

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIAVALDKOND
KEEMIA INSTITUUT
MOLEKULAARTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Mihkel Kotli

RNA METÜÜLTRANSFERAASI METTL16
INHIBIITORID JA AKTIVAATORID

Bakalaureusetöö 12 EAP

Juhendajad: prof. Mati Karelson
MSc Simona Selberg

TARTU 2019

RNA Methyltransferase METTL16 Inhibitors and Activators

Post-transcriptional RNA modifications play critical roles in important biological processes. N^6 -methylation of adenosine, the most common modification of such type, impacts various aspects of RNA metabolism, ranging from hastened decay or stability to splicing, nuclear export and translation. Adenosine N^6 -methylation has also been linked to both proliferation and decrease of different cancer cells, such as glioblastoma, acute myeloid leukemia, hepatocellular carcinoma and breast, pancreatic, prostate, cervical, endometrial cancer.

In this work, *in-silico* discoveries of novel inhibitors and a catalysts of METTL16, an adenosine N^6 -methyltransferase, were made and their activity was verified experimentally *in-vitro* with an enzymatic assay. Several discovered active compounds showed substantial supportive effect to cell proliferation.

Keywords: RNA methylation, m^6A , METTL16, epitranscriptomics

CERCS code: P410 Theoretical and Quantum Chemistry

RNA metüültransferaasi METTL16 inhibiitorid ja aktivaatorid

Post-transkriptsioonid RNA modifikatsioonid mängivad võtmerolli paljudes bioloogilistes protsessides. Adenosiini N^6 -metüleerimine on kõige sagedasem RNA modifikatsioon, mis mõjutab erinevaid RNA metabolismi etappe nagu RNA lagunemine või stabiilsuse suurenemine ja splaissimine, eksport rakutuumast ning translatsioon. Adenosiini N^6 -metüleerimist on seostatud ka paljude vähirakkude, nagu aju-, vere-, maksa-, rinna-, kõhunäärme-, eesnäärme-, emakakaela- ja munasarjavähi rakkude vohamise ja vähenemisega.

Käesolevas töös avastati *in-silico* esimesed inhibiitorid ja aktivaatorid valgule METTL16, mis on adenosiini N^6 -metüültransferaas. Ühendite aktiivsus verifitseeriti *in-vitro* ensümaatilise analüüsiga. Mitmed aktiivsed ühendid omasid märkimisväärset rakkude proliferatsiooni soodustavat efekti.

Märksõnad: RNA metüleerimine, m^6A , METTL16, Epitranskriptoomika

CERCS kood: P410 Teoreetiline ja kvantkeemia

Kasutatud lühendid

ADAM19: ADAM metallopeptidaasi domeen 19 (*ADAM metallopeptidase domain 19*)

AKT: (*AKT serine/threonine kinase 1*)

ALKBH5: α -ketoglutarat-sõltuv dioksügenaas alkB homolog 5 (*α -ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homologue 5*)

ASB2: (*Ankyrin repeat and SOCS box containing 2*)

BCL2: (*BCL2 Apoptosis regulator*)

CEBPA: (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*)

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DTT: ditiotretiool (*dithiothretiol*)

FOXM1: (*Forkhead box protein M1*)

FTO: rasvamassi ja ülekaalulisusega seotud valk (*fat mass and obesity-associated protein*)

GSK3b: (*Glycogen synthase kinase 3 beta*)

HBXIP: (*Hepatitis B virus X-interacting protein*)

HEPES: 4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

KCNK15-AS1: (*KCNK15 and WISP2 antisense RNA 1*)

KLF4: (*Kruppel like factor 4*)

lncRNA: pikk mittekodeeriv RNA (*long noncoding RNA*)

m⁶A: N⁶-metüüladenosiin (*N⁶-methyladenosine*)

MA2: (*Paraneoplastic neuronal antigen MM2*)

MALAT1: (*Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*)

METTL14: metüültransferaasi-sarnane 14 (*methyltransferase-like 14*)

METTL3: metüültransferaasi-sarnane 3 (*methyltransferase-like 3*)

miR126: (*microRNA 126*)

mRNA: informatsiooni-RNA (*messenger-RNA*)

MTT: 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasoolium bromiid (3-(4,5-dimethylthioazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

MYB: (*V-Myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog*)

MYC: (*Class E basic helix-loop-helix protein 39*)

NANOG: (*Homeobox protein NANOG*)

OLIG2: (*Oligodendrocyte transcription factor 2*)

OPLS3: *Optimized Potentials for Liquid Simulations 3*

PDB: *Protein Data Bank*

POU3F2: (*POU class 3 homeobox 2*)

PTEN: (*Phosphatase and tensin homolog*)

RARA: (*Retinoic acid receptor alpha*)

RNA: ribonukleinhape (*ribonucleic acid*)

rRNA: ribosoomi-RNA (*ribosomal RNA*)

SAH: S-adenosüülhomotsüsteiin (*S-adenosylhomocysteine*)

SALL2: (*Spalt like transcription factor 2*)

SAM: S-adenosüülmetioniin (*S-adenosylmethionine*)

SE: sildamise efektiivsus (*ligand efficiency*)

SOCS2: (*Suppressor of cytokine signaling 2*)

SOX2: (*Sex determining region Y-Box 2*)

SS: sildamisskoor (*docking score*)

SVS: suuremahuline virtuaalne sõelumine (*high-throughput virtual screening*)

TRIS: tris(hüdroksümetüül)aminometaan (*tris(hydroxymethyl)aminomethane*)

WTAP: Wilms'i kasvajaga assotsieeritud valk 1 (*Wilms' tumor associated protein 1*)

XPS: *extra precision*

YAP: (*Yes associated protein*)

Sisukord

RNA Methyltransferase METTL16 Inhibitors and Activators	2
RNA metüültransferaasi METTL16 inhibiitorid ja aktivaatorid	2
Kasutatud lühendid.....	3
1. Sissejuhatus.....	7
2. Kirjanduse ülevaade	8
2.1. Posttranskriptsioonid	8
2.2. RNA m⁶A metüültransferaasid, demetülaasid ja m⁶A siduvad valgud	8
2.2.1. RNA m ⁶ A metüültransferaasid („kirjutajad“).....	8
2.2.2. RNA m ⁶ A siduvad valgud („lugejad“).....	9
2.2.3. RNA m ⁶ A demetülaasid („kustutajad“).....	10
2.3. RNA m⁶A regulatsiooni tähtsus organismides	10
2.4. METTL16	11
3. Metoodika	14
3.1. Molekulaarsildamine.....	14
3.1.1. Retseptori ja ligandide valik ning ettevalmistamine.....	14
3.1.2. Molekulaarsildamise arvutusmudel.....	14
3.2. RNA m⁶A kolorimeetriline määramine.....	15
3.3. Biokihi interferomeetria	16
3.4. HEK-293 rakuliini rakkude proliferatsiooni määramine.....	17
4. Tulemused ja arutelu	18
4.1. Molekulaarsildamise tulemused.....	18
4.2. Eksperimentaalse osa tulemused	22
4.2.1. RNA m ⁶ A kolorimeetriline määramine	22
4.2.2. Biokihi interferomeetria	25
4.2.3. METTL16 aktiivsete ligandide toime rakkude proliferatsioonile	25
5. Kokkuvõte	27
6. Kasutatud kirjandus	28
7. Litsents	34

1. Sissejuhatus

RNA keemiline modifitseerimine erinevate funktsionaalrühmadega on üks organismi mehhanisme geeniekspressiooni kontrollimiseks. Levinuimaks modifikatsiooniks on adensiini metüleerimine N^6 asendis, mille esinemist ja mitteesinemist erinevates mRNA-des on seostatud erinevate vähivormide, sealhulgas aju-, vere-, maksa-, rinna-, kõhunäärme-, munasarja-, emakakaela- ja eesnäärmevähi rakkude elutegevuse suurenemise ja vähenemisega. Seetõttu oleks tarvilik leida võimalusi adensiini metüleerimisega seotud ensüümide funktsioneerimise pöörduvaks mõjutamiseks inhibiitorite ja aktivaatorite abil.

Käesoleva lõputöö peamiseks eesmärgiks oli hiljuti avastatud adensiini N^6 -metüültransferaasi METTL16 inhibiitorite avastamine kasutades molekulaarsildamist. Molekulaarsildamine on levinud meetod ravimidisainis, kus bioloogilise sihtmärgi, enamasti valgu, 3D struktuuri sobitatakse erinevaid madalamolekulaarseid ühendeid ehk ligande ning uuritakse seostumise energeetilist efekti.

Antud töös kasutati suuremahulist molekulaarsildamist võttes sihtmärgiks Protein Data Bank andmebaasi valgu METTL16 kristallstruktuuri ning ligandidena ZINC15 andmebaasi bioloogilist aktiivust üles näidanud ühendite komplekti. Arvutusteks kasutati arvutiprogrammi Glide 7.8. Head tulemust üles näidanud ligandidele teostati uus sildamine täpsema algoritmi alusel ning seejärel valiti välja 7 parima tulemuse andnud ligandi eksperimentaalseteks katseteks.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. Posttranskriptsioonid modifikatsioonid

Post-transkriptsioonid on päristuumsetele rakkudele omased bioloogilised protsessid, mille käigus geenist tulenevast transkriptsioonijärgsest RNA-st ehk primaarsest transkriptist saadakse keemiliselt erinev küps funktsionaalne RNA molekul, mis saab raku tuumast lahkuda ning hakata rakus erinevaid rolle täitma [1]. N^6 -metüüladenosiin (m^6A) on läbiv keemiline modifikatsioon paljude organismide mRNA-s ja mittekodeerivas RNA-s, mis mõjutab RNA splaissimist (*splicing*), translatsiooni, stabiilsust ja ka mõnede RNA-de epigeneetilisi efekte [2, 3]. Adenosiini modifikatsiooni m^6A olemasolu raku RNA-s avastati esmakordselt 1974. aastal [4, 5], kuid sobiv analüüsimeetod m^6A kaardistamiseks kogu transkriptomis töötati välja alles 2012. aastal [2, 6]. Kaardistamise tulemusena leiti, et m^6A on väga selektiivne – seda esineb ainult mRNA mitte-transleeritava ala 3' otsas ja stoppkoodonite juures [2, 6]. Peale selle varieerub m^6A tase rakus dünaamiliselt sõltuvalt organismi arengust ja välistegurite mõjust [2, 6]. Need uuringud viitavad, et m^6A mõjutab mRNA teekonda ja funktsiooni rakkudes [7].

m^6A mõju on määratud kolme tüüpi valkude poolt: RNA m^6A metüültransferaaside, demetülaaside ja m^6A siduvate valkude poolt, mis kontrollivad vastavalt adenosiini 6-aminorühma metüleerimist, 6-metüüladenosiini demetüleerimist ja rakulist vastust 6-metüüladenosiinile nii tüvi- kui ka somaatilistes rakkudes [7, 8]. m^6A modifikatsiooniga RNAd on seostatud oluliste etappidega erinevate imetajate arengus, sealhulgas embrüonaalne areng, neurogenees, spermatogenees, ööpäevarütm, reageering välisele stressitekitajale, soo määramine ning tumorigenees, kuid ka paljude kudede, sealhulgas maksa, neerude ja aju funktsioneerimisega [9–12].

2.2. RNA m^6A metüültransferaasid, demetülaasid ja m^6A siduvad valgud

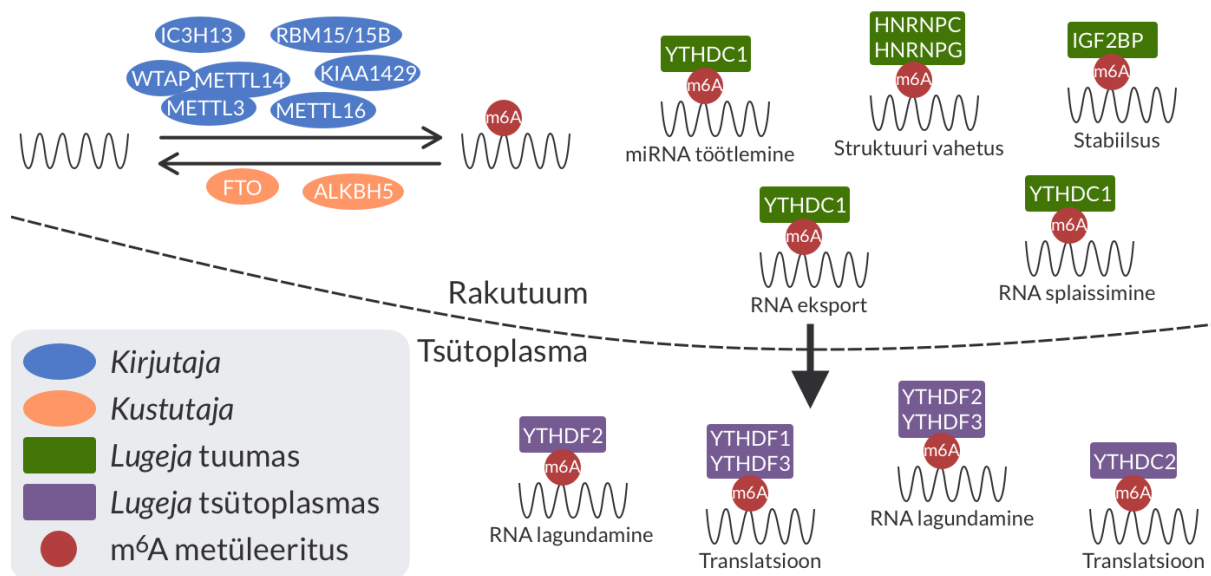
2.2.1. RNA m^6A metüültransferaasid („kirjutajad“)

Enim uuritud m^6A metüültransferaas ehk *kirjutaja* on mitmest valgust koosnev kompleks [13], mille esimeseks iseloomustatud komponendiks on S-adenosüülmetioniini siduv METTL3 (*methyltransferase-like 3*) [13]. METTL3 on päristuumsetes organismides alates pärmist kuni inimeseni tugevalt konserveerunud [14]. Teine kompleksi komponent on METTL14 ja see

kaas-lokalisereerub METTL3-ga interkromatiinsetes graanulites stabiilse 1:1 heterokompleksina [15, 16]. METTL3 on katalüütiliseks tsentriks, samas kui METTL14 on RNA seostumist stabiliseeriv struktuurne tugi [3]. WTAP (*Wilms' tumor 1-associated protein*) on kolmas kriitiline komponent selles m⁶A metüültransferaasi kompleksis. WTAP-il endal puudub konserveerunud katalüütiline metüleerimise domeen, kuid ta seostub kohanejavalguna (*adaptor protein*) nii METTL3 kui METTL14-ga [15]. On leitud, et METTL3-METTL14-WTAP kompleksiga on seostatavad teised valgud, nagu KIAA1429 [17], RBM15 ja RBM 15B [18] ning ZC3H13 [19, 20] ja arvatakse, et need on vajalikud METTL3-METTL14-WTAP funktsioneerimiseks rakus, kuid Selberg et al näitasid *in vitro* katsetes, et RNA metüleerimine toimib ka ainult METTL3-METTL14-WTAP kompleksiga ning m⁶A taset on võimalik madalamolekulaarsete ühenditega mõjutada [10].

2.2.2. RNA m⁶A siduvad valgud (“lugejad”)

Funktsionaalsed interaktsioonid m⁶A kirjutajate ja kustutajate vahel määravad dünaamiliselt m⁶A taseme tuumas. Bioloogiliselt väljenduva funktsiooni käivitamiseks tuleb m⁶A modifikatsioon tihti tsütoplasmas ära tunda erinevate lugejate poolt [21]. RNA m⁶A siduvad valgud, sealhulgas YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1 ja YTHDC2 domääni kuuluvad YT521-B (YTH) homoloogilisse perekonda. Need valgud (*lugejad*) omavad konserveerunud m⁶A siduvat domeeni ning seostuvad eelistatult [G/A/U]-[G/A]-m⁶A-C-[U/A/C] konsensusjärjestusega [3].



Joonis 1. RNA m⁶A modifikatsiooniga seotud metüültransferaasid, demetülaasid ja m⁶A lugejad ning lugejate teadaolev mõju [22].

2.2.3. RNA m⁶A demetülaasid („kustutajad“)

Esimene 2011. aastal tõestatud RNA m⁶A demetülaas, rasvamassi ja ülekaalulisusega seotud valk FTO (*fat mass and obesity-associated protein*) andis kinnitust, et m⁶A modifikatsioon on pöörduv ja dünaamiline [23]. Teine teadaolev RNA m⁶A demetülaas, α -ketoglutaraat-sõltuva dioksügenaasi homoloog 5 (ALKBH5), avastati 2013. aastal [24]. Mõlemad ensüümid FTO ja ALKBH5 vajavad kofaktoritena Fe(II) ning α -ketoglutaraati ning kummagi puudulikkus või üleekspressioon mõjutab m⁶A taset rakus. Hiljuti on avastatud ka tRNA-s m⁶A-ga seonduv ALKBH3 [25] ning eeldatakse ka teiste AlkB perekonda kuuluvate demetülaaside aktiivsuse kinnitamist m⁶A suhtes [26].

2.3. RNA m⁶A regulatsiooni tähtsus organismides

Nagu eelnevalt mainitud, omab m⁶A modifikatsiooni esinemine rolli paljudele organismi arengu- ja eluetappidele, kuid eriti on uuritud just m⁶A ja vähi tekke mehhanismide seost: RNA m⁶A hulga muutust on täheldatud ajukasvaja glioblastoomi, ägeda müeloidse leukeemia ehk verevähi, hepatotsellulaarse kartsinoomi ehk maksavähi, rinnavähi, kõhunäärme- ja eesnäärmevähi ning emakakaela- ja munasarjavähi korral. [2, 9, 11, 24]. Tabelis 1 on toodud erinevad vähkkasvajad, nende vähkkasvajate arengut mõjutav valk, mõjutusmehhanism ning mõjutusmehhanismi tagajärg vähkkasvaja rakkudele.

Tabel 1. RNA m⁶A Kirjutajate, lugejate ja kustutajate mõju erinevatele vähkkasvajatele.

Tüüp	Mõjutav valk	Mehhanism	Mõju vähile
Aju	METTL3	m ⁶ A esinemine alaekspressioon ADAM19 [27]	Kadumine
		m ⁶ A esinemine üleekspressioon POU3F2, SOX2, SALL2 ja OLIG2 [28]	Teke
	METTL14	m ⁶ A esinemine alaekspressioon ADAM19 [27]	Kadumine
	FTO	FTO inhibeerimine MA2 poolt [27]	Teke
	ALKBH5	m ⁶ A vähenemine üleekspressioon FOXM1 [29]	Teke
Vere	METTL3	m ⁶ A esinemine üleekspressioon BCL2 ja PTEN [30]	Teke
	METTL14	m ⁶ A esinemine üleekspressioon MYC ja MYB [31]	Teke

	FTO	m ⁶ A vähenemine destabiliseerib ASB2 ja RARA [32]	Teke
		m ⁶ A vähenemine stabiliseerib MYC ja CEBPA [33]	Teke
	ALKBH5	ALKBH5 alaekspresseeritus esineb verevähiga patsientidel [34]	Teke
Maksa	METTL3	m ⁶ A esinemine vähendab SOCS2 stabiilsust [35]	Teke
	METTL14	m ⁶ A esinemine miR126-s suurendab selle aktiivsust [36]	Kadumine
	YTHDF2	YTHDF2 on vähirakkudes üleekspresseeritud [37]	Teke
Rinna	METTL3	m ⁶ A esinemine üleekspresseerib HBXIP [38]	Teke
	ALKBH5	m ⁶ A vähenemine üleekspresseerib NANOG ja KLF4 [39]	Teke
Kõhu- näärme	ALKBH5	m ⁶ A vähenemine vähendab vähirakkude mobiilsust [40]	Kadumine
	YTHDF2	m ⁶ A esinemine suurendab AKT/GSK3β/ tsükliin D1 aktiivsust [41]	Teke
		m ⁶ A esinemine vähendab YAP stabiilsust [41]	Kadumine
Ees- näärme	YTHDF2	Kiirendab vähirakkudes m ⁶ A mRNA lagundamist [42]	Teke
Emaka- kaela	FTO	Vähendab vähirakkudele kemoradioteraapia mõju vähendades m ⁶ A hulka β-kateiinis [43]	Teke
Muna- sarja	METTL3	METTL3 alaekspresseeritus aktiveerib AKT [44]	Teke
	METTL14	METTL14 muteeritus aktiveerib AKT [44]	Teke

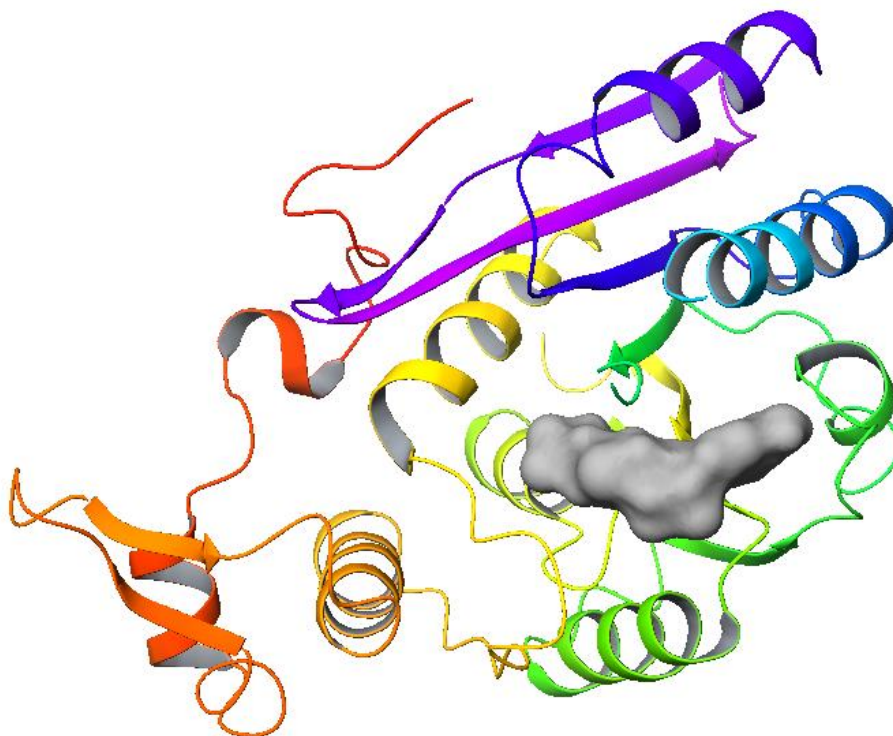
2.4. METTL16

Hiljuti avastatud METTL16 on METTL3 homolog, m⁶A metüültransferaas mis teadaolevalt metüleerib kaht substraati: U6 splaisosoomset RNA-d (U6 snRNA) ja MAT2A geeni mRNA-d [45]. U6 snRNA moodustab teiste snRNA-de (seniteada 5 erinevat) ja erinevate valkudega

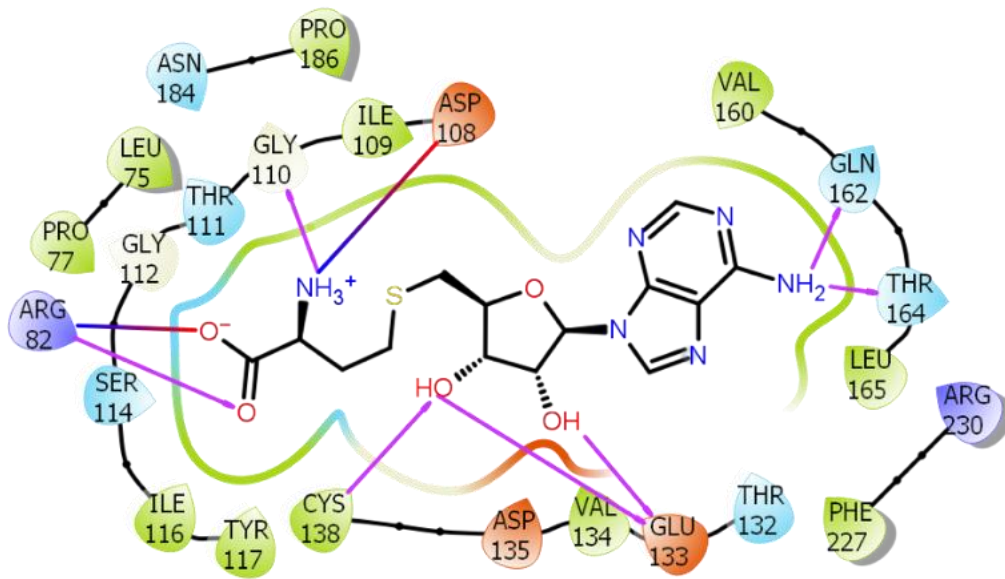
(umbes 80) raku tuumas organelli, splaisosoomi [46]. Splaisosoom lõikab pre-mRNA-st välja intronid ning valmistab seeläbi pre-mRNA ette translatsiooniks [46]. MAT2A geen ekspresseerub S-adenosüülmetioniini süntaasi valguna, mis reguleerib otseselt SAM-i taset rakus [45, 47].

METTL16 seob, kuid ei metüleeri, erinevaid rRNA, mRNA ja pikki mittekodeerivaid lncRNA molekule ning metastaasiga assotsieeritud kopsu adenokartsinoomi 1. transkripti 3' kolmikheeliksit MALAT1 [48, 49]. Need kaks erinevat rolli, metüleerimine ja seondumine, annavad alust käsitleda METTL16 nii RNA m⁶A metüültransferaasina kui ka *lugejana* [45]. Metüleerimisreaktsiooni kofaktoriga SAM seondub METTL16 valgu N-domeen ning RNA substraadiga valgu C-domeen [50]. Ruszkowzka et al tegid röntgenstruktuuranalüüsi abil kindlaks 2018. aastal METTL16 (1-498 aminohappejääki) ja METTL16 N-domeeni (1-291 aminohappejääki) 3D struktuuri [51].

Joonised 2 ja 3 iseloomustavad vastavalt halliga kujutatud SAH-i ruumilist paiknemist METTL16 suhtes ja SAH-i vesiniksidemeid METTL16 primaarstruktuuri moodustavate aminohappejääkidega.



Joonis 2. METTL16 kristallstruktuur.



Joonis 3. SAH-i ja METTL16 vahelised vesiniksidemed.

3. Metoodika

3.1. Molekulaarsildamine

3.1.1. Retseptori ja ligandide valik ning ettevalmistamine

Molekulaarsildamine viidi läbi kasutades Schrödinger LLC programmi Glide 7.8 [52]. Valgu molekulina kasutati Chen et al poolt kindlaks tehtud METTL16 N-domeeni kristallstruktuuri (291 aminohappejääki), PDB koodiga 6GFN [53]. Ligandidena kasutati ZINC15 [54] andmebaasist alla laetud ühendite komplekti, milles ühendid on üles näidanud aktiivsust loomvõi inimkatsetes (*in vivo subset*) [55].

Nii valgule kui ligandidele tehti sildamiseelne töötlus. Esialgselt kristallstruktuurist eemaldati valguga kaaskristallunud vee molekulid, ioonid ja metüleerimisreaktsiooni produkt S-adenosüülhomotsüsteiin (SAH), lisati puuduolevad vesiniku aatomid ja sulfiidsillad. Valgu aktiivtsentriks ja inhibiitorite märklauaks eeldati olevat SAH-iga seostunud piirkond. Molekulaarsildamisel kasutati OPLS3 jõuväljaga arvatud griidikaste, mille keskpunkt oli määratud koordinaatidega (x, y, z) . Sildamise välimise kasti küljepikkus oli 29Å ning sisemise kasti küljepikkus 10Å. Ligandide geomeetriselised 3D struktuurid optimeeriti programmi LigPrep abil [56].

Arvutused viidi läbi Molekulaartehnoloogia õppetooli arvutiserveris Asklepios.

3.1.2. Molekulaarsildamise arvutusmudel

Nii SVS kui ka XPS sildamismudeli korral iseloomustatakse geomeetriselt jäiga retseptorivalgu ja paindliku ligandi vahelist sidumise efektiivsust seostumisenergia ehk sildamiskoori (*docking score*) SS abil. Viimane arvutatakse lähtuvalt valemist

$$SS = E_{kulon} + E_{vdW} + E_{seos} + E_{trahv} \quad (2)$$

kus paarikaupa arvutatakse ligandi aatomite ja retseptori aatomite vaheline E_{kulon} ehk kuloniline vastastikmõju, E_{vdW} ehk van der Waalsi vastastikmõju, E_{seos} ehk siduvad vastastikmõjud ning E_{trahv} ehk nn. trahvienergia. Valemi (2) kaks viimast liiget avalduvad omakorda kui

$$E_{seos} = E_{hf\oob_sise} + E_{vs_nn} + E_{vs_qq} + E_{pi} + E_{vs_paar} + E_{hf\oob_paar} \quad (3)$$

ja

$$E_{trahv} = E_{desolv} + E_{ligand_pinge} \quad (4)$$

Seoseenergia E_{seos} liige E_{hfoob_paar} kirjeldab paarikaupa valgu ja ligandi aatomite vahelisi hüdrofoobseid interaktsioone. E_{hfoob_sise} võtab arvesse valgu hüdrofoobsete piirkondade topoloogiast tulenevaid mitteadiitiivseid efekte. E_{vs_paar} on ligandi ja valgu vaheliste vesiniksidemete panus seoseenergiasse. E_{vs_nn} arvestab pingestatud ja elektriliselt neutraalsete rühmade vahelise valk-vesi-ligand solvendisilla asendumisest valk-ligand vesiniksidemega tingitud energia muutust; pingestatus on tingitud veemolekuli madalamast entroopiast ning valgu konformatsiooni muutusest. E_{vs_qq} iseloomustab sarnast nähtust nagu E_{vs_nn} , kuid hõlmab ligandi ja retseptori elektriliselt laetud rühmade vahelisi solvendisildu ja nende asendumist. E_{pi} arvestab ligandi ja retseptori vaheliste π -interaktsioonide mõju.

Trahvienergia E_{trahv} liige E_{ligand_pinge} kompenseerib sildamise käigus ligandi konformatsiooni muutusest tulenevat energia muutust. E_{desolv} on valgu ja ligandi desolvatatsiooniga kaasnev vabaenergia muutus.

SVS kasutab energiatega arvutamiseks pehmemaid funktsioone, samas kui XPS kasutab täpsemalt parametrizeeritud trahvifunktsioone [57, 58].

3.2. RNA m⁶A kolorimeetiline määramine

METTL16-ga m⁶A modifikatsiooni sisseviimist biotiiniga markeeritud RNA oligonukleotiidahelale 5'-uacacucgaucuggacuaaagcugcuc-biotiin-3' (biotin-RNA) uuriti *in vitro* meetodil sarnaselt Selberg et al artiklis kirjeldatud tingimustele [10].

Optimaalse METTL16 kontsentratsiooni leidmiseks reaktsioonis uuriti RNA metüleerimise astet valgu 10 nM, 20 nM, 50 nM ja 80 nM lahjendusseries. Reaktsioonisegus kasutati koensüümi SAM 5000 nM ning substraati biotin-RNAd 4 uM kontsentratsioone puhvri 20 mM TRIS, 1 mM DTT, 100 nM Triton X-100 ning 6 nM RNaseOUT ensüümi juuresolekul. Viimane on vajalik ribonukleaaside võimaliku mõju vältimiseks. Reaktsioonisegu inkubeeriti 22 tundi 37 °C juures.

RNA oligonukleotiidi metüleerituse aste määrati kommertsiaalselt saadaval oleva EpiQuik™ kolorimeetrilise m⁶A kvantifitseerimiskomplektiga [59]. Analüüs koosnes mitmest etapist. Esmalt seoti reaktsioonisegust 90 minuti jooksul 37°C juures ensümaatilise sidumislahuse abil kogu RNA analüüsiplaadi aukude pinnale. Seejärel eemaldati reaktsioonisegu ning pesti

analüüsiplaati 3 korda pesulahusega. Lisati m⁶A-ga spetsiifiliselt seonduva antikeha lahust ning inkubeeriti toatemperatuuril 60 minutit. Järgnevalt eemaldati antikeha lahus ning pesti analüüsiplaati 3 korda pesulahusega. Lisati detekteerimislahus, mis sisaldas m⁶A-antikeha kompleksiga seonduvaid molekule ja inkubeeriti toatemperatuuril 30 minutit. Seejärel pesti analüüsiplaati 4 korda pesulahusega. Lisati neelduvussignaali võimendav lahus ning inkubeeriti toatemperatuuril 30 minutit. Analüüsiplaati pesti pesulahusega 5 korda ning lisati ilmutamislahus, plaati ilmutati toatemperatuuril 10 minutit pimedas. Viimaks lisati stopplahus, mis peatas ilmutamisreaktsiooni ning mõõdeti analüüsiplaadi aukude optiline neelduvus 450 nm juures. Meetodi töökindlust kontrolliti, selleks viidi mõõtmised läbi katsekomplektiga kaasas oleva positiivse kontrolli lahusega, mis sisaldas kindla koguse standardselt m⁶A metüleeritud RNA-d ning negatiivse kontrolli lahusega, mis ei sisaldanud m⁶A modifitseeritud RNA-d.

3.3. Biokihi interferomeetria

Ligandide sidumist METTL16 valgule püüti uurida biokihi interferomeetria meetodi abil [10]. Biokihi interferomeetria on analüüsimeetod, mis põhineb analüüdi seonduisel sensori otsa pinnaga. Sensori ots koosneb mitmest erineva paksusega kihist: keemiliselt passiivsest referentspinnast, referentspinnaga pöördumatult seotud sensorpinnast (antud eksperimendis streptavidiin) ning sensorpinnaga seonduv analüüdikiht. Analüüdi seonduisel muutub analüüdikihi paksus ja optiline läbilaskvus. Referentspinnalt peegelduv valguslaineline interfereerub analüüdikihilt peegeldunud valguslainega, tagasi peegeldunud väljundsignaal sõltub otseselt analüüdi pindkontsentratsioonist [60, 61].

Inhibiitorite seondumist METTL16-ga uuriti instrumendiga Octet K2, sensorikattena kasutati streptavidiini [10]. Ligandide ja METTL16 lahuste tegemiseks kasutati HEPES (pH=7,5) puhvrit. Ligandide jaoks kasutati 5 µM lahused, 0,5 µg METTL16 lahustati 200 µL puhverlahuses.

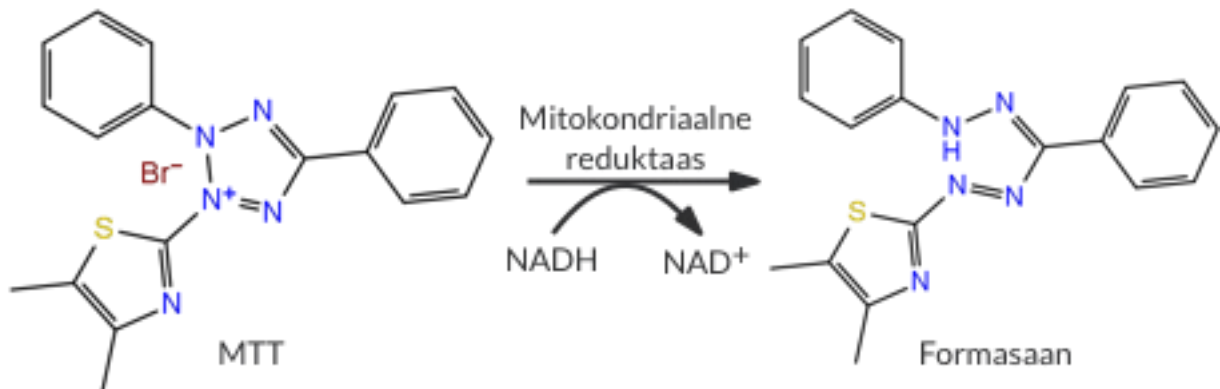
Sensordid tasakaalustati väljalülitatult puhverlahuses 10 minutit, seejärel registreeriti 30 sekundi jooksul baasijoon. Inhibiitorite seondumise mõõtmiseks laeti sensor 180 sekundi jooksul METTL16-ga, seejärel registreeriti puhverlahuses 30 s jooksul baasijoon. Järgnevalt viidi sensor 180 sekundiks uuritava inhibiitori lahusesse ning viimaks mõõdeti dissotsiatsioon 180 sekundi jooksul puhverlahuses.

3.4. HEK-293 rakuliini rakkude proliferatsiooni määramine

Ühendite edasisteks uuringuteks bioloogilistes katsetes on oluline teada nende (raku) toimet rakkudele. Potentsiaalsete METTL16 suhtes aktiivsete ühendite aktiivsus rakkudele määrati HEK-293 rakuliinil Abcam™ tootega *MTT Assay Kit (Cell Proliferation)* [62]. Ühendid lahustati DMEM puhvril lõppkontsentratsioonidega 1000 µM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, mis sisaldasid kuni 0,6% DMSO-d. Kontroll-lahusena kasutati 0,6% DMSO lahust.

HEK-293 rakke kasvatati DMEM söötmes, millele oli lisatud 10% FBS ning penitsilliin-streptomütsiin, 5% CO₂ atmosfääris 37°C juures. 96 auguga plaadile kanti 8000 rakku ning lasti rakkudel plaadile kinnituda. Plaadile kinnitunud rakkudele lisati erinevates kontsentratsioonides ligandide lahused ning kontroll-lahused. Rakke inkubeeriti 24 tundi 5% CO₂ atmosfääris 37°C juures. Rakkudelt aspireeriti ligandide lahused ning lisati DMEM söötme ning MTT reagenti lahused. Rakke inkubeeriti 3 tundi 5% CO₂ atmosfääris 37°C juures. Lisati MTT solvent ning 15 minuti möödudes registreeriti lahuste neelduvussignaali 590 nm juures.

Normaalselt funktsioneerivad rakud metaboliseerivad mitokondriaalse reduktaasi ensüümi abil vees lahustuva tetrasooli-põhise värvaine MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasoolium bromiid) vees lahustumatuks formasaaniks ((E,Z)-5-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-1,3-difenüülformasaan).



Joonis 4. Formasaani teke MTT-st.

Elus rakkude hulga määramiseks mõõdetakse spektraalne neelduvus inhibiitorita kontroll-lahuse suhtes formasaanile vastaval lainepikkusel, milleks on 590 nm. Surnud rakud formasaani ei genereeri ja neelduvussignaali ei anna.

4. Tulemused ja arutelu

4.1. Molekulaarsildamise tulemused

Molekulaarsildamine teostati kahes järgus. Esmalt sooritati ZINC andmebaasi 130 000 *in vivo* andmehulga ligandidega [55] suuremahuline virtuaalne sõelumine (SVS), kasutades molekulaarsildamist. Saadud tulemuste alusel valiti välja 5000 ühendit parima sildamiseefektiivsusega (SE):

$$SE = \left| \frac{\Delta G}{N} \right|$$

kus ΔG on ligandi sidumise vaba energia ning N ligandi raskete aatomite (aatomid, mis ei ole vesinikud) arv. Nende ühendite jaoks viidi läbi täpsustav molekulaarsildamine XPS (*extra precision*) algoritmi alusel [57].

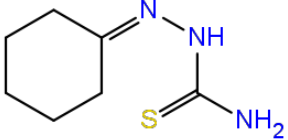
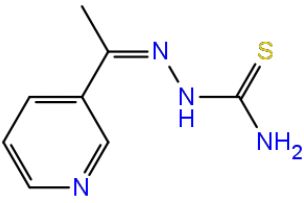
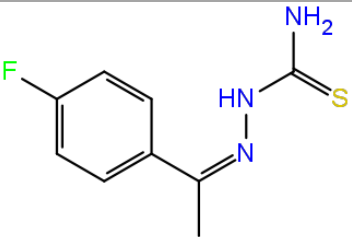
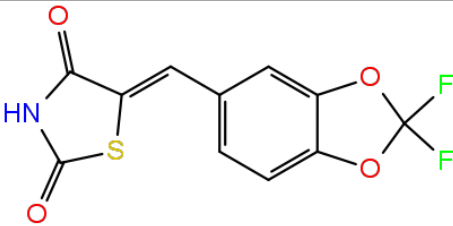
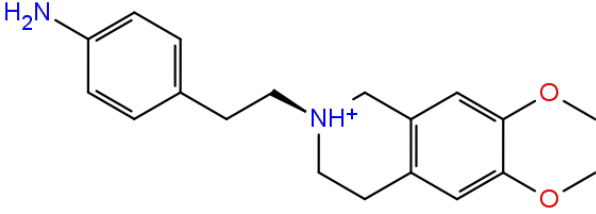
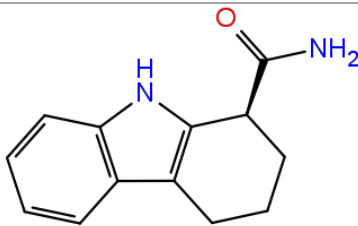
Esimeses etapis leitud 5000 ühendiga valimist valiti eksperimentaalseks valideerimiseks välja madalaima XPS seostumisenergiaga (SE) molekulid, mis vastasid järgnevatele tingimustele:

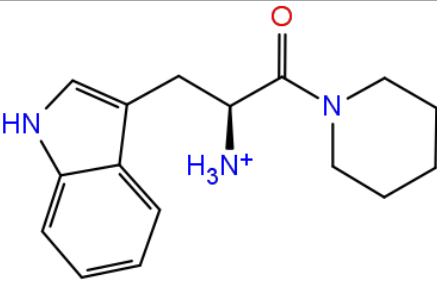
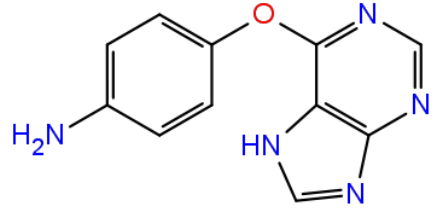
- Seostumisskoor (SS) oli suurem kui 0,25
- Ühend ei sisalda mittespetsiifilist seondumist andvaid fosfaatrühmi;
- Ühendi interaktsioonid retseptoriga hõlmasid samu aminohappejääke ja toimusid samas ruumi piirkonnas, mis retseptori ja SAM-i vahel;
- Ühend ei olnud mõni organismis rohkesti esinev metaboliit;
- Ühend on kommertsiaalselt tellitav (firma MolPort).

Lõplik valim sisaldas 7 ühendit.

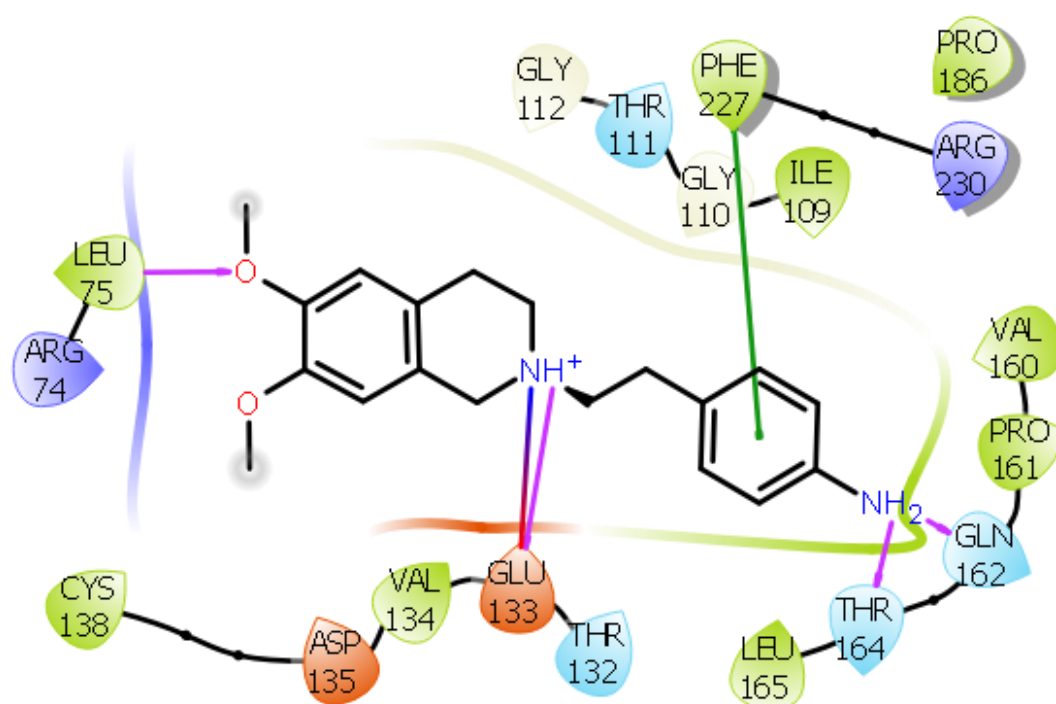
Ühend **8** kaasati katsetesse, kuna eeldatavasti on antud ühend METTL3-METTL14 kompleksi potentsiaalne inhibiitor ning ühendi käitumine METTL16 ensüümi suhtes on huvipakkuv. Ühendite number, struktuur, ligandide sildamiseefektiivsus (SE) ja sildamisskoor (SS) on koondatud tabelisse 2.

Tabel 2. Eksperimentaalseteks katseteks kasutatud ühendid.

Ühendi struktuur	SE [$\frac{\text{kcal}}{\text{mol atom}}$]	SS [$\frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$]	Ühendi nr.
	0,519	-5,705	1
	0,481	-6,255	2
	0,463	-6,486	3
	0,363	-6,892	4
	0,353	-8,118	5
	0,330	-5,272	6

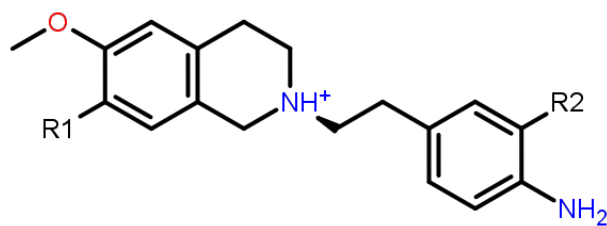
	0,291	-5,827	7
	0,282	-4,797	8

Parima sildamisskooriga ühendi **5** ja METTL16 valgü vahelised peamised interaktsioonid on toodud joonisel 5.



Joonis 5. Ühendi **5** peamised interaktsioonid METTL16 valguga.

Aktseptoorset vesiniksidet annab metoksürühma hapniku aatom aminohappejäägi 75-leutsiini amiidse vesinikuga. Ligandi aromaatses tuumaga seotud aminorühma mõlemad vesiniku aatomid moodustavad doonoritena vesiniksidemeid 162-glutamiini ja 164-treoniini karbonüülrühmadega. Vesiniksidet doonorina loob ka kvaternaarse aminorühma vesinik 133-



Joonis 7. Ühendi 5 struktuursed analoogid.

Tulemused on koondatud tabelisse 3.

Tabel 3. Ühendi 5 struktuurianaloogide sildamisskoorid.

Ühend	5	5aa	5ba	5ca
SS $\left[\frac{kcal}{mol}\right]$	-8,118	-9,356	-8,744	-8,477

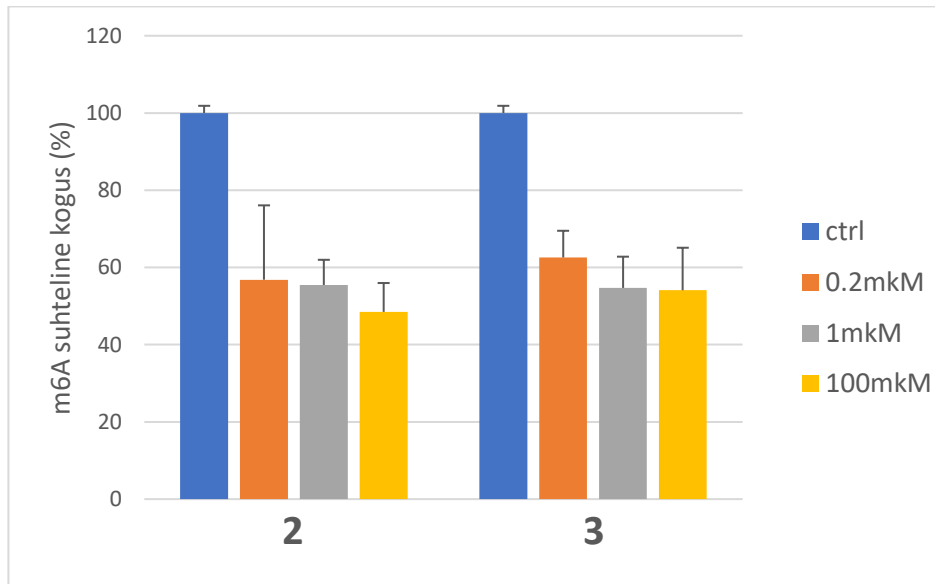
Antud töö eksperimentides ühendeid **5aa**, **5ba** ning **5ca** ei kasutatud, kuid parema sildamisskoori tõttu oleks huvipakkuv nende ühendite mõju uurimine METTL16 suhtes.

4.2. Eksperimentaalse osa tulemused

4.2.1. RNA m⁶A kolorimeetriline määramine

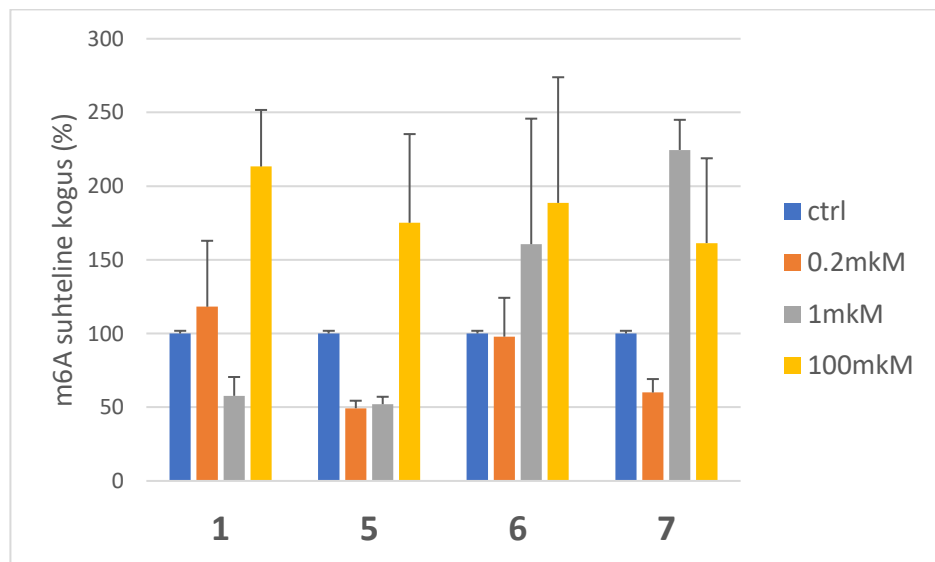
Eksperimentaalsed katsed viidi läbi punktis 3.1. kirjeldatud tingimustel lõpliku valimi moodustanud molekulidega **1** – **7**. Molekulaarsildamise abil ennustatud tugevalt seonduvate METTL16 valguga ligandide bioloogilise aktiivsuse uurimiseks teostati eelkatsed kasutades m⁶A antikehal põhinevat m⁶A määramismeetodit. Katsed viidi läbi kolmel erineval ligandi kontsentratsioonil, s.o. 0,2 μM, 1 μM ja 100 μM ning ligande mittesisaldavas kontroll-lahuses. Kontsentratsioonide vahemik valiti põhimõttel, et edasiste bioloogiliste katsete jaoks oleks huvipakkuvad ühendid, mille aktiivne kontsentratsioon EC₅₀ oleks vähemalt madal-mikromolaarsel tasemel. RNA m⁶A metüleerituse aste ehk metüleeritud adenosini sisaldus võrreldes kogu adenosini sisaldusega RNAs erinevate ühendite ning võrdluskatse korral on koondatud joonistele 8-11, kus veatulbad tähistavad kordusmõõtmiste standardhälvet.

Huvitaval kombel jagunevad uuritud ühendid oma toime poolt METTL16 ensümaatilisele aktiivsusele mitmesse rühma. Ühendid **2** ja **3** omavad selget m⁶A metüleerimist inhibeerivat efekti juba 0,2 µM kontsentratsiooni juures (joonis 8).



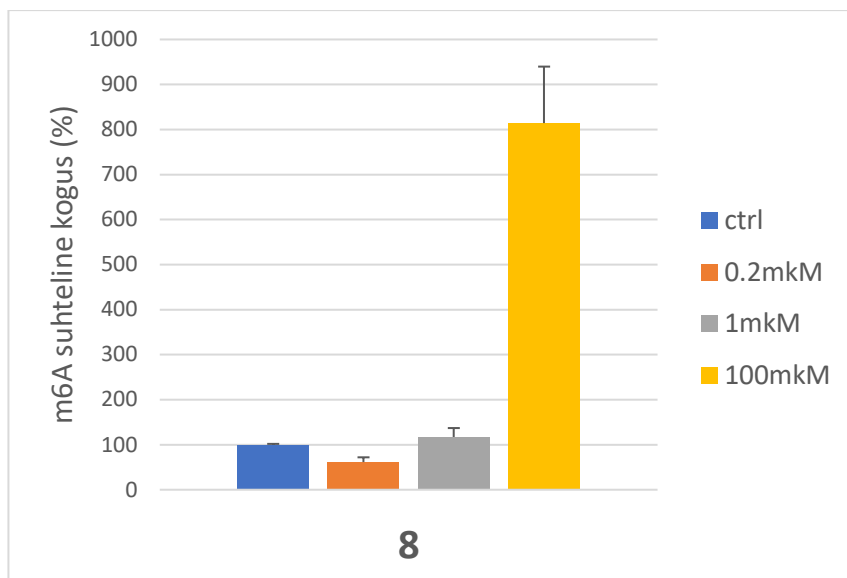
Joonis 8. Ühendite **2** ja **3** inhibeeriv toime valgu METTL16 m⁶A metüleerimise aktiivsusele.

Seevastu ühendid **1**, **5**, **6** ja **7** toimivad METTL16 m⁶A metüleerimise aktivaatoritena. Märkimisväärne metüleerimise aktivatsioon on täheldatav ligandide 100 µM kontsentratsiooni juures (joonis 9).



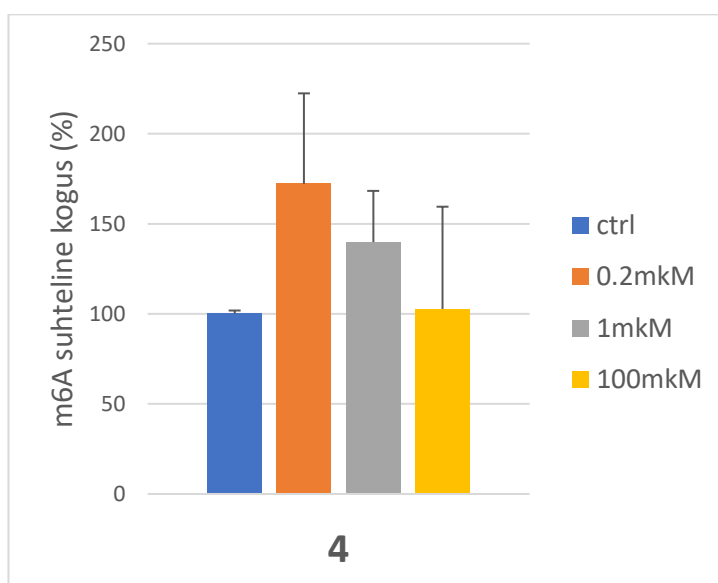
Joonis 9. Ühendite **1**, **5**, **6** ja **7** aktiveeriv toime valgu METTL16 m⁶A metüleerimise aktiivsusele.

Eriti suur metüleerimise aktivatsioon registreeriti ühendi **8** korral, mil m⁶A metüleerimise tase mitmekordistus võrreldes kontroll-lahusega (joonis 10).



Joonis 10. Ühendi **8** aktiveeriv toime valgu METTL16 m^6A metüleerimise aktiivsusele.

Ilmselt pole tegemist artefaktiga, kuna samasugune tulemus saadi kolme korduskatse puhul. Metüleerimise aktiveerimine madalmolekulaarsete RNA metüültransferaasi ligandide poolt on suhteliselt harukordne, esimesena leiti seda Selberg et al poolt RNA m^6A metüültransferaasi kompleksi METTL3/METTL14/WTAP korral [10]. Samas on see bioloogiliselt väga huvipakkuv, kuna avardab RNA m^6A regulatsiooniga seotud uurimisvõimalusi. Ühendi **4** käitumine (joonis 11) on selgusetu. Toimub jällegi METTL16 aktivatsioon, kuid see kasvab vastupidiselt loogilisele eeldusele ligandi kontsentratsiooni alanedes.



Joonis 11. Ühendi **4** mõju valgu METTL16 m^6A metüleerimise aktiivsusele.

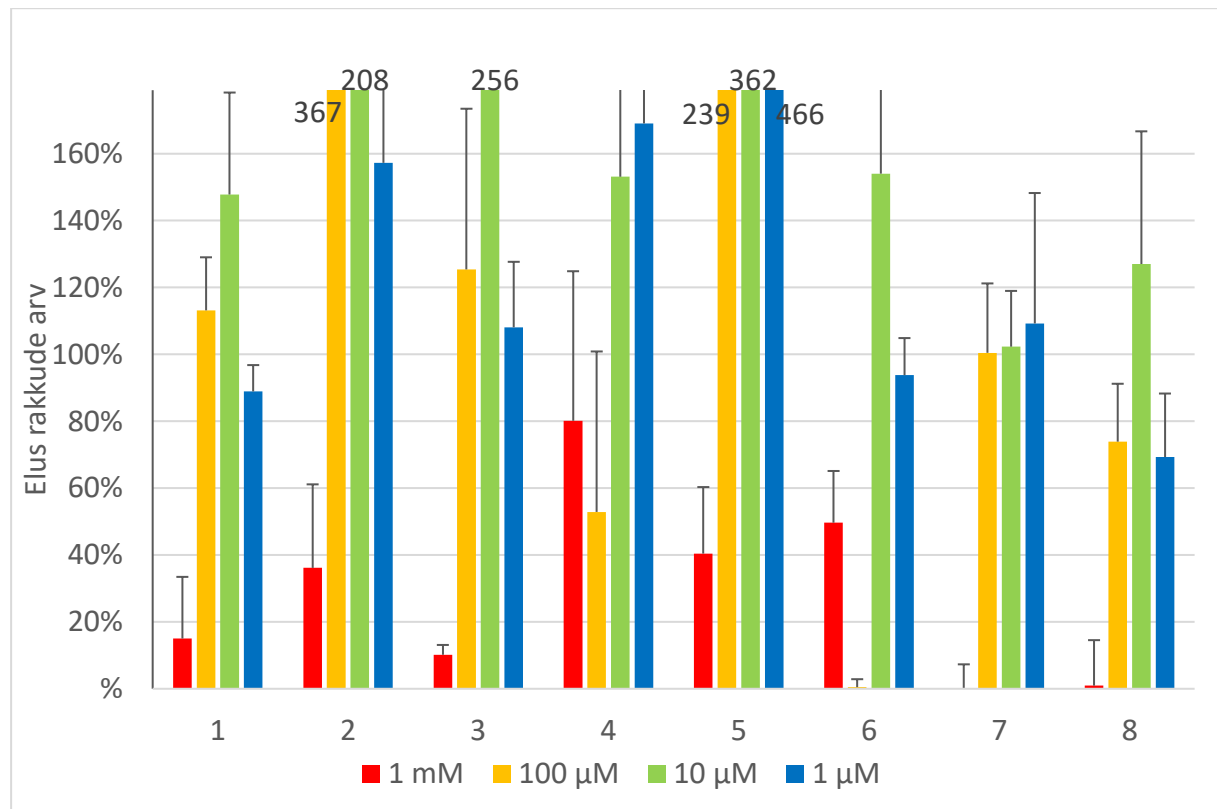
Edasistes uuringutes tuleks täpsustada leitud METTL16 inhibiitorite inhibeerimise kontsentratsioonid IC50 ning aktivaatorite efektiivsed kontsentratsioonid EC50. Kindlasti pakuvad huvi täpsemad ühendite **4** ja **8** uuringud, selgitamaks nende ebaharilikku käitumist METTL16 aktivaatoritena.

4.2.2. Biokihi interferomeetria

Biokihi interferomeetria katsed ei andnud tulemusi ühegi mõõdetud ühendi korral. Probleemiks ei olnud ligandide võimalik nõrk sidumine METTL16 valguga, katsete ebaõnnestumine avaldus liiga nõrga ja mürase väljundsignaalina, mille põhjuseks oli METTL16 vähene seondumine sensori pinnaga. Võimalik lahendus oleks biotiiniga markeeritud METTL16 süntees ja kasutamine eksperimentis.

4.2.3. METTL16 aktiivsete ligandide toime rakkude proliferatsioonile

Ühendite toimet rakkude proliferatsioonile mõõdeti kasutades HEK-293 rakuliini. Rakkude hulk ühendite erinevatel kontsentratsioonidel on toodud joonisel 12.



Joonis 12. HEK-293 rakuliini elusrakkude suhtelise hulga muutus erinevate METTL16 valgu ligandide kontsentratsioonide korral. Tulpade tipus on toodud teljestikust välja ulatuvad väärtused.

1 mM kontsentratsiooni juures avaldasid kõik ühendid rakkude suremusele märkimisväärset mõju. Ühendite **2**, **3**, ja **5** korral täheldati juba alates 1 μ M kontsentratsioonist olulist rakkude proliferatsiooni kasvu. Selline toime võib olla oluline kudede regeneratsiooni soodustamiseks. Teiste ühendite korral oli toime rakkude proliferatsioonile ja suremusele madalamatel kontsentratsioonidel vähem märkimisväärne.

5. Kokkuvõte

Käesolevas töös avastati esimesed valgu METTL16 aktiivsust mõjutavad ained kasutades suuremahulist molekulaarsildamist suurtes keemiliste ühendite andmebaasides. Töö esialgseks eesmärgiks oli vähemalt ühe METTL16 inhibiitori kindlakstegemine arvutusliku modelleerimise abil ning eksperimentaalne valideerimine, kuid üllatuslikult avaldasid katsetesse kaasatud 8-st ühendist 5 ühendit RNA 6-metüüladenosiini metüleerimist aktiveerivat toimet ning 2 ühendit käitusid METTL16 inhibiitoritena. Ühe ühendi mõju jäi selgusetuks ning vajab edasist uurimist.

Arvestades RNA m⁶A suurt tähtsust nii organismide normaalsetes füsioloogilistes kui ka patoloogilistes protsessides, on METTL16 suhtes aktiivsete ühendite edasised uuringud vajalikud ning suurt huvi pakkuvad. Inhibiitorite ja aktivaatorite mõju täpsemaks kvantifitseerimiseks tuleks läbi viia katsed parameetrite IC₅₀ ja EC₅₀ määramiseks. Peale selle nõuab selgitust ka aktiivsust üles näidanud ainete toimemehhanism valgu aktiivtsentris, mille uurimist võiks läbi viia molekulaardünaamiliste simulatsioonide abil, aga kasutades ka valgu aminohapete punktmutatsioone aktiivses tsentris ning aktiivsete ühendite ja METTL16 valgu komplekside kristallstruktuuri määramist. Kolmandaks tuleks optimeerida töös avastatud ühendite struktuurid, need sünteesida ning uurida ka optimeeritud ühendite aktiivsust METTL16 suhtes. Suurt praktilist huvi pakub edasine ühendite toime uurimine erinevate vähivormide rakkudele.

6. Kasutatud kirjandus

1. Kiss T (2001) Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J*.
2. Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, Cesarkas K, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Kupiec M, Sorek R, Rechavi G (2012) Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11112>
3. Wang X, Lu Z, Gomez A, Hon GC, Yue Y, Han D, Fu Y, Parisien M, Dai Q, Jia G, Ren B, Pan T, He C (2014) N 6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature12730>
4. Desrosiers R, Friderici K, Rottman F (2006) Identification of Methylated Nucleosides in Messenger RNA from Novikoff Hepatoma Cells. *Proc Natl Acad Sci*. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.3971>
5. Perry RP, Kelley DE (1974) Existence of methylated messenger RNA in mouse L cells. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(74\)90153-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(74)90153-6)
6. Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR (2012) Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.003>
7. Meyer KD, Jaffrey SR (2017) Rethinking m 6 A Readers, Writers, and Erasers . *Annu Rev Cell Dev Biol*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060758>
8. Yoon KJ, Ringeling FR, Vissers C, Jacob F, Pokrass M, Jimenez-Cyrus D, Su Y, Kim NS, Zhu Y, Zheng L, Kim S, Wang X, Doré LC, Jin P, Regot S, et al (2017) Temporal Control of Mammalian Cortical Neurogenesis by m 6 A Methylation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.003>
9. DH M, D M (2015) m6a RNA Methylation: The Implications for Health and Disease. *J Cancer Sci Clin Oncol*. <https://doi.org/10.15744/2394-6520.1.105>
10. Selberg, Blokhina, Aatonen, Mervaala, Kankuri, Karelson Discovery of Small Molecules that Activate RNA Methylation through Cooperative Binding to the METTL3-14-WTAP Complex Active Site. *Cell Reports* 26, 3762–3771
11. Pan Y, Ma P, Liu Y, Li W, Shu Y (2018) Multiple functions of m6A RNA methylation in cancer. *J. Hematol. Oncol*.
12. Niu Y, Zhao X, Wu YS, Li MM, Wang XJ, Yang YG (2013) N6-methyl-adenosine (m6A) in RNA: An Old Modification with A Novel Epigenetic Function. *Genomics*,

13. Bokar JA, Rath-Shambaugh ME, Ludwiczak R, Narayan P, Rottman F (1994) Characterization and partial purification of mRNA N⁶-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei: Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *J Biol Chem*
14. Bokar JA, Shambaugh ME, Polayes D, Matera AG, Rottman FM (1997) Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N⁶-adenosine)-methyltransferase. *RNA*
15. Liu J, Yue Y, Han D, Wang X, Fu Y, Zhang L, Jia G, Yu M, Lu Z, Deng X, Dai Q, Chen W, He C (2014) A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation. *Nat Chem Biol.* <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>
16. Wang P, Doxtader KA, Nam Y (2016) Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases. *Mol Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.041>
17. Schwartz S, Mumbach MR, Jovanovic M, Wang T, Maciag K, Bushkin GG, Mertins P, Ter-Ovanesyan D, Habib N, Cacchiarelli D, Sanjana NE, Freinkman E, Pacold ME, Satija R, Mikkelsen TS, et al (2014) Perturbation of m⁶A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Rep.* <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.048>
18. Patil DP, Chen CK, Pickering BF, Chow A, Jackson C, Guttman M, Jaffrey SR (2016) M⁶A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/nature19342>
19. Wen J, Lv R, Ma H, Shen H, He C, Wang J, Jiao F, Liu H, Yang P, Tan L, Lan F, Shi YG, He C, Shi Y, Diao J (2018) Zc3h13 Regulates Nuclear RNA m⁶A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Mol Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.015>
20. Knuckles P, Lence T, Haussmann IU, Jacob D, Kreim N, Carl SH, Masiello I, Hares T, Villaseñor R, Hess D, Andrade-Navarro MA, Biggiogera M, Helm M, Soller M, Bühler M, et al (2018) Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor RbM15/spenito to the m⁶a machinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes Dev.* <https://doi.org/10.1101/gad.309146.117>
21. Allis CD, Jenuwein T (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.*
22. Sun T, Wu R, Ming L (2019) The role of m⁶A RNA methylation in cancer. *Biomed*

- Pharmacother 112:108613. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108613>
23. Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, Yi C, Lindahl T, Pan T, Yang YG, He C (2011) N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>
 24. Zheng G, Dahl JA, Niu Y, Fedorcsak P, Huang CM, Li CJ, Vågbø CB, Shi Y, Wang WL, Song SH, Lu Z, Bosmans RPG, Dai Q, Hao YJ, Yang X, et al (2013) ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Mol Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>
 25. Ueda Y, Ooshio I, Fusamae Y, Kitae K, Kawaguchi M, Jingushi K, Hase H, Harada K, Hirata K, Tsujikawa K (2017) AlkB homolog 3-mediated tRNA demethylation promotes protein synthesis in cancer cells. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/srep42271>
 26. Iyer LM, Tahiliani M, Rao A, Aravind L (2009) Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle*. <https://doi.org/10.4161/cc.8.11.8580>
 27. Cui Q, Shi H, Ye P, Li L, Qu Q, Sun G, Sun G, Lu Z, Huang Y, Yang CG, Riggs AD, He C, Shi Y (2017) m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Rep*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.059>
 28. Visvanathan A, Patil V, Arora A, Hegde AS, Arivazhagan A, Santosh V, Somasundaram K (2018) Essential role of METTL3-mediated m 6 A modification in glioma stem-like cells maintenance and radioresistance. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.351>
 29. Zhang S, Zhao BS, Zhou A, Lin K, Zheng S, Lu Z, Chen Y, Sulman EP, Xie K, Bögler O, Majumder S, He C, Huang S (2017) m6A Demethylase ALKBH5 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells by Sustaining FOXM1 Expression and Cell Proliferation Program. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.02.013>
 30. Vu LP, Pickering BF, Cheng Y, Zaccara S, Nguyen D, Minuesa G, Chou T, Chow A, Saletore Y, Mackay M, Schulman J, Famulare C, Patel M, Klimek VM, Garrett-Bakelman FE, et al (2017) The N 6 -methyladenosine (m 6 A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/nm.4416>
 31. Weng H, Huang H, Wu H, Qin X, Zhao BS, Dong L, Shi H, Skibbe J, Shen C, Hu C, Sheng Y, Wang Y, Wunderlich M, Zhang B, Dore LC, et al (2018) METTL14 Inhibits Hematopoietic Stem/Progenitor Differentiation and Promotes Leukemogenesis via mRNA m 6 A Modification. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.11.016>

32. Li Z, Weng H, Su R, Weng X, Zuo Z, Li C, Huang H, Nachtergaele S, Dong L, Hu C, Qin X, Tang L, Wang Y, Hong GM, Huang H, et al (2017) FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N⁶-Methyladenosine RNA Demethylase. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.017>
33. Su R, Dong L, Li C, Nachtergaele S, Wunderlich M, Qing Y, Deng X, Wang Y, Weng X, Hu C, Yu M, Skibbe J, Dai Q, Zou D, Wu T, et al (2018) R-2HG Exhibits Anti-tumor Activity by Targeting FTO/m⁶A/MYC/CEBPA Signaling. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.031>
34. Kwok CT, Marshall AD, Rasko JEJ, Wong JJJ (2017) Genetic alterations of m⁶A regulators predict poorer survival in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0410-6>
35. Chen M, Wei L, Law CT, Tsang FHC, Shen J, Cheng CLH, Tsang LH, Ho DWH, Chiu DKC, Lee JMF, Wong CCL, Ng IOL, Wong CM (2018) RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.29683>
36. Ma JZ, Yang F, Zhou CC, Liu F, Yuan JH, Wang F, Wang TT, Xu QG, Zhou WP, Sun SH (2017) METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N⁶-methyladenosine-dependent primary MicroRNA processing. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.28885>
37. Yang Z, Li J, Feng G, Gao S, Wang Y, Zhang S, Liu Y, Ye L, Li Y, Zhang X (2017) MicroRNA-145 Modulates N⁶-methyladenosine levels by targeting the 3'-untranslated mRNA Region of the N⁶-Methyladenosine Binding YTH domain family 2 protein. *J Biol Chem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.749689>
38. Cai X, Wang X, Cao C, Gao Y, Zhang S, Yang Z, Liu Y, Zhang X, Zhang W, Ye L (2018) HBXIP-elevated methyltransferase METTL3 promotes the progression of breast cancer via inhibiting tumor suppressor let-7g. *Cancer Lett*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.018>
39. Zhang C, Samanta D, Lu H, Bullen JW, Zhang H, Chen I, He X, Semenza GL (2016) Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc Natl Acad Sci*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602883113>
40. He Y, Hu H, Wang Y, Yuan H, Lu Z, Wu P, Liu D, Tian L, Yin J, Jiang K, Miao Y (2018) ALKBH5 Inhibits Pancreatic Cancer Motility by Decreasing Long Non-Coding RNA KCNK15-AS1 Methylation. *Cell Physiol Biochem*.

<https://doi.org/10.1159/000491915>

41. Chen J, Sun Y, Xu X, Wang D, He J, Zhou H, Lu Y, Zeng J, Du F, Gong A, Xu M (2017) YTH domain family 2 orchestrates epithelial-mesenchymal transition/proliferation dichotomy in pancreatic cancer cells. *Cell Cycle*. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1380125>
42. Li J, Xie L, Wang X, Xu M, Wang S, He L, Xu X, Meng S (2017) Downregulation of N6-methyladenosine binding YTHDF2 protein mediated by miR-493-3p suppresses prostate cancer by elevating N6-methyladenosine levels. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23365>
43. Zhou S, Bai ZL, Xia D, Zhao ZJ, Zhao R, Wang YY, Zhe H (2018) FTO regulates the chemo-radiotherapy resistance of cervical squamous cell carcinoma (CSCC) by targeting β -catenin through mRNA demethylation. *Mol Carcinog*. <https://doi.org/10.1002/mc.22782>
44. Liu J, Eckert MA, Harada BT, Liu SM, Lu Z, Yu K, Tienda SM, Chryplewicz A, Zhu AC, Yang Y, Huang JT, Chen SM, Xu ZG, Leng XH, Yu XC, et al (2018) m⁶A mRNA methylation regulates AKT activity to promote the proliferation and tumorigenicity of endometrial cancer. *Nat Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0174-4>
45. Pendleton KE, Chen B, Liu K, Hunter O V, Xie Y, Tu BP, Correspondence NKC (2017) The U6 snRNA m⁶A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention In Brief An RNA methyltransferase controls cellular SAM levels through post-transcriptional regulatory feedback. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.003>
46. Will CL, Lührmann R (2011) Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>
47. Shima H, Matsumoto M, Ishigami Y, Ebina M, Muto A, Sato Y, Kumagai S, Ochiai K, Suzuki T, Igarashi K (2017) S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N6-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Rep*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.092>
48. Warda AS, Kretschmer J, Hackert P, Lenz C, Urlaub H, Höbartner C, Sloan KE, Bohnsack MT (2017) Human METTL16 is a N⁶-methyladenosine (m⁶A) methyltransferase that targets pre-mRNAs and various non-coding RNAs. *EMBO Rep*. <https://doi.org/10.15252/embr.201744940>
49. Brown JA, Kinzig CG, DeGregorio SJ, Steitz JA (2016) Methyltransferase-like protein 16 binds the 3'-terminal triple helix of MALAT1 long noncoding RNA. *Proc Natl Acad Sci*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614759113>

50. Martin JL, McMillan FM (2002) SAM (dependent) I AM: The S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr. Opin. Struct. Biol.*
51. Ruszkowska A, Ruszkowski M, Dauter Z, Brown JA (2018) Structural insights into the RNA methyltransferase domain of METTL16. *Sci Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23608-8>
52. Schrödinger L (2018) Schrödinger Release 2018-3: Glide
53. Chen KM, Mendel M, Homolka D, McCarthy AA, Pillai RS Protein Data Bank. <https://www.rcsb.org/structure/6GFN>. Accessed 18 Oct 2018
54. Irwin J., Shoichet B. (2005) ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *J Chem Inf Model* 177–182
55. ZINC15, in vivo subset. <https://zinc15.docking.org/substances/subsets/>. Accessed 26 Nov 2018
56. Schrödinger L (2018) Schrödinger Release 2018-3: LigPrep
57. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, Sanschagrin PC, Mainz DT (2006) Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem.* <https://doi.org/10.1021/jm051256o>
58. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, Repasky MP, Knoll EH, Shelley M, Perry JK, Shaw DE, Francis P, Shenkin PS (2004) Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J Med Chem.* <https://doi.org/10.1021/jm0306430>
59. (2014) m6A RNA Methylation Quantification Kit (Colorimetric). <https://www.epigentek.com/catalog/epiquik-m6a-rna-methylation-quantification-kit-colorimetric-p-3646.html?currency=USD>
60. Nirschl M, Reuter F, Vörös J, Nirschl M, Reuter F, Vörös J (2011) Review of Transducer Principles for Label-Free Biomolecular Interaction Analysis. *Biosensors* 1:70–92. <https://doi.org/10.3390/bios1030070>
61. Shah NB, Duncan TM (2014) Bio-layer interferometry for measuring kinetics of protein-protein interactions and allosteric ligand effects. *J Vis Exp* e51383. <https://doi.org/10.3791/51383>
62. abcam (2019) MTT Assay Kit (Cell Proliferation). <https://www.abcam.com/mtt-assay-kit-cell-proliferation-ab211091.html#top-100>. Accessed 8 May 2019

7. Litsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.

Mina Mihkel Kotli

(sünnikuupäev 09.09.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„RNA metüültransferaasi METTL16 inhibiitorid ja aktivaatorid“,
mille juhendajad on Mati Karelson ja Simona Selberg,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil,
sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **30.06.2022** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2019.