-metionino analogas, turintis funkcinę grupę arba reporterinę grupę prailgintoje šoninėje grandinėje, kuri gali būti pernešama ant vgRNR panaudojant aukščiau aprašytą fermentą.

Konkrečiu atveju, AdoMet analogas gali turėti formulę I:



kur

X1 ir X2 yra -OH, -NH₂, -SH, -H arba -F;

X3 yra -O-, -NH-, -CH₂-, -S-, arba -Se-;

X4, X5, X7, X8 yra -N-, arba -CH-;

X6 yra -NH₂, -OH, -OCH₃, -H, -F, -Cl, -SH arba -NHCH₃;

X9 yra -CO₂H, -PO₃H, -H, -CHO, -CH₃, arba -CH₂OH;

X10 yra -NH₂, -OH, -H, -CH₃, arba -NHCH₃;

X- yra organinis arba neorganinis anijonas, paimtas iš trifluoroacetato, formato, halogenido ar sulfonato;

Z yra S arba Se;

Su C surišti H atomai, esantys adenoizino grupėje, gali būti pakeisti į -F, -OH, -NH₂, arba -CH₃;

R yra prailginta šoninė grandinė, apimanti funkcinę grupę arba reporterinę grupę.

Pageidautina, jog R apima -CH=CH- , -C≡C- arba -C(=O)- β-pozicijoje nuo Z+ centro ir yra atskirtas nuo jo per CR₁R₂-, kur R₁ ir R₂ yra, nepriklausomai, H arba D.

Tinkami kofaktoriai, apimantys funkcinės grupės ir reporterinės grupės, yra aprašyti WO 2006/108678.

Kofaktoriaus, apimančio funkcinės grupės ir reporterinės grupės, panaudojimas leidžia žymėti vgRNR dviem skirtingais būdais, kaip parodyta 2-ame paveiksle schemose B ir C. Schema A (viršuje) parodo natūralią RNR 2'-O-metiltransferazės reakciją – metilo grupė yra pernešama nuo S-adenozil-L-metionino ant viengrandinės RNR (R=metilas). Schema B (viduryje) parodo dviejų žingsnių RNR žymėjimo būdą, kur funkcinė grupė (pirminis aminos, tiolis, alkinas, azidas, aziridinas, karboksilas, aromatinis angliavandenilis ir pan.), įterpta į sintetinio AdoMet analogo šoninę grandinę, yra pernešama ant vgRNR 3'-galo ir tada ji naudojama norimos reporterinės grupės prijungimui antrame žingsnyje. Alternatyvi schema C (apačioje) vaizduoja vieno žingsnio RNR molekulių žymėjimą tiesioginiu, nuo RNR 2'-O-metiltransferazės priklausomu, reporterinės grupės pernešimo metodu (pvz., biotino, fluoroforo ir pan.), kuomet reporterinė grupė yra šoninėje kofaktoriaus analogo grandinėje (R).

Atitinkamai, kai kofaktorius turi funkcinę grupę, ji turi būti tinkama tolimesniam norimos reporterinės grupės prijungimui antrame žingsnyje. Šiame išradimo įgyvendinimo pavyzdyje metodas gali apimti papildomą žingsnį, kurio metu funkcinę grupę, prijungta prie vgRNR, yra sujungiama su junginiu, apimančiu reaktyvią grupę (ar antrą funkcinę grupę), prijungtą prie reporterinės grupės, esant sąlygoms, kurios leistų pernešti reporterinę grupę ant vgRNR.

Funkcinę grupę apima reaktyvią grupę (grupė X), kuri gali apimti amino grupę, tiolio grupę, hidrazino grupę, hidroksilamino grupę, 1,2-aminotiolio grupę, azido grupę, dieno grupę, alkino grupę, arilhalogenido grupę, galinę sililalkino grupę, N-hidroksisukcinimidilo esterio grupę, tioesterio grupę, izotiocianato grupę, imidoesterio grupę, maleimido grupę, haloacetamido grupę, aziridino grupę, arilborono rūgšties grupę, aldehido grupę, ketono grupę, fosfano esterio grupę, dienofilo grupę arba galinę haloalkino grupę.

Grupė X tada gali būti sujungiama su junginiu, apimančiu antrą reaktyvią grupę (grupė Y), kuri yra prijungta prie reporterinės grupės. Tinkamos X ir Y grupės ir jų sudaromos jungtys, kurios atsiranda vykstant reakcijai tarp vgRNR ir reporterinės grupės yra parodytos 1-oje lentelėje. Tinkamos reporterinės grupės yra fluoroforai, kvantiniai taškai, oligonukleotidai, DNR aptamerai, RNR aptamerai, ribozimai, DNR su specifiniais baltymų taikiniiais, arba sekos skirtos analizei (barkodai), giminingumo ženklas, antikūnai, peptidai, baltymai, glikanai arba nanodalelės.

Lentelė 1

Abipusiai reaktyvios funkcinės grupės X ir Y, tinkamos konjugacijai

Reaktyvioji grupė X arba Y	Reaktyvioji grupė Y arba X	Suformuojama jungtis
Pirminis aminas	N-hidroksisukcinimidilo esteris	amidas
Pirminis aminas	tioesteris	amidas
Pirminis aminas	isotiocianatas	tiokarbamidas

Pirminis aminos	imidoesteris	imidatas
Pirminis aminosaldehidas, ketonas		iminas/antrinis
aminas po redukcijos		
Tiolis	maleimidais	tioeteris
Tiolis	haloacetamidas	tioeteris
Tiolis	aziridinas	tioeteris
Tiolis	tiolis	disulfidas
Hidrazinas	aldehidas, ketonas	hidrazonas
Hidroksilaminas	aldehidas, ketonas	oksimas
1,2-Aminotiolis	aldehidas, ketonas	tiazolidinas
1,2-Aminotiolis	tioesteris	amidas
Azidas	alkinas	1,2,3-triazolis
Azidas	fosfano esteris	amidas
Dienas	dienofilas	cikloheksenas
Galinis alkinas	arilhalogenidas	arilalkinas
Arilhalidas	arilborono rūgštis	biarilas
Galinis sililalkinas	galinis haloalkinas	diinas

Pageidaujant, funkcinė kofaktoriaus grupė gali būti apsaugotoje formoje, pvz., apsaugota amino grupė, apsaugota tiolio grupė, apsaugota hidrazino grupė, apsaugota hidroksiamino grupė, apsaugota aldehido grupė, apsaugota ketono grupė ir apsaugota 1,2-aminotiolio grupė. Taigi, reaktyvioji grupė X pirmiausia gali būti pernešama nuo kofaktoriaus ant vgRNR apsaugotoje formoje, o vėliau paverčiama į aktyvią funkcinę formą, atskiru žingsniu. Pavyzdžiui, tioliai gali būti pernešami su acetilo apsaugančia grupe (apsaugotas F1= -S-COCH₃), kuri gali būti greitai pašalinama norint išgauti tiolį (F1 = -SH) naudojant modifikuotą DNR su 20 % amoniaku arba perneštas 1,2-diolis gali būti verčiamas į aldehidą vykdant oksidaciją

su natrio periodatu.

Alternatyviai, vieno žingsnio žymėjimo procedūroje prailginta šoninė AdoMet analogo grandinė R apima reporterinę grupę. Tinkamos reporterinės grupės gali būti fluoroforai, kvantiniai taškai, giminingumo žymenys, oligonukleotido pradmuo, DNR aptameras, RNR aptameras, ribozimai arba DNR su specifiniais baltymų taikiniai, arba sekos skirtos analizei (barkodai). Giminingumo žymuo gali būti biotinas, maltozė, c-myc žymuo, HA žymuo, digoksininas, flag žymuo, dinitrofenolis, His žymuo, strep žymuo, glutationas arba nikelio-nitilotriacto rūgštis (NTA).

Analizės metodai

Kaip aprašyta anksčiau, šio išradimo metodas yra itin naudingas mažos viengrandinės RNR analizei biologiniuose mėginiuose, įskaitant ir mažų RNR identifikavimą konkrečiame mėginyje, ir naujų mažų vgRNR rūšių tyrinėjimą ir radimą RNR transkriptomo mėginiuose. Atitinkamai, aukščiau aprašytas metodas papildomai gali apimti žingsnius reporterinės arba funkcinės grupės prijungimui, kurios yra skirtos pagausinti, klonuoti ir/ar nuskaityti RNR grandinę bei aptikti arba kiekybiškai identifikuoti mažas vgRNR.

Ypatingai, šio išradimo metodas gali būti naudojamas viengrandinės RNR analizei biologiniuose mėginiuose. Atitinkamai, visi čia aprašyti metodai gali apimti papildomus žingsnius biologinio mėginio paėmimui ir/ar paruošimui. Konkrečiu atveju, biologinis mėginys gali būti pavienės ląstelės, ląstelių kultūros, audiniai (diferencijuoti ar embrioniniai), biopsijos, kūno skysčiai (pvz., kraujas, šlapimas, ašaros, seilės), pilni organizmai (pvz., augalai), bakterijų arba virusų padermės. Tokių mėginių paruošimo būdai, tam kad jie tiktų tolimesnei vgRNR analizei, yra žinomi šios srities specialistų.

Konkrečiame šio išradimo metodo įgyvendinimo pavyzdyje, jis naudojamas mažų viengrandinių RNR telkinio, paimto iš biologinio mėginio tyrimui, naudojantis schemomis aprašytomis Pav. 7. ir 9.: nuo vgRNR 2'-O-metiltransferazės priklausomu alkiliniu siekiant prijungti giminingumo reporterį (pvz., biotiną) selektyviam gausinimui

ir klonavimui (Pav. 9., schema A) arba nuo RNR 2'-O-metiltransferazės priklausomu alkiliniu siekiant prijungti oligonukleotido pradmenį, nuo pradmens vykstančiai atvirkštinei transkripcijai ir sekoskaitai (Pav. 7., schema B).

Metodas pagal schemą A gali apimti tokius žingsnius:

- (a) vgRNR 3' galo žymėjimas biologiniuose mėginiuose, panaudojant aukščiau aprašytą metodą, siekiant prijungti giminingumo grupę;
- (b) žymėtų vgRNR surišimas, panaudojant giminingumo grupę, ir pagausinimas; ir
- (c) pagausintų vgRNR klonavimas ir sekoskaita.

Metodas pagal schemą B gali apimti tokius žingsnius:

- (a) funkcinės grupės prijungimas prie vgRNR 3' galo biologiniame mėginyje naudojantis aukščiau aprašytais metodais;
- (b) funkcinės grupės reakcija su reaktyviąja grupe, prijungta prie oligonukleotido, esant sąlygoms, kurios užtikrintų oligonukleotido pernešimą ant vgRNR 3' galo;
- (c) vgRNR sekoskaita naudojant oligonukleotidą.

Kadangi vgRNR 2'-O-metiltransferazė modifikuoja tik nemetilintą 3' galinio nukleotido 2'-OH grupę turinčią vgRNR, (masinės paralelinės) sekoskaitos rezultatai būtų neužteršti DNR bei leistų atskirti modifikuotas RNR nuo nemodifikuotų RNR bei žiedinę, viengrandinę ar dvigrandinę RNR.

Šio išradimo metodas apima vgRNR 2'-O-metiltransferazės vykdumą išskirtinai RNR molekulių modifikaciją, jų tolimesnį pagausinimą, klonavimą ir/ar sekoskaitą. Kadangi tikslinė vgRNR modifikacija gali būti atliekama net DNR turinčiuose mėginiuose, sumažinamas papildomų žingsnių (pvz., DNR pašalinimo) kiekis, norint išgryninti vgRNR tolimesnei analizei. Tai veda prie mažesnių vgRNR mėginio nuostolių ir leidžia pradėti eksperimentus su mažesniais jos kiekiais. Šis būdas gali būti labai naudingas biologinių mėginių analizei, kur vgRNR kiekis yra labai mažas,

pvz., kūno skysčiuose (Sterling et al., (2014) *Nucleic Acids Res.*, epub Jul 23).

Šio išradimo metodas apima ir vgRNR 3' galinio nukleotido 2'-OH grupės modifikacijos lygio analizę. Kadangi 2'-O-metilinta RNR yra vgRNR 2'-O-metiltransferazės modifikacijos reakcijos produktas, ji negali būti naudojama, kaip substratas. Toks metodas, kuriuo specifiskai identifikuojamos 2'-O-nemetilintos vgRNR, gali būti naudojamas patologijos nustatymui gyvūnų (pvz., žmogaus) ląstelėse, kur įprastai piRNR yra metilintos, arba augaluose, kur mažos vgRNR yra modifikuojamos normaliomis sąlygomis (Lozsa et al., (2008) *Nucleic Acids Res.* 36, 4099–4107). Tokiais atvejais nemetilintos vgRNR aptikimas ir identifikavimas pasitarnautų ir kaip ligos indikatorius, ir kaip taikinyš gydymui.

Šio išradimo metodas gali būti pritaikomas naujos nekoduojančių RNR klasės, žiedinių RNR (circRNR), aptikimui ir analizei (Salzman et al., (2012) *PLoS ONE* 7, e30733). Manoma, kad circRNR veikia kaip miRNR kempinės eukariotuose, tokiu būdu kontroliuodamos aktyvių miRNR molekulių kiekį ir, didesniu mastu, viso organizmo fiziologiją (Kosik, (2013) *Nature* 495, 322-324). Šiuo metu circRNR yra nustatomos lyginant RNaze R ir niekuo neapdorotus mėginius, priimant kad egzozonukleazė paveiktuose mėginiuose turėtų būti likusi tik circRNR (Jeck et al., (2013) *RNR* 19, 141-157). Pagrindiniai šito metodo trūkumai yra šie: (1) reikia ganėtinai daug medžiagos norint paruošti du skirtingus mėginius, (2) naudojama egzozonukleazė negali pašalinti laso struktūros RNR, kuri vėliau apsunkina analizę.

Remiantis mūsų išradimu, žiedinės RNR identifikavimo ir analizės metodas gali apimti tokius žingsnius:

viengrandinės RNR pašalinimas ir analizė: vgRNR žymėjimas, įskaitant laisvus 3' galus turinčias laso struktūros RNR; giminingumu paremtas surišimas ir žymėtos RNR pagausinimas; pagausintų RNR grandinių klonavimas ir sekoskaita;

mėginyje likusios circRNR analizė: circRNR linerizacija, jos modifikavimas ir sekoskaita.

Aprašytas metodas, skirtingai nuo šiuo metu taikomų, leidžia lygiagrečiai atlikti viengrandinės ir žiedinės RNR analizę. Taipogi, jo metu nuo circRNR atskiriama laso struktūros RNR ir linijiniai transkriptai su sumaišytais egzonais, o tai padeda identifikuoti tikrąsias žiedines RNR.

Šis išradimas, apimantis vgRNR 2'-O-metiltransferazių katalizuojamą vgRNR modifikaciją, gali būti tinkama alternatyva 3' pradmens prisiuvimui ir ypač T4 RNR ligazėms. Kadangi, sekoskaitos metodai sunkiai susidoroja su pradmens prisiuvimu vykstant RNR bibliotekos paruošimui, šis išradimas pristato alternatyvų metodą įprastiniam 3' pradmens prijungimui, konkrečiai –RNR grandinės 3' galinio nukleotido 2'-OH grupės modifikaciją funkcinę grupę, po kurios seka 3' pradmens prijungimas naudojant „click“ chemiją (Pav. 7.). Šis metodas apeina neveiksmingus, nuo RNR sekos priklausomus ir DNR bei 2'-O-metilintų RNR neskiriančius 3' pradmens prisiuvimo žingsnius RNR bibliotekos paruošime (Raabe et al., (2013) Nucleic Acids Res. 42, 1414-1426). Sujungtas su CircLigase naudojančiais metodais (Jackson et al., (2014) BMC Genomics 15), mūsų metodas gali pilnai išlaisvinti RNR bibliotekos paruošimą nuo pradmens prisiuvimo procedūros.

Kadangi išradimo metodas apima vgRNR 3' galo modifikaciją, jis gali būti naudojamas tiksliam vgRNR sekos nuskaitymui šia kryptimi. 70 % žmogaus genų yra apibūdinami pagal alternatyvias poliA sritis, dėl ko atsiranda skirtingos transkriptų izoformos su skirtingo ilgio ir skirtingų sekų 3' netransliuojamomis sritimis (UTR) (Xia et al., (2014) Nat Commun. 5, 5274). Kadangi, 3'UTR turi miRNR komplementarius sekų motyvus, šios vietos yra paveikiamos vykstant alternatyviam poliadenilinimui (APA). Kadangi kai kurie APA įvykiai pasireiškia konkrečių vėžinių susirgimų metu, jų nustatymas tampa potencialiu prognozavimo instrumentu. Naudojant išradimo metodą, miRNR aptikimas ir tikslus iRNR 3' galų identifikavimas gali būti sujungtas į vieną galingą įrankį.

Šio išradimo metodas leidžia aptikti mažas ląstelines nekoduojančias RNR, kurių raiškos lygis yra pakitęs dėl aplinkos sąlygų ar kaip atsakas į gydymą.

Prie vgRNR prijungto reporterio nustatymas gali būti atliekamas naudojant

emisinę fluorescensiją arba testus, specifiskus naudojami reporterinei grupei (pvz., avidinui arba streptavidinui, konjuguotam su peroksidaze arba šarmine fosfataze, antigenams, aptamerama, spalva koduotiems mažiems rutuliukams - mikrosferinėms dalelėms, rutuliukams ir pan.).

Šis išradimas leidžia kurti įrankius klinikinei diagnostikai, remiantis paraleliniu visų tipų vgRNR matavimu.

Nuo vgRNR 2'-O-metiltransferazės priklausomas RNR žymėjimas leidžia kurti įrankius moksliniams tyrimams ir klinikiniam pritaikymui: analizei ir aptikimui skysčių sistemose, kietuose substratuose, *in situ*, naudojantis konfokaline fluorescencine mikroskopija ir t.t.

Rinkinys

Papildomai, šį išradimą sudaro rinkinys, skirtas vgRNR žymėjimui, apimantis (a) kofaktorių, apimantį reporterinę arba funkcinę grupę; ir (b) vgRNR 2'-O-metiltransferazę, gebančią pernešti reporterinę arba funkcinę grupę ant vgRNR.

Kiekviena rinkinio dalis yra atskirame konteineryje.

Rinkinyje gali būti pateiktos instrukcijos, kaip naudoti rinkinio komponentus, norint pažymėti vgRNR. Instrukcijos būtų pateiktos tinkamu formatu, pvz., popierinės arba elektroninėje laikmenoje.

Šio išradimo metodo aprašymas, taip pat galioja ir išradimo rinkinio elementams.

Šis išradimas dabar bus aprašytas išsamiau, pateikiant pavyzdžius ir atsižvelgiant į anksčiau atskleistus įgyvendinimo pavyzdžius ir susijusius poveikius.

Pavyzdžiai

1 pavyzdys. Efektyvus trumpos vgRNR 3'-nukleotido metilinimas.

1 pavyzdžio rezultatai yra parodyti Pav. 3. ir 4., kuriuose atsispindi priklausomybė nuo metalų jonų ir reakcijos sąlygų, įgalinančių tolygią skirtingų 3' galinių nukleotidų modifikaciją, vykdant nuo piRMT priklausomą viengrandinės RNR

substrato (miR173.1 grandinė), panašaus į augalų miRNR, metilinimą.

2 pavyzdys. Nuo piRMT priklausomas vgRNR alkilinimas ir žymėjimas.

Pav. 5-7 pademonstruota, kad piRMT vykdomas viengrandinės RNR ir šoninių grandinių susijungimas tinka dviejų žingsnių žymėjimui naudojant pirminį aminą iš Ado-6-amino. Eksperimentai, naudojant 0,2 μ M sintetinių 22-80 nt ilgio viengrandinių RNR, pažymėtų radioaktyviu fosforo-33 izotopu, buvo atliekami 30 min. 37°C temperatūroje su 100 μ M sintetinio kofaktoriaus, esant arba 2 μ M piRMT, arba be baltymo (Pav. 5. ir 6.). Mėginiai buvo išfrakcionuoti 13 % poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (esant 7M urėjos).

Pav. 7. pademonstruota, kad veikiant piRMT gautas RNR-6-azidas gali būti prijungtas prie DNR-alkino (B) ir komplementari DNR gali būti nuskaitoma nuo šio RNR-DNR konjugato siekiant atlikti RNR sekoskaitą (C).

Pav. 9. Nuo piRMT priklausomas tiesioginis trumpų RNR grandinių žymėjimas Ado-biotinu.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Viengrandės RNR (ssRNR) modifikavimo 3' gale metodas, kur minėtas metodas apima grandinės kontaktavimą su 2'-O-metiltransferaze, dalyvaujant kofaktoriui, tokiomis sąlygomis, kurios leidžia ssRNR 2'-O-metiltransferazei pernešti dalį kofaktoriaus ant RNR grandinės 3' galo, kad susidarytų modifikuota RNR grandinė, kur ssRNR perneša nemetilintą 2'-OH grupę ant 3'-galinio nukleotido ir kur dalis pernešto kofaktoriaus apima reporterinę grupę ir funkcinę grupę.

2. Metodas pagal 1 punktą, kur ssRNR yra nuo 20 iki 81000 nukleotidų ilgio.

3. Metodas pagal 2 punktą, kur ssRNR yra 20-400 nukleotidų ilgio.

4. Metodas pagal 3 punktą, kur ssRNR yra 22-80 nukleotidų ilgio.

5. Metodas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, kur viengrandė RNR yra eukariotinė ilga nekoduojanti RNR ir maža nekoduojanti RNR, tokia kaip miRNR, siRNR, piRNR; bakterinė maža reguliatorinė RNR; virusinė RNR; mRNR arba sintetinė ssRNR.

6. Metodas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, kur ssRNR 2'-O-metiltransferazė apima aminorūgščių seką, turinčią bent 70 % sekos identiškumą su SEQ ID Nr: 1 arba SEQ ID Nr:2.

7. Metodas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, kur kofaktorių yra S-adenozil-L-metionino analogas.

8. Metodas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, kur kofaktorių apima funkcinę grupę, kuri yra amino grupė, tiolio grupė, hidrazino grupė, hidroksilamino grupė, 1,2-

aminotiolio grupė, azido grupė, dieno grupė, alkino grupė, arilhalogenido grupė, galinė sililalkino grupė, N-hidroksisukcinimidilo esterio grupė, tioesterio grupė, izotiocianato grupė, imidoesterio grupė, maleimido grupė, halogenacetamido grupė, aziridino grupė, arilborono rūgšties grupė, aldehido grupė, ketono grupė, fosfano esterio grupė, dienofilo grupė ir galinė halogenalkino grupė.

9. Metodas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, kur kofaktorius apima funkcinę grupę ir metodas papildomai apima funkcinės grupės reagavimo su junginiu, apimančiu reporterinę grupę, pakopą, esant sąlygoms, kurios leidžia pernešti reporterinę grupę ant RNR grandinės.

10. Metodas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, kur reporterio grupė yra fluoroformas, kvantinis taškas, giminingumo žymuo, oligonukleotidas, DNR aptameras, RNR aptameras, antikūnas, peptidas, baltymas, glikanas, nanodalelė.

11. Metodas pagal 10 punktą, kur giminingumo žymuo yra biotinas, c-myc žymuo, HA žymuo, digoksigeninas, flag žymuo, dinitrofenolas, His žymuo, strep žymuo, glutationas, nikelio-nitrilotriacto rūgštis (NTA) arba maltozė.

12. Metodas pagal bet kurį iš 1-8 punktų, kur kofaktorius apima funkcinę grupę ir metodas papildomai apima funkcinės grupės reagavimo su reaktyvia grupe, prijungta prie oligonukleotido pakopą, esant sąlygoms, kurios leidžia pernešti oligonukleotidą ant ssRNR 3' galo.

13. Metodas pagal 12 punktą, kur minėta funkcinė grupė yra azidas ir minėta reaktyvi grupė yra alkinas.

14. Metodas pagal 12 arba 13 punktą, kur metodas papildomai apima ssRNR sekoskaitos pakopą, panaudojant oligonukleotidus.

15. Metodas pagal bet kurį iš ankstesnių punktų, apimantis papildomą pakopą ssRNR paruošimo iš mėginio, paimto iš viruso, mikroorganizmo, gyvūno arba augalo.

16. Metodas, skirtas ssRNR, esančios biologiniame pavyzdyje, analizavimui, kur minėtas metodas apima:

(a) prijungimą reporterinės grupės prie ssRNR 3' galo biologiniame pavyzdyje, panaudojant metodą pagal bet kurį iš 1-15 punktų;

(b) analizavimą reporterinės grupės, prijungtos prie ssRNR.

17. Metodas pagal 16 punktą, kur reporterinė grupė yra giminingumo žymuo ir (b) pakopa apima giminingą prisirišimą ir praturtinimą RNR grandinių, prijungtų prie giminingumo žymens.

18. Metodas pagal 17 punktą, papildomai apimantis praturtintų RNR grandinių klonavimo pakopą.

19. Metodas pagal 18 punktą, papildomai apimantis klonuotų RNR grandinių sekoskaitą.

20. Metodas pagal 16 punktą, kur (b) pakopa apima reporterinės grupės, prijungtos prie ssRNR aptikimą ir kiekio nustatymą.

21. Metodas pagal bet kurį iš 16-20 punktų, apimantis biologinio pavyzdžio paruošimo pakopą.

22. Rinkiny, skirtas panaudoti ssRNR žymėjimui, apimantis atskirose talpose (a) kofaktorių, apimantį reporterinę grupę arba funkcinę grupę; ir (b) ssRNR 2'-O-metiltransferazę, gebančią pernešti reporterinę grupę arba funkcinę grupę ant ssRNR 3' galo, kur ssRNR turi 2'-OH grupę ant 3' galinio nukleotido.

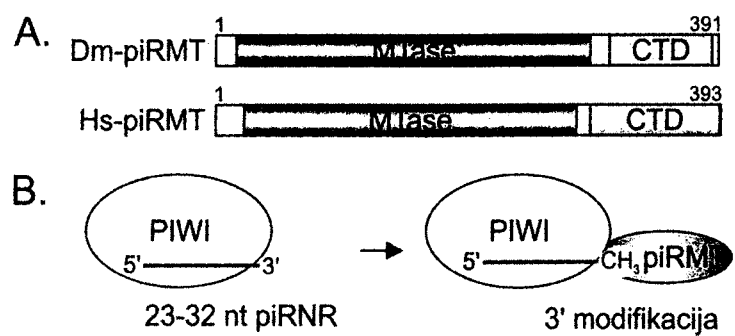
23. Rinkinys pagal 22 punktą, kur ssRNR 2'-O-metiltransferazė apima aminorūgščių seką, turinčią bent 80 % sekos identiškumą su SEQ ID Nr. 1 arba SEQ ID Nr. 2, arba katalitiniais domenais fermentų, koduojamų SEQ ID Nr. 1 arba SEQ ID Nr. 2.

24. Rinkinys pagal bet kurį iš 22-23 punktų, kur kofaktorius yra S-adenozil-L-metionino analogas.

25. Rinkinys pagal bet kurį iš 22-24 punktų, kur kofaktorius apima funkcinę grupę, kuri yra amino grupė, tiolio grupė, hidrazino grupė, hidroksilamino grupė, 1,2-aminotiolio grupė, azido grupė, dieno grupė, alkino grupė, arilhalogenido grupė, galinė sililalkino grupė, N-hidroksisukcinimidilo esterio grupė, tioesterio grupė, izotiocianato grupė, imidoesterio grupė, maleimido grupė, halogenacetamido grupė, aziridino grupė, arilborono rūgšties grupė, aldehido grupė, ketono grupė, fosfano esterio grupė, dienofilo grupė ir galinė halogenalkino grupė.

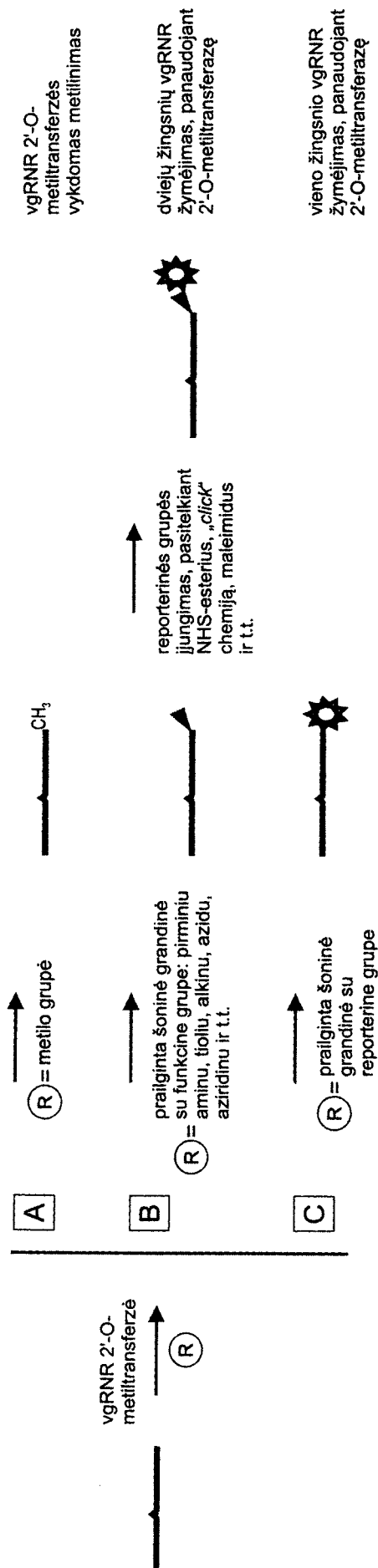
26. Rinkinys pagal bet kurį iš 22-24 punktų, kur kofaktorius apima reporterio grupę ir reporterio grupė yra fluoroforas, kvantinis taškas, oligonukleotido pradmuo, DNR aptameras, RNR aptameras arba giminingumo žymuo.

27. Rinkinys pagal 26 punktą, kur giminingumo žymuo yra biotinas, c-myc žymuo, HA žymuo, digoksigeninas, flag žymuo, dinitrofenolas, His žymuo, strep žymuo, glutationas, nikelio-nitrilotriacto rūgštis (NTA) arba maltozė.



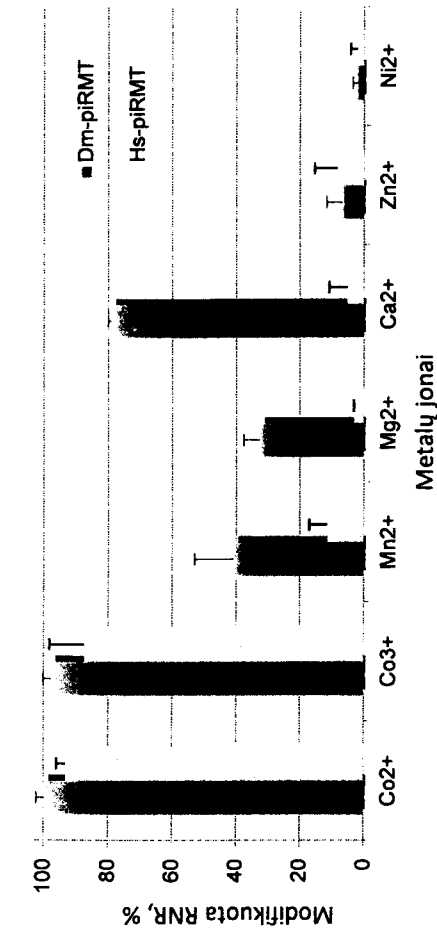
Pav. 1.

2/7



Pav. 2.

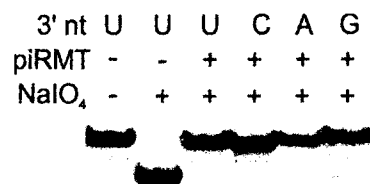
3/7



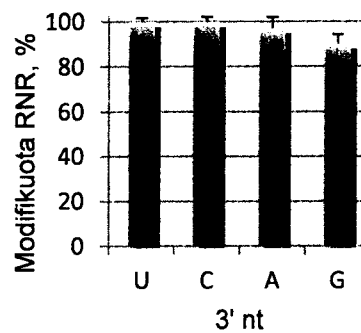
Pav. 3.

4/7

A.

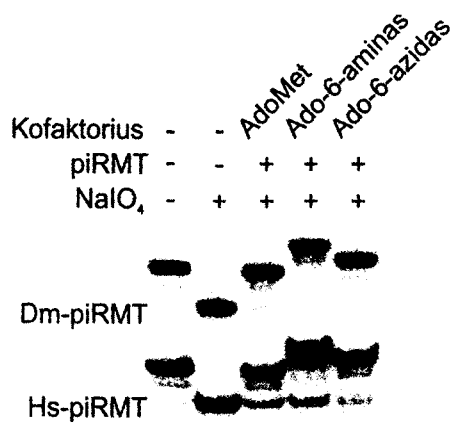


B.

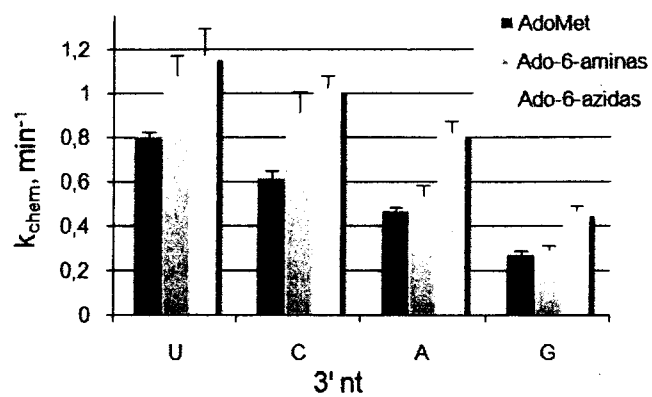


Pav. 4.

A.

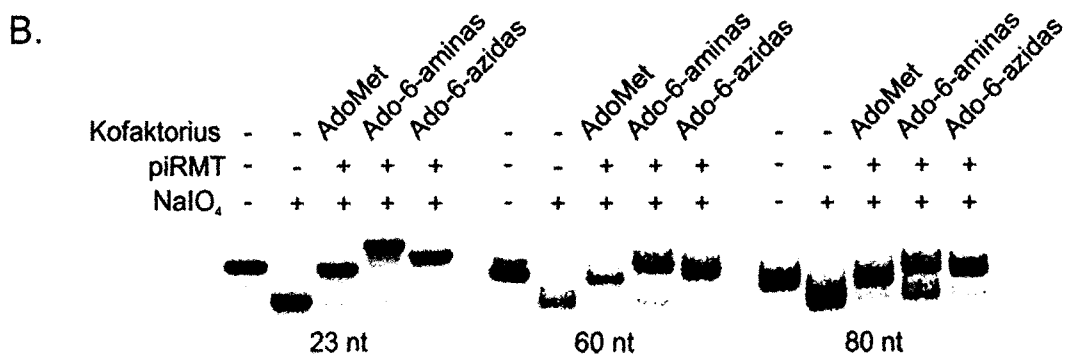
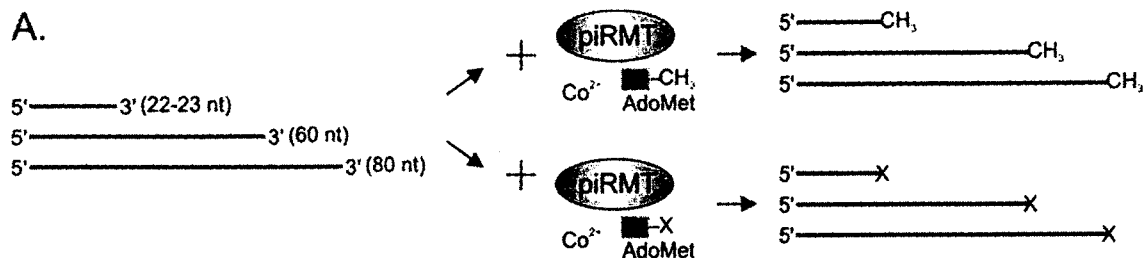


B.



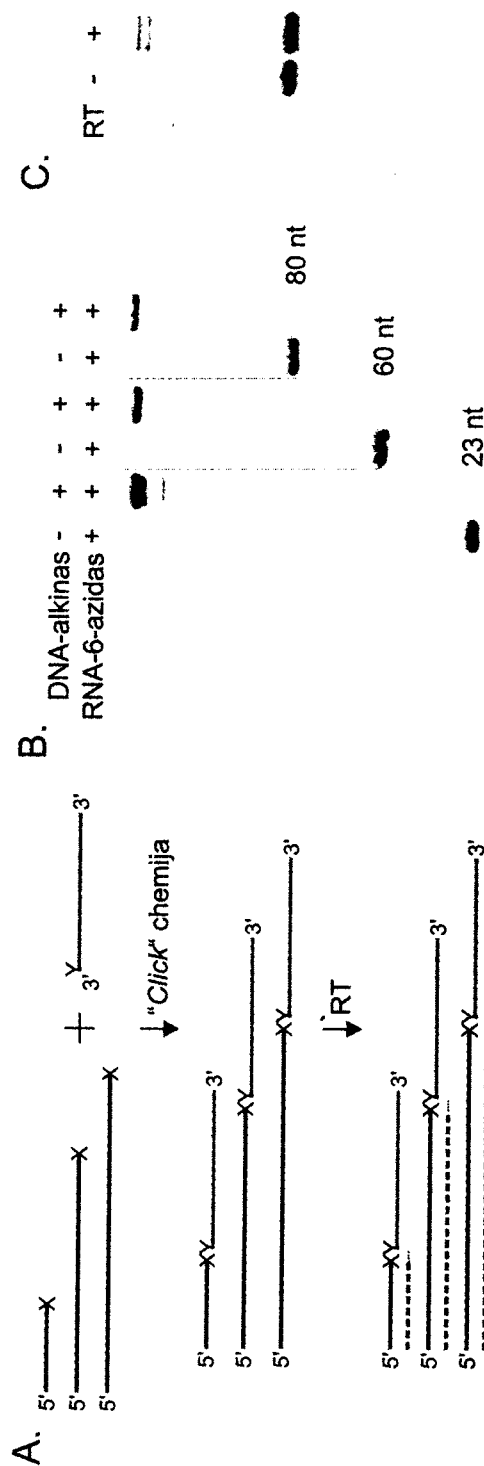
Pav. 5.

5/7



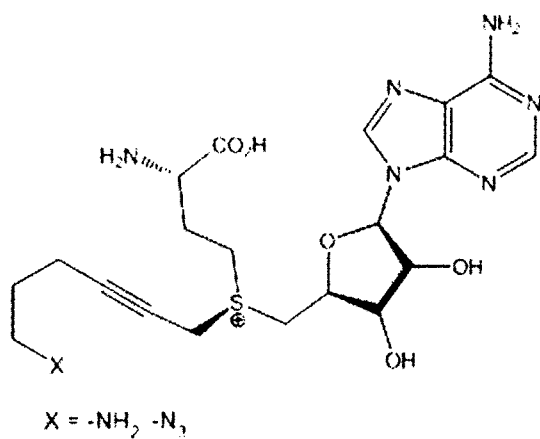
Pav. 6.

6/7



Pav. 7.

7/7



Pav. 8.

Ado-biotinas - +



Pav. 9.