

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Metüültransferaaside ko-faktori TRMT112 mutatsioonanalüüs

Bakalaureusetöö

Lõputöö maht (12 EAP)

Robert Johannes Sarap

Juhendaja: Margit Mutso, PhD

Kaasjuhendaja: Reet Kurg, PhD

TARTU 2021

INFOLEHT

Metüültransferaaside ko-faktori TRMT112 mutatsioonanalüüs

Metülatsioon on biokeemiline protsess, mis omab mitmeid olulisi rolle geenide ekspressioonis ja kasvaja tekkes. Reguleerimata metülatsioon on tihedalt seotud paljude terviseprobleemidega. Metülatsiooni viivad läbi metüültransferaasid, mis transpordivad metüülrühma sihtmärgile. Metüültransferaasid vajavad oma metaboolse stabiilsuse ja ensümaatilise aktiivsuse jaoks ko-faktorit TRMT112. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutavad TRMT112 mutatsioonid valgu stabiilsust ja ekspressiooni ning seondumist metüültransferaasidega.

Märksõnad: TRMT112, metülatsioon, metüültransferaasid, N6AMT1, WBSCR22, METTL5

CERCS kood: T490 Biotehnoloogia

Methyltransferase co-factor TRMT112 mutation analysis

Methylation is a biochemical process that plays several important roles in gene expression and tumorigenesis. Unregulated methylation is closely linked to many health problems. Methylation is performed by methyltransferases that transport the methyl group to the target. Methyltransferases require co-factor, TRMT112, for their metabolic stability and enzymatic activity. The aim of this bachelor's thesis was to investigate how TRMT112 mutations affect protein stability, expression and interaction with methyltransferases.

Key words: TRMT112, methylation, methyltransferases, N6AMT1, WBSCR22, METTL5

CERCS code: T490 Biotechnology

SISUKORD

SISUKORD	3
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Metülatsioon ja selle roll	8
1.1.2 DNA metülatsioon ja DNA metüültransferaasid	10
1.1.3 RNA metülatsioon ja RNA metüültransferaasid	11
1.1.4 Valgu metülatsioon ja valgu metüültransferaasid	11
1.2 TRMT112 ja tema interaktsiooni partnerid	12
1.2.1 N6AMT1	13
1.2.2 WBSR22.....	14
1.3.3 METTL5.....	15
1.3 Kristallstruktuur	15
2. EKSPERIMENTAALOSA	18
2.1 Töö eesmärgid	18
2.2 Materjal ja metoodika	19
2.2.1 PCR mutagenees	19
2.2.2 Transformatsioon	20
2.2.3 Kontrollrestriktsioon	20
2.2.4 Kasutatud rakukultuurid.....	20
2.2.5 Elektroporatsioon	21
2.2.6 Rakkude kogumine Western blot analüüsiks	22
2.2.7 Immunopretsipitatsioon.....	22
2.2.8 Western blot	23
2.3 Tulemused	25
2.3.1 Preamerite disain.....	25
2.3.2 TRMT112 plasmidi mutagenees	25
2.3.3 Mutatsioonid TRMT112 valgus mõjutavad ekspressiooni taset ja/või stabiilsust...	26
2.3.4 Interaktsioon metüültransferaasidega mõjutab TRMT112 mutantide ekspressiooni/stabiilsust	28
2.4 Arutelu	31
KOKKUVÕTE	34
SUMMARY	35
KIRJANDUSE LOETELU	36
Lisad	42
Lisa 1.	42

LIHTLITSENTS.....43

KASUTATUD LÜHENDID

MTase – metüültransferaas (ingl *methyltransferase*)

SAM – S-adenosüülmetsioniin (ingl *S-adenosyl methionine*)

SAH – S-adenosüülhomotsüsteiin (ingl *S-adenosyl homocysteine*)

HCY – homotsüsteiin (ingl *homocysteine*)

5mC – 5-metüülsütosiin (ingl *5-methylcytosine*)

CGI – CpG saar (ingl *CpG island*)

DNMT1 – DNA metüültransferaas-1 (ingl *DNA Methyltransferase 1*)

DNMT3A – DNA metüültransferaas-3 alfa (ingl *DNA Methyltransferase 3 Alpha*)

DNMT3B – DNA metüültransferaas-3 beeta (ingl *DNA Methyltransferase 3 Beta*)

4mC – N⁴-metüülsütosiin (ingl *N⁴-methylcytosine*)

6mA/m⁶A – N⁶-metüüladeniin (ingl *N⁶-methyladenine*)

METTL3 – metüültransferaasilaadne valk 3 (ingl *Methyltransferase Like 3*)

METTL14 – metüültransferaasilaadne valk 14 (ingl *Methyltransferase Like 14*)

WTAP – Wilmsi kasvaja supressorgeen (ingl *Wilms Tumor 1-Associating Protein*)

m¹A – N¹-metüüladenosiin (ingl *1-Methyladenosine*)

m⁷G – N⁷-metüülguanosiin (ingl *7-Methylguanosine*)

m³U – N³-metüüluridiin (ingl *3-Methyluridine*)

2'-O-Me – 2'-O-metülastioon (ingl *2'-O-methylation*)

KMT – Lüsiini metüültransferaas (ingl *lysine methyltransferase*)

PRMT – Arginiini metüültransferaas (ingl *protein arginine methyltransferases*)

NTMT – N-terminaalne metüültransferaas (ingl *N-terminal methyltransferases*)

TRMT112 – Trm112 sarnane valk (ingl *Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein*)

Trm112 – tRNA metüültransferaas 11-2 (ingl *tRNA methyltransferase 11-2*)

Mtq2 – eRF1 metüültransferaasi katalüütiline alaühik MTQ2 (ingl *eRF1 methyltransferase catalytic subunit MTQ2*)

SMO2 – väikse organi geen 2 (ingl *SMALL ORGAN 2*)

N6AMT1 – N-6 adeniinispetsiifiline DNA metüültransferaas 1 (ingl *N-6 Adenine-Specific DNA Methyltransferase 1*)

eRF1 – eukarüootne vabastusfaktor (ingl *eukaryotic release factor 1*)

KMT9 – lüsiinmetüültransferaas 9 (ingl *lysine methyltransferase 9*)

WBSCR22 – Williamsi-Beureni sündroomi kromosoomipiirkonna 22 valk (ingl *Williams-Beuren Syndrome Chromosomal Region 22 Protein*)

WBSCR – Williams-Beureni sündroomi kriitiline piirkond (ingl *Williams-Beuren syndrome critical region*)

WBS – Williams-Beureni sündroom (ingl *Williams-Beuren syndrome*)

METTL5 – metüültransferaasilaadne valk 5 (ingl. *Methyltransferase-like 5*)

ID – intellektipuue (ingl. *intellectual disability*)

ZBD – tsinki siduv domeen (ingl *zinc-binding domain*)

SISSEJUHATUS

Metülatsioon on biokeemiline protsess, mida katalüüsivad metüültransferaasid. Metülatsiooni käigus lisatakse metüülrühm erinevatele molekulaarsetele substraatidele. Metülatsioon võib toimuda valkudel, DNA- ja RNA-l. Metülatsioonil on mitmeid olulisi rolle organismis ning nii hüpometülatsioon kui ka hüpermetülatsioon omavad rolli geenide ekspressioonis ja kasvajate tekkes. Metüültransferaasid on sihtmärkspetsiifilised ensüümid mis transpordivad metüülrühma sihtmärgile. Mitmed uuringud on seostanud metüültransferaase erinevate haigustega, sealhulgas pahaloomuliste kasvajate tekkimisega ja mitmete vaimsete häiretega. Metüültransferaasid vajavad väga tihti oma ensümaatiliseks aktiivsuseks ja stabiilsuseks ko-faktoreid. Mitmete metüültransferaaside ko-aktivaator TRMT112 on väike, evolutsiooniliselt konserveerunud valk, mis on vajalik metüültransferaaside stabiilsuseks ja/või aktiivsuseks. TRMT112 ja tema metüültransferaaside interaktsioone ei ole palju uuritud, mistõttu ei tunta neid mehhanisme veel täielikult.

Käesoleva töö eesmärgiks oli kloneerida ekspressioonikonstruktid, mis ekspresseeriks TRMT112 valgu mutante, seejärel analüüsida antud mutatsioonide mõju TRMT112 valgu stabiilsusele ja ekspressioonile. Lisaks analüüsiti TRMT112 valgu interaktsioone metüültransferaasidega.

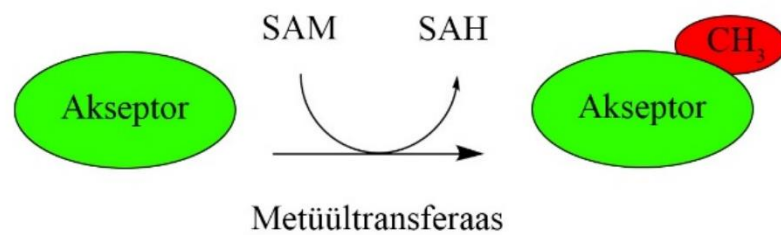
Töö teostati Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

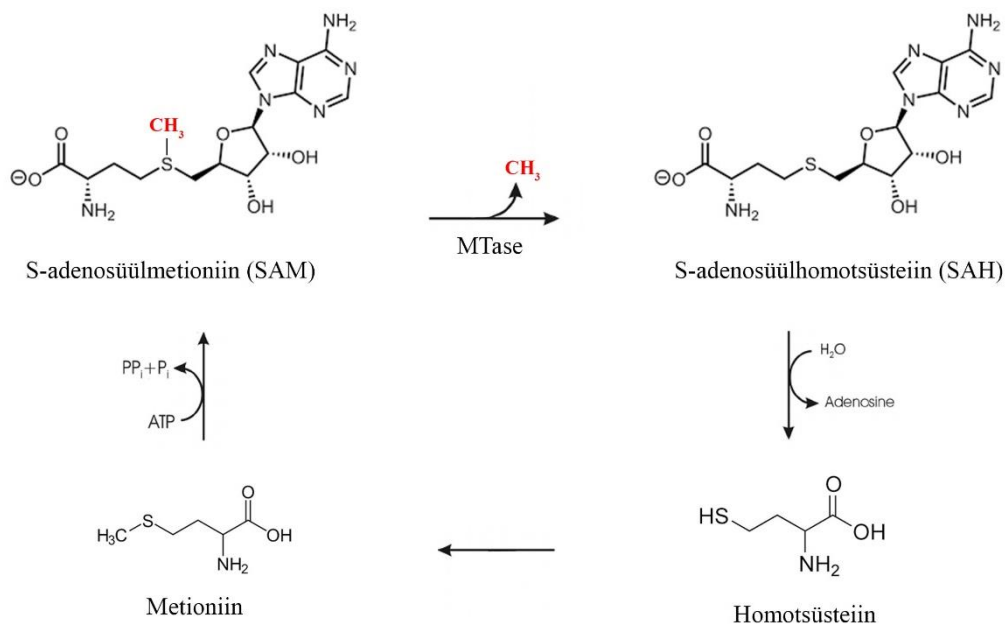
1.1 Metülatsioon ja selle roll

Metülatsioon on biokeemiline protsess mille käigus lisatakse metüülrühm erinevatele molekulaarsetele sihtmärkidele. Kirjeldatud on lipiidide, valkude (näiteks hormoonide, neurotransmitterite), RNA ja DNA-metüleerimist. Metülatsioonil on oluline roll reguleerimises mehhanismides nagu epigenees ja imprinting (Menezo *et al.*, 2020). Lisaks on tal roll raku biosünteesi-, metabolismi- ja signaali ülekande radades (Martin, 2002).

Reguleerimata metülatsioon on tihedalt seotud paljude terviseprobleemidega. Nii hüpometülatsioon kui ka hüpermetülatsioon võib põhjustada kasvaja arengut (Menezo *et al.*, 2020; T. Sun *et al.*, 2019). Lisaks on ebaregulaarne metülatsioon seotud veel mitmesuguste haigustega, näiteks Alzheimeri tõve ja talasseemiaga (Sornjai *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2020). Metülatsiooni protsessi viivad läbi metüültransferaasid, ligi 30% metüültransferaasidest on seotud erinevate haigustega, enamasti vähi ja psüühikahäiretega (Petrosian & Clarke, 2011). Metüültransferaasid (ingl *methyltransferase*, MTase) on sihtmärkspetsiifilised ensüümid ning nad kuuluvad S-adenosüülmetioniin (ingl *S-adenosyl methionine*, SAM) sõltuvate ensüümide super-perekonda (Q. Sun *et al.*, 2021). S-adenosüülmetioniinist sõltuvad metüültransferaasid jagunevad oma struktuuri voltumise põhjal viide erinevasse klassi (I–V), enamik metüültransferaase kuulub klassi I (Schubert *et al.*, 2003). Nad transpordivad metüülrühma SAMilt sihtmärgile, SAM on peamine metüülrühma doonor (Joonis 1). SAM moodustumist katalüüsib metioniin adenosüültransferaas (ingl *Methionine adenosyltransferase*, MAT), sidudes metioniini ja ATP (Joonis 2) (Menezo *et al.*, 2020). Metülatsiooni üks universaalsemaid mehhanisme on S_N2 nukleofiilne asendus. Metüültransferaas peab tagama metüülrühma akseptori ja SAMi doonormetüülrühma läheduse (3 Å – 4 Å). Lisaks peab akseptor olema kõige lähem ja reaktiivsem nukleofiil doonormetüülrühmale (Liscombe *et al.*, 2012; Q. Sun *et al.*, 2021). Akseptori metülatsiooni järgselt moodustub SAMist S-adenosüülhomotsüsteiin (ingl *S-adenosyl homocysteine*, SAH), seejärel vabaneb homotsüsteiin (ingl *homocysteine*, HCY). HCY taastatakse metioniiniks (Menezo *et al.*, 2020).



Joonis 1. **Metüülatsooni protsess.** Metüültransferaas transpordib metüülrühma SAMilt (S-adenosüülmationiin) akseptorile. SAMist moodustub SAH (S-adenosüülhomotsüsteiin).



Joonis 2. **S-adenosüülmationiini ringlus.** S-adenosüülmationiin (SAM) loovutab oma metüülrühma akseptorile. Seda protsessi viib läbi metüültransferaas (MTase). Akseptori metüülatsooni järgselt moodustub SAMist S-adenosüülhomotsüsteiin (SAH). SAHist eraldub homotsüsteiin millest moodustatakse metioniin. Metioniin adenosüültransferaas seob metioniini ja ATP, tekib SAM.

1.1.2 DNA metülatsioon ja DNA metüültransferaasid

DNA metülatsioon on vajalik retroviirse elementide vaigistamiseks, koespetsiifilise geeniekspressiooni reguleerimiseks, imprintimiseks ja X-kromosoomide inaktiveerimiseks (Moore *et al.*, 2013).

Klassikalisel DNA metülatsioonil lisatakse metüülrühm tsütosiini viiendas positsioonis olevale süsiniku aatomile, moodustades 5-metüültsütosiini (ingl *5-methylcytosine*, 5mC). Metülatsioon toimub tsütosiini nukleotiidil, millele eelneb guaniini nukleotiid, CpG dinukleotiid. DNA metüültransferaasid kannavad metüülrühma SAMilt sihtmärk DNA-le (Luo *et al.*, 2018). Inimgenoomile on karakteristik CpG dinukleotiide vähesus, suurema kontsentratsiooniga asuvad nad genoomi piirkondades, mida nimetatakse CpG saarteks (ingl *CpG islands*, CGI). CGI-des asub umbes 70% geenipromootoreid (Saxonov *et al.*, 2006). Väljaspool CpG saari on CpG dinukleotiidid tugevalt metüleeritud (Moore *et al.*, 2013). CGI-de metülatsioonil toimub geeniekspressiooni vaigistamine (Goll & Bestor, 2005). CGI hüpermetülatsiooni tähendatakse tavaliselt vähi olemasolul (Luo *et al.*, 2018).

Siiani on 5-metüültsütosiini peetud ainukeseks DNA metülatsiooniks imetajate genoomides (T. P. Wu *et al.*, 2016). Prokarüootides on kirjeldatud lisaks veel ka N⁴-metüültsütosiini (ingl *N⁴-methylcytosine*, 4mC) ja N⁶-metüüladeniini (ingl *N⁶-methyladenine*, 6mA) olemasolu (Ehrlich *et al.*, 1987). Kuigi 5mC ja 6mA on avatud eukarüootides samal ajal, on tähelepanu 6mA-le eukarüootides olnud piiratud, peamiselt tema vähesuse koguse ja tehnoloogiliste piirangute tõttu (J. Liu *et al.*, 2016). Hiljuti kirjeldati 6mA olemasolu eukarüootides kvantifitseeritaval tasemel (Alderman & Xiao, 2019; T. P. Wu *et al.*, 2016). See-eest pole 4mC olemasolu veel kinnitust leidnud (O’Brown *et al.*, 2019).

Klassikaliseks DNA metüültransferaasi näiteks võib tuua imetajate DNA metüültransferaas-1 (DNMT1). DNMT1 töötab DNA replikatsiooni ajal, et kopeerida DNA metüüleerimismuster orginaal DNA ahelalt äsja sünteesitud ahelale. *De novo* metülatsioon toimub tänu DNA metüültransferaas-3 alfa (ingl *DNA Methyltransferase 3 Alpha*, DNMT3A) ja DNA metüültransferaas-3 beeta (ingl *DNA Methyltransferase 3 Beta*, DNMT3B) (Menezo *et al.*, 2020).

1.1.3 RNA metülatsioon ja RNA metüültransferaasid

RNA metülatsioon on posttranskriptsiooniline regulatsiooni meetod. Nendest enamus toimuvad mRNA-s, rRNA-s, tRNA-s, sncRNA-s ja lncRNA-s (Zhou *et al.*, 2020).

RNA modifikatsioonidest eukarüootides on kõige levinuim adeniini metüleerimine N⁶-metüüladeniiniks (ingl *N⁶-methyladenine*, m6A). m6A modifikatsioon mõjutab paljusid aspekte RNA metabolismis, alates RNA ekspressioonist, tuuma ekspordist, pre-mRNA splaissimisest, RNA translatsiooni reguleerimisest, lagunemisest kuni RNA-valgu interaktsioonideni. m6A metülatsioonil tekkivaid vigasid peetakse oluliseks vähi tekkimisel ja kasvajate arengus (T. Sun *et al.*, 2019). RNA metülatsioon toimub, sarnaselt DNA metülatsioonile, kasutades SAMi metüülrühma doonorina (T. Sun *et al.*, 2019).

m6A metülatsiooni viib läbi mitmest valgust koosnev kompleks. On teada, et selle kompleksi komponentide hulka kuuluvad METTL3 (ingl *Methyltransferase Like 3*), METTL14 (ingl *Methyltransferase Like 14*) ja WTAP (ingl *Wilms Tumor 1-Associating Protein*) (Zhou *et al.*, 2020). METTL3 ja METTL14 on metüültransferaasid mis moodustavad omavahel heterodimeeri, WTAP on seotud RNA splaissimisega ja METTL3 – METTL14 heterodimeeriga interakteerudes mõjutab metülatsiooni (J. Liu *et al.*, 2014).

Lisaks m6A modifikatsioonile on RNA-s avastatud veel N1-metüüladenosiini (m1A), 5-metüültsütosiin (5mC), N7-metüülguanosiini (m7G), N3-metüüluridiini (m3U) ja 2'-O-metülatsioon (2'-O-Me) (Sloan *et al.*, 2017; Wiener & Schwartz, 2021).

1.1.4 Valgu metülatsioon ja valgu metüültransferaasid

Valkude metülatsioon on sarnaselt RNA metülatsioonile posttranskriptsiooniline regulatsiooni meetod. Valkude metülatsiooni võib toimuda lüsiini, arginiini või histidiini nukleofiilsetel kõrvalahelatel, N-terminaalses või C-terminaalses valgu osas. Olemas on mono-, di- ja trimetüleeritud külghelad (Walker & Rapley, 2008).

Lüsiini metülatsioon reguleerib valgu stabiilsust ja funktsioneerimist. Lüsiini metüültransferaas (ingl *lysine methyltransferase*, KMT) lisab metüülrühma lüsiini kõrvalahela aminorühmale, mis on võimeline aktsepteerima kuni kolm metüülrühma mille tulemuseks on kas mono-, di- või trimetüüllüsiin (Han *et al.*, 2019). Inimestel asuvad lüsiini metülatsiooni

saidid histoonil H3 ning H4 (Husmann & Gozani, 2019). Histooni H3 metülatsiooni deregulatsiooni põhjustab arenguhäireid ja vähki (J. Li *et al.*, 2019).

Arginiini metülatsioon reguleerib arvukalt rakuprotsesse, sealhulgas geeni transkriptsiooni, mRNA splaissimist, DNA parandamist ja valkude rakulist lokaliseerimist. Arginiini metüültransferaas (ingl *protein arginine methyltransferases*, PRMT) lisab metüülrühma guanidiin lämmastiku aatomitele arginiini kõrvalahelas (Bedford & Clarke, 2009). Inimgenoomis teatakse üheksat PRMT-d mis mono- või dimetüleerivad arginiini. PRMT-d jagatakse kolme gruppi nende metülatsiooni mustri järgi (Q. Wu *et al.*, 2021). Arginiini metülatsiooni regulatsiooni puudumine põhjustab vähki (Blanc & Richard, 2017; Tewary *et al.*, 2019)

N-terminaalse metülatsiooni modifikatsioonil on roll valk-kromatiini interaktsioonis, DNA vigastuste parandamisel ja kromosoomipaaride lahknemisel meioosis. N-terminaalne metüültransferaas (ingl *N-terminal methyltransferases*, NTMT) lisab metüülrühma akseptorvalgu avatud N-terminaalsele α -amino rühmale. NTMT-l on roll vähi tekkes ja vananemisel (Huang, 2019; Varland *et al.*, 2015).

1.2 TRMT112 ja tema interaktsiooni partnerid

TRMT112 (ingl *Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein*) on väike evolutsiooniliselt konserveerunud metüültransferaasidega interakteeruv valk. TRMT112 ja tema homolooge on identifitseeritud imetajates, pärmides, taimedes, ja arhedes (Bourgeois *et al.*, 2017, lk 112; Gu *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2010; van Tran *et al.*, 2018).

TRMT112 valgu homoloog pärmis on Trm112 (ingl *tRNA methyltransferase 11-2*) (Gu *et al.*, 2012). Trm112 on peamiselt uuritud pärmis *Saccharomyces cerevisiae*. Trm112 geeni kustutamine *S. cerevisiae*'st põhjustab kasvu defekte (Bourgeois *et al.*, 2017). *Saccharomyces cerevisiae* struktuuriuuringud on näidanud, et pärmis Mtq2 – Trm112 interaktsioon põhjustab Mtq2 (ingl *eRF1 methyltransferase catalytic subunit MTQ2*) valgu konformatsioonilist muutust, mis suurendab tugevalt SAM valgu seondumist ning on oluline tema ensümaatiliseks aktiivsuseks (Liger *et al.*, 2011). Erinevalt pärmis Trm112 valgust, pole inimese TRMT112 valgu puhul neli tsüsteiini konserveerunud ja seetõttu ei saa ta tsinki siduda (van Tran *et al.*, 2019). TRMT112 valgu homoloog SMO2 (ingl *SMALL ORGAN 2*), mis asub *Arabidopsis thaliana*'s, funktsioneerib rakkude jagunemise regulatsioonis. SMO2 on seotud G2-M faasi progresseerumisega rakutsükli (Hu *et al.*, 2010). TRMT112 homoloogi hiires, Trmt112,

ekspresseeritakse embrüonaalse arengu ajal, seetõttu arvatakse tal olevat roll aju ja närvisüsteemi arengus ning erinevate kudede morfogeneesis (Gu *et al.*, 2012). TRMT112 valgu homoloogi *Drosophila melanogaster*'is, Trmt112, ekspresseeritakse sarnaselt hiire Trmt112-le embrüonaalse arengu ajal. Järgnevates arenguetappides ekspresseerub Trmt112 peamiselt täiskasvanud kärbsse munasarjades (Leismann *et al.*, 2020).

Varasemate uurimuste põhjal on kindlaks tehtud, et inimese TRMT112 valk interakteerub rakkudes WBSCR22-, N6AMT1-, METTL5-, ALKBH8-valkudega (Fu *et al.*, 2010; Leetsi *et al.*, 2019; van Tran *et al.*, 2019; Öunap *et al.*, 2015).

1.2.1 N6AMT1

N6AMT1 (ingl *N-6 Adenine-Specific DNA Methyltransferase 1*) on inimese rakkudes leiduv metüültransferaas, mis vajab oma ensümaatiliseks aktiivsuseks interaktsioonipartnerit TRMT112. N6AMT1 – TRMT112 heterodimeeri nimetatakse lüsiinmetüültransferaas 9-ks (ingl *lysine methyltransferase 9*, KMT9). N6AMT1-l DNA N6-metüüladeniini metüültransferaalne aktiivsus ning metüülatsiooni abil kontrollib N6AMT1 rakutsüklis osalevate valkude geenide ekspressiooni (Leetsi *et al.*, 2019; Metzger *et al.*, 2019).

Inimese genoom kodeerib kaht erinevat isovormi N6AMT1-st, peamine isovorm (Isovorm 1) ja alternatiivselt lõigatud isovorm (Isovorm 2), kus substraadi sidumise motiiv on puudu. TRMT112 reguleerib N6AMT1 isovormide taset rakkudes. Mõlemad isovormid on mRNA tasemel võrdselt ekspresseeritud aga ainult isovorm 1 on detekteeritav valgu tasemel. Alternatiivselt splaissitud isovorm ei ole võimeline seonduma TRMT112 valguga. N6AMT1 interaktsioonipinna lähedal olevad punktmutatsioonid häirivad interaktsiooni TRMT112 valguga, mis viitab sellele, et TRMT112 – N6AMT1 heterodimeeri moodustamiseks on vaja alternatiivselt splaissitud isovormis puuduvaid aminohappeid. TRMT112 interakteerumisel suureneb N6AMT1 ensümaatiline ja SAM sidumise aktiivsus (Leetsi *et al.*, 2019). Kõrge pH ei ole N6AMT1 – TRMT112 kompleksi stabiilsuse jaoks optimaalne (Woodcock *et al.*, 2019).

N6AMT1 – TRMT112 heterodimeer metüleerib eukarüootses vabastusfaktoris (ingl *eukaryotic release factor 1*, eRF1) glutamiini, efektiivseks metüülatsiooniks on vajalik märklaudglutamiini ees glütsiini ja nelja aminohappe pärast arginiini (GXXXXRQ) konsensus järjestust (Woodcock *et al.*, 2019).

N6AMT1 – TRMT112 heterodimeer metüleerib histooni H4 12. lüsiini (H4K12) ning seetõttu nimetatakse seda heterodimeeri ka lüsiinmetüültransferaas 9-ks (ingl *lysine methyltransferase* 9, KMT9). KMT9 asumine geeni promootoritel viitab tema osalemisele rakutsükli mõjutavate molekulide transkriptsiooni regulatsioonis, samuti mängib ta rolli eesnäärme vähis (Metzger *et al.*, 2019).

N6AMT1 osalemine inimese DNA N6-adeniini metülatsioonis on vastuoluline. Xiao *et al.*, uurimisrühm näitas, et DNA 6mA modifikatsiooni viis läbi N6AMT1. Nad leidsid, et N6AMT1 vaigistamine väheneb raku genoomse DNA 6mA taset, mis omakorda soodustas vähirakkude teket (Xiao *et al.*, 2018). Samas on näidatud, et N6AMT1 osalemine inimese DNA N6-adeniini metülatsioonis ei ole võimalik (P. Liu *et al.*, 2010; Metzger *et al.*, 2019). Ensüüme, mis on võimelised toimima nii oligonukleotiididele kui ka valkudele ei ole palju (Woodcock *et al.*, 2019).

1.2.2 WBSCR22

Inimeses omab WBSCR22-valk metüültransferaalset funktsiooni, metüleerides guaniini 18S rRNA-s positsioonis 1639 moodustades N7-metüülguanosiini (m7G). Sarnaselt teistele metüültransferaasidele, omab WBSCR22 valk S-adenosüülmationiini (SAM) seondumise motiivi (Õunap *et al.*, 2013). Lisaks on WBSCR22 seotud nii pre-RNA protsessimise kui ka ribosoomi 40S subühiku biogeneesiga, osaledes ribosoomi biogeneesi kvaliteedi kontrollmehhanismis. WBSCR22 mõjutab 18S rRNA protsessimise lõppfaasi, WBSCR22 koguse vähenemise korral rakus kuhjub 18S-E pre-rRNA vaheühend (Õunap *et al.*, 2015). 18S pre-rRNA töötlemiseks ei ole vajalik WBSCR22 katalüütiline aktiivsus, mis viitab sellele, et WBSCR22 roll 40S subühiku biogeneesis ei sõltu tema funktsioonist RNA metüültransferaasina (Haag *et al.*, 2015). WBSCR22 moodustab heterodimeeri TRMT112-ga, kompleksi on vaja WBSCR22 metaboolse stabiilsuse tagamiseks (Zorbas *et al.*, 2015). TRMT112 ekspressiooni vähendamisel väheneb ka WBSCR22 tase. WBSCR22 – TRMT112 heterodimeer asub raku tuumas, kompleksi asukoha määrab WBSCR22 valk (Õunap *et al.*, 2015).

WBSCR22 geen asub inimese Williams-Beureni sündroomi kriitilises piirkonnas (ingl *Williams-Beuren syndrome critical region*, WBSCR), kromosoomil 7q11.23. Williams-Beureni sündroom avaldub kui hemisügootselt kustutatakse vastav regioon. Williams-Beureni sündroom (WBS) on seotud neuroloogiliste arengu häiretega (Doll & Grzeschik, 2001).

WBSCR22 on seotud lisaks Williams-Beureni sündroomile ka vähi progresseerumise ja põletikuliste reaktsioonidega (Haag *et al.*, 2015).

1.3.3 METTL5

METTL5 on üks paljudest metüültransferaasilaadse valguperekonna (ingl. *Methyltransferase-like*, METTL) liigetest. METTL5 moodustab TRMT112-ga, tema interaktsioonipartneriga, heterodimeeri et saavutada metaboolne stabiilsus. Teiste perekonnaliikmete homoloogia alusel oletatakse, et METTL5 omab SAM sidumise domeeni ja vajab TRMT112-te valgu sidumiseks (Richard *et al.*, 2019). METTL5 – TRMT112 heterodimeer leidub peamiselt rakkude tuumas, kus ta seondub spetsiifiliselt RNA mitte DNA-ga. METTL5 on ensüüm, mis modifitseerib adensiini 18S rRNA-s positsioonil 1832 moodustades N6-metüüladensiini. Metülatsiooni sait on mõne nukleotiidi kaugusel ribosoomi dekodeerimiskeskusest (ingl. *decoding center*). m6A modifikatsioon pole oluline raku kasvuks ega küpse rRNA moodustamise jaoks (Leismann *et al.*, 2020; Liberman *et al.*, 2020; van Tran *et al.*, 2019). Inimeses ekspresseerub METTL5 arenevas ja vananevas ajus, kuhjub närvirakkudes ja neuronite sünapssides. Bialleelsed variandid METTL5-s põhjustavad intellektipuuuet (ingl. *intellectual disability*, ID) ja mikrotsefaaliat (Richard *et al.*, 2019).

METTL5 lähedane homoloog METL5, mis leidub varbussis (*Caenorhabditis elegans*), metüleerib adensiini 18S rRNA-s positsioonil 1717 ning vastutab stressi vastuse reguleerimise eest. METL5 metüleeritud adensiin vastab inimese 18S rRNA 1832 adensiinile. Selline konserveerunud piirkond rRNA-s viitab võimalusele, et see võiks reguleerida ka teiste liikide, sealhulgas imetajate, stressivastust (Liberman *et al.*, 2020).

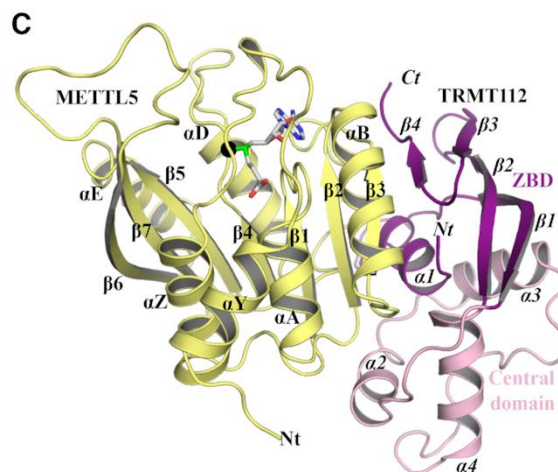
1.3 Kristallstruktuur

TRMT112 kristallstruktuuri on analüüsitud vaid kompleksis metüültransferaasidega. Inimese TRMT112 kristallstruktuuri on kirjeldatud kompleksis METTL5- ja N6AMT1-ga.

Inimese METTL5 – TRMT112 m6A rRNA metüültransferaasi kompleksis on näha, et TRMT112 sisaldab kahte domeeni: tsinki siduvat domeeni (ingl. *zinc-binding domain*, ZBD) ja tsentraalset domeeni (Joonis 3). ZBD moodustub valgu N- ja C-terminaalsete jäsede

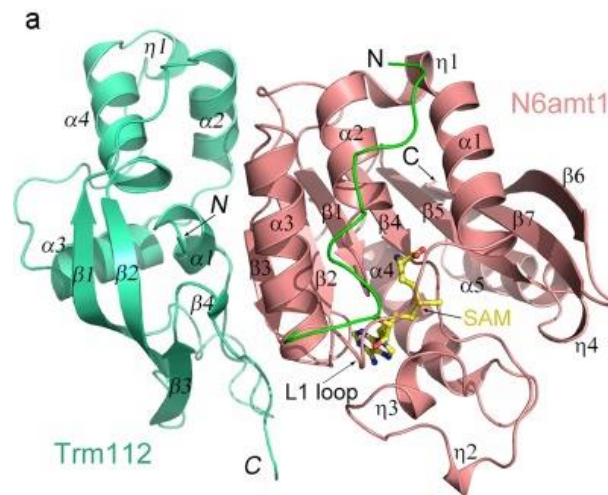
jääkidest ning see koosneb α -heeliksist, mis on pakitud nelja-ahelalise anti-paralleelse β -lehe vastu. Tsentraalne domeen koosneb kolmest α -heeliksist.

Inimese METTL5 ja TRMT112 valgud interakteeruvad üksteisega alal mille moodustavad 29 METTL5 ja 28 TRMT112 jääki. Interaktsiooni iseloomustab suur tsentraalne hüdrofoobne südamik. Hüdrofoobset ala ümbritsevad polaarsed jäägid, mis on seotud kaheksa vesiniksideme ja kahe soolasilla moodustumisega. Kahe vesiniksideme moodustumise tulemusena tekib nende vahele paralleelne β -lukk (ingl *β -zipper*), mis kokku moodustab üksteist-ahelalise β -lehe. Inimese METTL5 – TRMT112 interaktsiooni mehhanism sarnaneb pärmi TRM112 valgu interaktsioonile metüültransferaasidega. METTL5 valgu hüdrofoobne ala, mis on ebasoodne hüdrofiilses rakukeskkonnas, katetakse TRMT112 valguga kompleksi moodustumisel (van Tran *et al.*, 2019).



Joonis 3. Joonis võetud „The human 18S rRNA m6A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112“. METTL5 – TRMT112 kompleksi aatomresolutsiooniline struktuur. TRMT112 tsinki siduv domeen (ZBD) ja selle spiraalne keskdomeen on värvitud vastavalt lillaks ja roosaks, METTL5 on värvitud kollaseks (van Tran *et al.*, 2019).

N6AMT1 – TRMT112 kompleks moodustub sarnaselt METTL5 – TRMT112 kompleksiga. N6AMT1 β ahelast ja TRMT112 β ahelast tekib paralleelne β -lukk, moodustades üksteist-ahelalise β -lehe. Interaktsioonipinda iseloomustab suur tsentraalne hüdrofoobne südamik, mis on ümbritsetud mitmete hüdrofiilsete interaktsioonidega. TRMT112-ga kompleksi moodustamine kaitseb N6AMT1 hüdrofoobset piirkonda (W. Li *et al.*, 2019).



Joonis 4. Joonis võetud „Structural insight into human N6amt1-Trm112 complex functioning as a protein methyltransferase“. N6AMT1 – TRMT112 kompleksi aatomresolutsiooniline struktuur. TRMT112 ja N6AMT1 on värvitud vastavalt rohekaks ja roosakaks (W. Li *et al.*, 2019).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Metüültransferaasid ning nende funktsiooni defektid on seotud paljude erinevate haigustega. Mitmed uuringud on seostanud metüültransferaase pahaloomuliste kasvajate tekkimisega ning mitmete vaimsete ja arenguliste häiretega. TRMT112 on mitmete metüültransferaaside (METTL5, WBSCR22, N6AMT1) ko-aktivaator ning on vajalik nende stabiilsuseks ja/või aktiivsuseks. Käesolevas bakalaureusetöös uuriti, kuidas mõjutavad TRMT112 mutatsioonid valgu stabiilsust ja ekspressiooni ning seondumist metüültransferaasidega.

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli:

- Kloneerida ekspressioonikonstruktid, mis ekspresseerivad vastavalt TRMT112 valgu mutante TRMT112-S10A, TRMT112-S10N ja TRMT11-F41R.
- Analüüsida antud mutatsioonide mõju valgu ekspressioonile ja stabiilsusele.
- Analüüsida mutatsioonide mõju TRMT112 interaktsioonile METTL5, WBSCR22 ja N6AMT1 valkudega.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 PCR mutagenees

TRMT112 mutagenees viidi läbi kasutades PIPE-PCR (*Polymerase Incomplete Primer Extension*) meetodit (Klock & Lesley, 2009).

Reaktsioonisegu [1X Phusion HF puhver (Thermo Fisher Scientific); 200 µM dNTP; 0,5 µM vastava mutatsiooni *reverse* ja *forward* praimer (Tabel 1); Template DNA; 0,2 U/µL Phusion DNA polümeraas (Thermo Fisher Scientific); dH₂O] segati kokku ja asetati *Biometra TProfessional Thermocycler* masinasse. Kasutati programmi: 98 °C 10 min, (98 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 2,5 min)X4, (98 °C 15 s, 70 °C 15 s, 72 °C 2,5 min)X30, 72 °C 10 min, 4 °C. PCRi produkte kontrolliti 0,8% agaros geelelektroforeesil. Esialgse plasmiid eemaldamiseks tehti PCRi reaktsioonisegule DpnI töötlus. Reaktsioonisegu kokkusegamisel kasutati 2 µl 10X FastDigest puhvrit (Thermo Fisher Scientific), 10 µl PCR produkti, 1 µl FastDigest DpnI ensüümi (Thermo Fisher Scientific) ja destilleeritud H₂O-d mahuni 20 µl. Reaktsioonisegu segati kokku, tsentrifuugiti põhja (Sigma 1-14, Sigma) ja inkubeeriti 37 °C juures 5–10 min. Saadud produkti kontrolliti, 0,8% agaros geelelektroforeesil.

Tabel 1. Uurimuses kasutatud praimerid.

Praimerid (F- <i>forward</i> /R- <i>reverse</i>)	Järjestus
Ser10Asn_F	5'-CTGAACTCGCATGTGCGGGGGGTGGGG-3'
Ser10Asn_R	5'-CGAGTTCAGCAGATTGTGGGTAAGCAG-3'
Ser10Ala_F	5'-CTGGCCTCGCATGTGCGGGGGGTGGGG-3'
Ser10Ala_R	5'-CGAGGCCAGCAGATTGTGGGTAAGCAG-3'
Ser10Phe_F	5'-CTGTTCTCGCATGTGCGGGGGGTGGGG-3'
Ser10Phe_R	5'-CGAGAACAGCAGATTGTGGGTAAGCAG-3'
Phe41Arg_F	5'-AACAGGGTGGCGCGTATGATACCTAAAG-3'
Phe41Arg_R	5'-CACCTGTTGGGGTTGAATTCCACAGG-3'

2.2.2 Transformatsioon

PCRi reaktsioonisegu kasutati otse bakteriraku transformatsioonil Transformatsioon viidi läbi Kuumašoki meetodil *E. Coli* XL-10 kompetentsete rakkudega. Esmalt pandi 100 µl sügavkülmutatud rakukultuuri jääle sulama. Sulanud kompetentsetele rakkudele lisati 3 µl PCRi segu. Segu inkubeeriti 30 min jääl misjärel 2 min 42 °C juures ning uuesti 2 min jääl. Lisati 800 µl LB (*Lysogeny broth*) vedelsöödet ja inkubeeriti 37 °C juures 1–1,5 h. Pärast inkubeerimist plaaditi rakukultuur LB-Amp tardsöötmele. Plaate inkubeeriti 16 h 37 °C juures. Järgneval päeval valiti igalt inkubeeritud plaadilt 6 üksikut kolooniat. Kolooniad külvati LB-Amp tardsöötmele ja suspendeeriti 2 ml-s LB-Amp vedelsöötmes mis inkubeeriti loksutil 16 h 37 °C juures. Plasmiidide eraldamiseks kasutati FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit'i (Favorgen) vastavalt protokollile. Eraldatud plasmiidide kontsentratsiooni määrati NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific) spektrofotomeetriga, misjärel viidi läbi kontrollrestriktsioon.

2.2.3 Kontrollrestriktsioon

Reaktsioonisegu kokkusegamisel kasutati, 2 µl 10X FastDigest puhvrit (Thermo Fisher Scientific), 0,3 µl FastDigest EcoRI ensüümi (Thermo Fisher Scientific), 0,3 µl FastDigest ScaI ensüümi (Thermo Fisher Scientific), 10 µl plasmiidset DNA-d ja destilleeritud H₂O-d mahuni 20 µl. Reaktsioonisegu segati kokku, tsentrifuugiti põhja (Sigma 1-14, Sigma) ja inkubeeriti 37 °C juures (Heraeus function line B6 incubator, Kendro) 5-10 min. Saadud produkti kontrolliti 0,8% agaros geelelektroforeesil ning Sangeri sekveneerimisega.

2.2.4 Kasutatud rakukultuurid

Inimese osteosarkoomi rakke (U2OS) kasvatati IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) söötmes, mis sisaldas 10% vasika loote seerumi (FCS) ja 100 U/ml penitsilliini ning 100 µg/ml streptomütsiini. Rakke inkubeeriti 37 °C 5% CO₂ juures (Panasonic MCO-19AICUV-PE).

2.2.5 Elektroporatsioon

Plasmiidide viimiseks U2OS rakkudesse kasutati elektroporatsiooni meetodit. Esmalt koguti rakud 100 mm läbimõõduga koekultuuri plaatidelt, selleks sööde aspireeriti ja rakud pesti PBS-iga. Pestud rakud eemaldati plaatidelt 1 ml trüpsiinilahusega (0,05% *Trypsin*, 0,53 mM EDTA, Corning) ja koguti söötmesse 50 ml tsentrifuugitopsis. Rakud tsentrifuugiti 1000 rpm 20 °C juures 5 min (Eppendorf Centrifuge 5810R). Üheks elektroporatsiooniks kasutati 1×10^6 rakke, 1 µg vastavat plasmidi (Tabel 2) ja 0,5 µg lõhe sperma DNA-d (ingl *salmon sperm DNA*). Reaktsioonisegu kanti 4 mm läbimõõduga elektroporatsiooniküveti (4 mm, Cell Projects Ltd). Elektroporatsiooni teostati *Gene Pulser XcellTM* (Bio-Rad) aparaadiga 975 µF mahutavusel, 220 V pinge juures. Küvetid poreeritud rakkudega jäeti inkubeerima toatemperatuuril 15-20 min, misjärel rakususpensioon tõsteti 15 ml tsentrifuugitopsidesse, kuhu oli eelnevalt lisatud 3 ml IMDM söödet ja tsentrifuugiti 1000 rpm 20 °C juures 5 min (Eppendorf Centrifuge 5810R). Sööde aspireeriti ja rakud resuspendeeriti 10 ml IMDM söötmes, misjärel kanti suspensioon 100 mm läbimõõduga plaatidele. Plaat inkubeeriti 37 °C 5% CO₂ juures 48 h (Panasonic MCO-19AICUV-PE).

Immunopretsipitatsiooni (IP) katse läbiviimiseks kasutati ko-elektroporatsiooni. Elektroporatsiooni reaktsioonisegu kokkusegamisel kasutati 1 µg vastavat plasmidi koos 1 µg metüültransferaasi plasmidi (Tabel 2, Tabel 3).

Tabel 2. **Uurimuses kasutatud plasmiidid.** Iga plasmidi puhul on välja toodud nii algne kontsentratsioon kui kasutamise kontsentratsioon.

Plasmiid	Kontsentratsioon	Elektroporatsiooni reaktsioonides	Allikas
pQM-TRMT112-WT	1888 ng/µl	0,5 µl	R. Kurg tööühm
pQM-Ø	614,1 ng/µl	1,6 µl	R. Kurg tööühm
pQM-TRMT112-S10N	198,8 ng/µl	5 µl	Käesolev töö
pQM-TRMT112-S10A	152,2 ng/µl	6,7 µl	Käesolev töö
pQM-TRMT112-S10F	1452 ng/µl	0,7 µl	R. Kurg tööühm
pQM-TRMT112-F41R	124,7 ng/µl	8 µl	Käesolev töö

Tabel 3. Uurimuses kasutatud plasmiidid topelt elektroporatsiooniks. Iga plasmidi puhul on välja toodud nii algne kontsentratsioon kui kasutamise kontsentratsioon.

Plasmiid	Kontsentratsioon	Elektroporatsiooni reaktsioonides	Allikas
pEGFP-N6AMT1	1740,15 ng/ μ l	0,6 μ l	R. Kurg tööühm
pEGFP	1143 ng/ μ l	0,9 μ l	R. Kurg tööühm
pEGFP-METTL5	1184,6 ng/ μ l	0,8 μ l	R. Kurg tööühm
pEGFP-WBSCR22	1739,06 ng/ μ l	0,6 μ l	R. Kurg tööühm

2.2.6 Rakkude kogumine Western blot analüüsiks

48 h kasvanud rakud koguti 100 mm läbimõõduga koekultuuri plaatidelt, selleks sööde aspireeriti ja plaadid koos rakkudega pesti PBS-iga. Pestud rakud eemaldati plaatidelt 1 ml trüpsiinilahusega ja koguti eraldi 15 ml tsentrifuugitopsidesse, kuhu oli eelnevalt lisatud 5 ml IMDM söödet ja tsentrifuugiti 1000 rpm 20 °C juures 5 min (Eppendorf Centrifuge 5810R). Sööde aspireeriti, lisati 5 ml PBS-i ja tsentrifuugiti uuesti 1000 rpm 20 °C juures 5 min (Eppendorf Centrifuge 5810R). Sööde aspireeriti ja rakud suspendeeriti 70 μ l PBS-is. Suspensioon tõsteti ümber 1,5 ml mikrotuubidesse millele lisati 70 μ l 2x Laemli puhvrit [10% SDS; glütserool; 1 M Tris-Cl, pH 6,8; 0,01% broomfenoolsinine; H₂O; + 1 M DTT (dititreitool)]. Lüüsisegu kuumutati 100 °C juures 10 min ja külmutati -20 °C juures edasisteks katseteks.

Immunopretsipitatsiooni katseks rakud suspendeeriti 500 μ l IP lüüsipuhvril (150 mM NaCl; 20 mM Hepes, pH 7,2; 100 mM K-atsetaat; 2 mM MgCl; 0,1% Tween-20; 1% Triton X-100; H₂O; proteaasi inhibitor), misjärel suspensiooni inkubeeriti jääl 30-40 min.

2.2.7 Immunopretsipitatsioon

Immunopretsipitatsiooni katseks kogutud 500 μ l suspensiooni, mis jagati vastavalt 450 μ l IP ja 50 μ l Input analüüsiks. 50 μ l raku suspensioonile lisati 50 μ l 2x Laemli puhvrit, mis seejärel kuumutati 100 °C juures 10 min ja külmutati -20 °C juures edasisteks Western bloti analüüsiks.

Järelejäänud 450 µl IP lüüsisegu tsentrifugiti 14800 rpm 4 °C juures 10 min (Fresco™ 21 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific). IP analüüsiks vajalike Beads'ide tasakaalustamiseks segati 1,5 ml mikrotuubidesse 500 µl külma IP lüüsipuhvrit ja 10 µl GFP-Trap® Magnetic Agarose (ChromoTek). Mikrotuub asetati *Magnetic Separation Rack*'ile ja IP lüüsipuhver eemaldati, pesu korraldi 3 korda. Seejärel lisati proovidele võrdne kogus beads'e. Proove inkubeeriti 4 °C juures 1 h. Pärast inkubeerimist pesti proove 4 korda 500 µl külma IP lüüsipuhvriga kasutades *Magnetic Separation Rack*'i. Viimase pesu lõpus eemaldati IP lüüsipuhver beads'idelt ja lisati 40 µl 2x Laemli puhvrit, mis seejärel kuumutati 100 °C juures 10 min, et eemaldada beads'idele seondunud valgud ja külmutati -20 °C juures edasisteks Western bloti analüüsiks.

2.2.8 Western blot

Valkude visualiseerimiseks lahutati valgud SDS-polüakrüülamideelise elektroforeesi teel (*SDS-page*). -20 °C juures hoitud rakulüsaati kuumutati 100 °C juures 2-4 min. 12% polüakrüülamideelile kanti 10 µl lüsaati, ja 2 µl PageRuler Prestained Protein Ladder'it (Thermo Fisher Scientific). Gelelektroforees viidi läbi SDS jooksupuhvri (1X SDS) keskkonnas, 100 V pingel juures.

Gelelektroforeesis lahutatud valgu kanti geelist üle PVDF filtrile (Amersham™ Hybond® P Western blotting membranes, PVDF, Cytiva) poolkuiva ülekande meetodil (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad). Ülekanne teostati pingel 15 V 30 min jooksul (üks membraan). Filter tõsteti blokeerimislahusesse [1 M Tris-Cl pH 7,5; 5 M NaCl; 0,001% Tween-20 + 5% NFDM (*non-fat dry milk*)] ja hoiti kallutil toatemperatuuril 1 h. Valkude detekteerimiseks kasutati uuritavatele valkudele spetsiifilisi antikehi (Tabel 3). Antikehad kanti filtrile inkubeerimislahuses [1 M Tris-Cl pH 7,5; 5 M NaCl; 0,001% Tween-20 + 2,5% NFDM (*non-fat dry milk*)]. Filtrit inkubeeriti koos primaarse antikehaga kallutil -4 °C juures 24 h. Pärast inkubeerimist pesti filtrit 3 korda 10 min *Western*'i pesulahuses (1 M Tris-Cl pH 7,5; 5 M NaCl; 0,001% Tween-20). Pestud filtrit inkubeeriti kallutil toatemperatuuril primaarsetele antikehadele vastaval sekundaarsete antikehadega (Tabel 4) inkubeerimislahusega 30 min. Pärast inkubeerimist pesti filtrit 3 korda 10 min *Western*'i pesulahuses (1 M Tris-Cl pH 7,5; 5 M NaCl; 0,001% Tween-20). Valkude visualiseerimiseks kasutati kemoluminestsentsreaktsiooni. Pestud filtriga viidi läbi ilmutusreaktsioon ECL komplektiga (Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents, Cytiva). Signaal visualiseeriti röntgenfilmile (AGFA

CP-BU M Medical X-ray Film Blue, Agfa HealthCare). Pildid skaneeriti EPSON EXPRESSION 1680 PRO-ga.

Tabel 4. **Uurimuses kasutatud primaarsed antikehad.** Iga antikeha puhul on välja toodud nii algne kontsentratsioon kui kasutamise kontsentratsioon.

Antikeha	Päritolu	Kontsentratsioon	Western blot	Tootja
α -TRTM112	Hiirest	200 μ g/ml	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
5E11-E2Tag		1 mg/ml	1:10000	Icosagen, Tartu, Estonia
α -Tubulin		15-55 mg/ml	1:20000	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
EGFP	Jänesest	1 mg/ml	1:10000	Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituut

Tabel 5. **Uurimuses kasutatud sekundaarsed antikehad.** Iga antikeha puhul on välja toodud nii algne kontsentratsioon kui kasutamise kontsentratsioon.

Antikeha	Tootja	Kontsentratsioon	Western blot
Goat anti-mouse	LabAS	1 mg/ml	1:10000
Goat anti-rabbit		1 mg/ml	1:10000

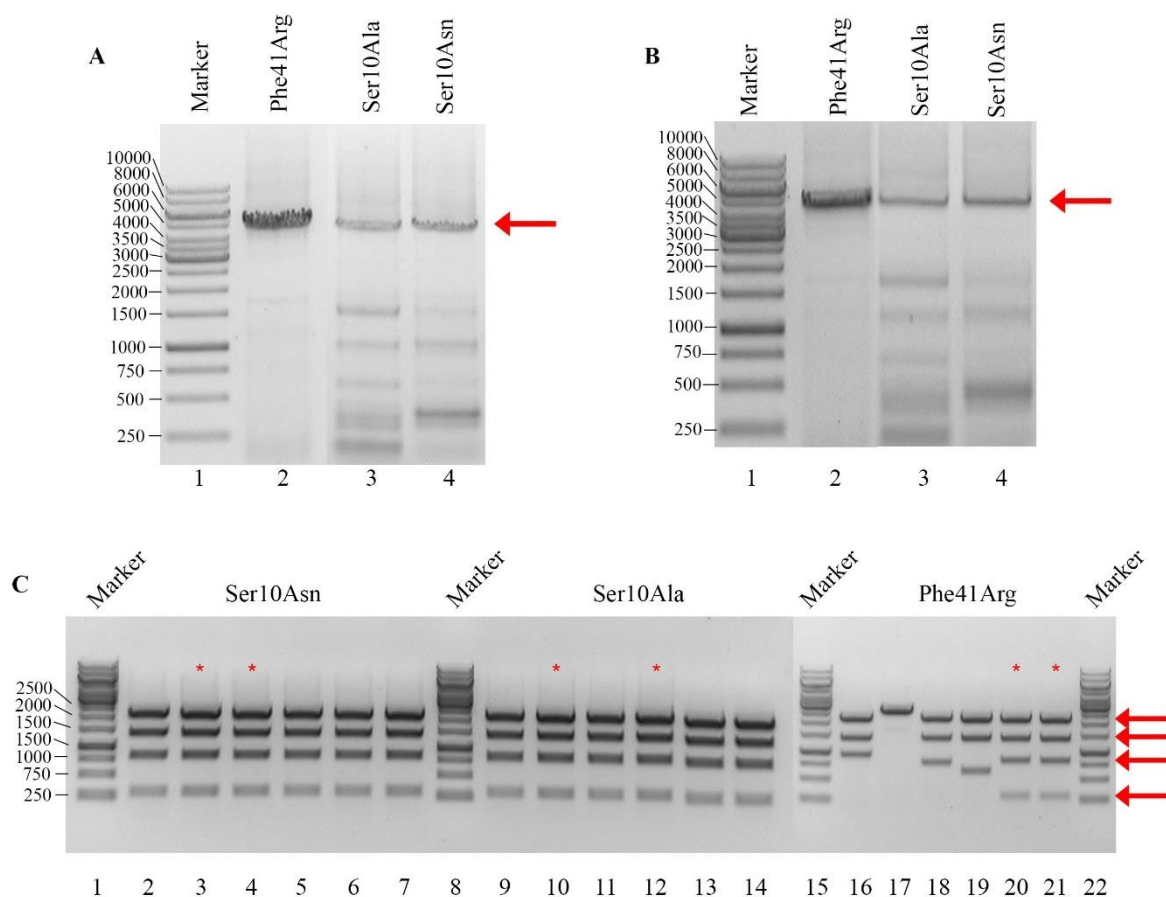
2.3 Tulemused

2.3.1 Praimerite disain

TRMT112 valgu ja metüültransferaaside interaktsioonide uurimiseks valiti välja TMRT112 valgu seriin 10. positsioon (S10) ning fenüülalaniini 41. positsioon (F41). Antud aminohapped valiti välja juhendajate poolt kirjanduses avaldatud andmete põhjal ning *in silico* TMRT112-metüültransferaaside heteromeer kristallstruktuuride analüüsiga. Mutatsioonide sisseviimiseks valitud positsioonidesse kasutati PCR mutageneesi. Selle tarbeks disainiti praimerid nii, et 10. positsioonil asuv seriin vahetati välja, esimesel juhulalaniiniks (Ala, A), mis on mittepolaarne ja omab hüdrofoobset kõrvalahelat ning teisel juhul aspargiiniks (Asn, N), mis on hüdrofiilne ja omab polaarset laenguta kõrvalahelat. 41. positsioonil asuv fenüülalaniin vahetati arginiiniks (Arg, R), mis on aluseline ja hüdrofiilne ning omab positiivset kõrvalahelat. Praimerid telliti firmalt Microsynth AG ja lahustati vastavalt toote juhendile. Praimerid on toodud välja tabelis 1.

2.3.2 TRMT112 plasmidi mutagenees

Punktmutatsioonide läbiviimiseks kasutati PIPE-PCR meetodit (Klock & Lesley, 2009). PCR viidi läbi kasutades disainitud primereid (Tabel 1) ja pQM-TRMT112-E2Tag plasmidi (Lisa 1.), mille suurus on 4688 bp. PCR efektiivsust kontrolliti 0,8% agarose geelelektroforeesil (Joonis 5A ja 5B). Jooniselt on näha, et F41R PCR sisaldas ainult eeldatava suurusega fragmenti, samal ajal S10A ja S10N juures on oodatav band oluliselt nõrgem ning on näha mitmeid kõrvalprodukte. Analüüsiks valiti igast mutageneesist 6 kolooniat minipreparatsiooniks. Saadud plasmidse DNA kontrolliks tehti kontrollrestriktsioon. Joonisel 5C. on näha, et TRMT112-S10A ja TRMT112-S10N puhul vastab kõikide valitud kolooniate restriksiooni pilt oodatavate DNA fragmentide suurustele (märgitud punaste nooltega). Samas TRMT112-F41R puhul on kuuest valitud kolooniast vaid 2 korrektse restriksioonipildiga. Kontrollrestriktsiooni tulemuste põhjal valiti iga mutageneesi kohta kaks kolooniat (Joonis 5C, märgitud tärniga), et kinnitada mutatsioonide olemasolu sekveneerimisega. Sekveneerimine kinnitas, et kõik valitud kolooniad sisaldasid vastavat mutatsiooni.

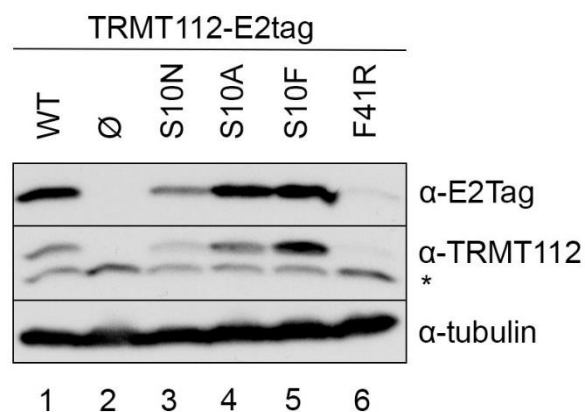


Joonis 5. **TRMT112 plasmidi mutagenees**. A. PCR mutageneesi kontroll, B. PCR reaktsioonisegu DpnI töötlus, C. kontrollrestriksioon. Proovid on analüüsitud agarose geel elektroforeesil. Korrektsed bändid on märgitud noolega. DNA marker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific).

2.3.3 Mutatsioonid TRMT112 valgus mõjutavad ekspressiooni taset ja/või stabiilsust

U2OS rakkude elektroporatsiooniks kasutati pQM-TRMT112-WT, pQM-Ø, pQM-TRMT112-S10N, pQM-TRMT112-S10A, pQM-TRMT112-S10F, pQM-TRMT112-F41R ekspressiooni konstrukte. 48 h peale transfektsiooni koguti rakud ja analüüsiti Western blot meetodiga. Selleks kasutati E2Tag, TRMT112 ja tubulini vastaseid antikehi (Tabel 4). E2 vastase antikehaga detekteeriti vaid transiensekspressioonitud TRMT112-te, kuid TRMT112 vastase antikehaga nii transiensekspressioonitud TRMT112 (Joonis 6, ülemine band) kui ka endogeenset (Joonis 6, alumine band, märgistatud tärniga) TRMT112 valku. Proovide sisenemise kontrolliks kasutati tubulin vastast antikeha. Western blot analüüs tubuliniga

kinnitab, et kõigi analüüsitud proovide valgukogus on väga sarnane. Võrreldes wt TRMT112-ga on TRMT112-S10N valgu tase selgelt vähenenud. Sarnast vähenemist on näha ka TRMT112 valguspetsiifilise antikehaga, kus üleekspresseeritud TRMT112-S10N band on oluliselt nõrgem wt TRMT112st, kuid endogeense TRMT112 tasemes erinevusi ei ole. TRMT112-S10A valgu ekspressioonitase oli sama wt TRMT112 ekspressiooniga, seda nii TRMT112 kui E2 vastase antikehaga. Üllatavalt oli TRMT112-S10F valgu ekspressioonitase, võrreldes wt valguga kõrgem, mis tuleb oluliselt rohkem esile TRMT112 vastase antikehaga, samal ajal kui E2 tag vastase antikehaga pole see nii ilmselge. Joonisel 6. on selgelt näha, et TRMT112-F41R valgu ekspressioonitase rakus vähenes tähelepanuväärselt võrreldes TRMT112 wt valguga. Sama efekt on selgelt ilmne ka E2 tagi vastase antikehaga tehtud Western blotil.



Joonis 6. TRMT112 valgu mutantide ekspressioon U2OS rakkudes. U2OS rakkude elektroporatsiooniks kasutati pQM-TRMT112-WT, pQM-Ø, pQM-TRMT112-S10N, pQM-TRMT112-S10A, pQM-TRMT112-S10F, pQM-TRMT112-F41R ekspressiooni-konstrukt, mis kodeerivad wt TRMT112 (rada 1.), tühja pQM plasmidi (rada 2.), TRMT11-S10N (rada 3.), TRMT112-S10A (rada 4.), TRMT112-S10F (rada 5.) ja TRMT112-F41R (rada 6.) valku. 48 h möödudes koguti rakud ja analüüsiti Western blot meetodiga. Selleks kasutati E2Tag, TRMT112 ja tubulini vastaseid antikehi. TRMT112 antikehaga tulemuste pildil on kujutatud nii transientselt ekspresseeritud TRMT112 (ülemine band) kui ka endogeenset (alumine band, märgitud tärniga) TRMT112 valku.

2.3.4 Interaktsioon metüültransferaasidega mõjutab TRMT112 mutantide ekspressiooni/stabiilsust

TRMT112 valgu ja metüültransferaaside interaktsioonide uurimiseks viidi läbi ko-elektroporatsioon U2OS rakkudes kahe plasmiidiga. Elektroporatsiooniks kasutati pQM-TRMT112-WT, pQM-Ø, pQM-TRMT112-S10N, pQM-TRMT112-S10A, pQM-TRMT112-S10F ja pQM-TRMT112-F41R ekspressiooni konstrukte koos pEGFP, pEGFP-N6AMT1, pEGFP-METTTL5 ja pEGFP-WBSCR22 konstruktidega. 48 h peale transfektsiooni koguti rakud ja sooritati immunopretsipitatsioon GFP-Trap Beads'idega, mis seovad GFP-ga liidetud metüültransferaase. Input osa joonisel 7. tähistab kogutud rakkude lüsaati ja IP GFP-trap osa immunopretsipiteeritud valke. Western blot analüüsis kasutati EGFP, E2Tag ja TRMT112 vastaseid antikehi. TRMT112 vastase antikehaga tuvastati nii transientselt ekspresseeritud kui ka endogeenseid TRMT112 valke. TRMT112 valkude ja metüültransferaaside interaktsioonide analüüsil tuvastati nii sarnasusi kui ka erinevusi.

Ko-transfektsioon vaid EGFP plasmiidiga (Joonis 7A) näitab sarnast EGFP taset kõikide proovide puhul. Üleekspresseeritud TRMT112 puhul on näha sarnaseid erinevusi kui joonisel 7. TRMT112-S10N on veidi madalama ekspressioonitasemega kui wt TRMT112. TRMT112-S10A on väga sarnase ekspressioonitasemega kui wt TRMT112 ning S10F puhul on näha suurenenud ekspressiooni taset. IP fraktsioonis on olemas vaid EGFP mis näitab, et interaktsioon toimub TRMT112 ja metüültransferaasi vahel ning seondumist TRMT112 ja EGFP vahel ei toimu.

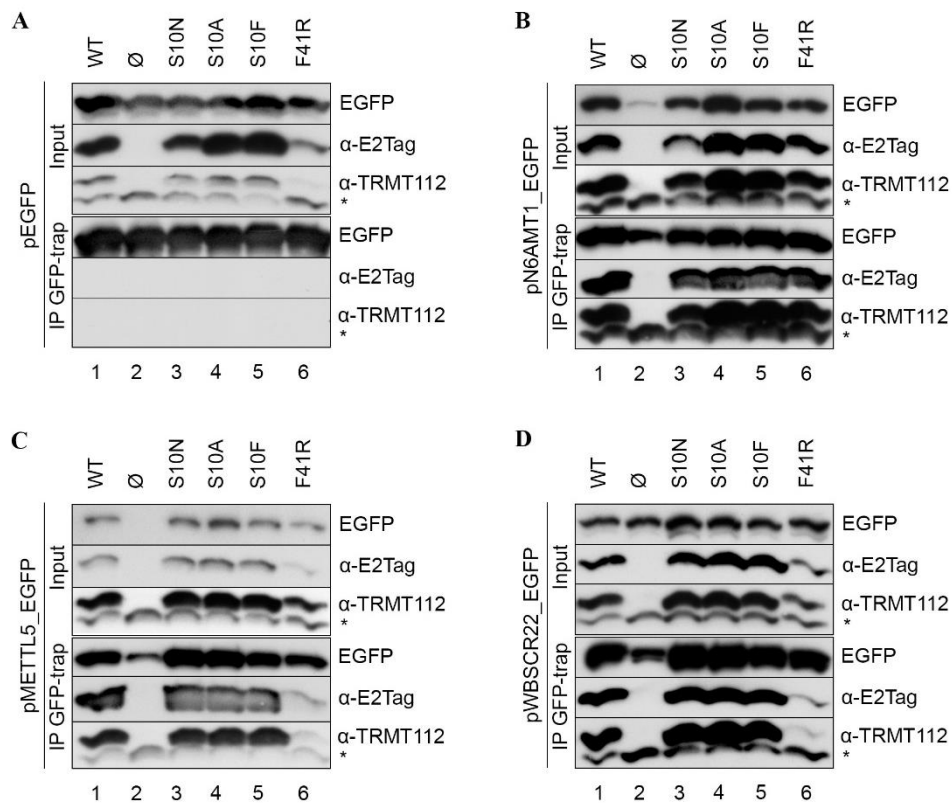
pEGFP-N6AMT1 ko-transfektsioonil, koos erinevate TRMT112 mutantidega ja tühja plasmiidiga (pQM-Ø), on näha et suureneb EGFP-N6AMT1 kogus (Joonis 7B, Input EGFP paneelid). Sama efekti on selgelt näha ka ko-transfektsioonil pMETTTL5-EGFP-ga (Joonis 7C, Input EGFP paneel). Samal ajal on näha vaid minimaalne erinevus pEGFP-WBSCR22 ko-transfektsioonil (Joonis 7D, Input EGFP paneel).

TRMT112-S10N mutatsiooniga valgu ekspressioonil koos EGFP-N6AMT1 valguga on endiselt TRMT112-S10N valgu tase madalam võrreldes wt TRMT112-ga (Joonis 7B, E2Tag ja TRMT112 paneel). Samal ajal on näha, et ko-ekspressioonil EGFP-METTTL5- ja EGFP-WBSCR22-ga on TRMT112-S10N bänd võrreldav wt TRMT112-ga (Joonis 7C ja 7D). IP GFP-trap paneelis on näha, et interaktsioon EGFP-METTTL5- ja EGFP-WBSCR22-ga on sarnane wt TRMT112-ga, kuid sarnaselt input paneeliga on interaktsioonil EGFP-N6AMT1-ga on endiselt valgu tase madalam võrreldes wt TRMT112-ga.

TRMT112-S10A mutatsiooniga valgu ekspressioonil koos EGFP-N6AMT-ga (Joonis 7B) ja EGFP-WBSCR22-ga (Joonis 7D) on valgu tase suurem võrreldes wt TRMT112-ga, samas ko-ekspressioon EGFP-METTL5-ga (Joonis 7C) on TRMT112-S10N bänd võrreldav wt TRMT112-ga. IP GFP-trap paneelis on näha, et TRMT112-S10A bänd nii EGFP-N6AMT1- (Joonis 7B) kui ka EGFP-WBSCR22-ga (Joonis 7D) on tugevam kui wt TRMT112-ga, ko-ekspressioonil EGFP-METTL5-ga (Joonis 7C) jäi TRMT112-S10A bänd võrreldavaks wt TRMT112-ga.

TRMT112-S10F mutatsiooniga valgu ekspressioonitase koos EGFP-N6AMT1-, EGFP-METTL5- ja EGFP-WBSCR22-ga oli väga sarnane võrreldes wt TRMT112-ga (Joonis 7B, 7C ja 7D). Sarnast bändide tugevust oli näha ka IP paneelis, ko-ekspressioonil EGFP-N6AMT1-, EGFP-METTL5- ja EGFP-WBSCR22-ga on TRMT112-S10F bänd sarnane võrreldes wt TRMT112-ga.

TRMT112-F41R mutatsiooniga valgu ekspressioonitase koos EGFP-N6AMT1-ga (Joonis 7B) on võrreldav wt TRMT112-ga, ko-ekspressioonil EGFP-METTL5- ja EGFP-WBSCR22-ga on TRMT112-F41R valgu tase väiksem võrreldes wt TRMT112-ga (Joonis 7C ja 7D). IP GFP-trap paneelis on näha, et ko-ekspressioonil koos EGFP-N6AMT1-ga jääb TRMT112-F41R bänd võrreldavaks wt TRMT112-ga (Joonis 7B). Ko-ekspressioonil EGFP-METTL5- ja EGFP-WBSCR22-ga on TRMT112-F41R valgu hulk oluliselt madalam võrreldes wt TRMT112-ga (Joonis 7C ja 7D), samas endogeenne TRMT112 tase on võrreldav nii wt TRMT112 kui TRMT112 mutantide proovides (Joonis 7C ja 7D, α -TRMT112 paneel).



Joonis 7. **TRMT112 valgu mutantide interaktsioon N6AMT1, METTL5 ja WBSCR22-ga.** U2OS rakud poreeriti E2Tag plasmiididega, mis kodeerivad wt TRMT112 (rada 1.), tühja pQM plasmidi (rada 2.) ja mutantseid TRMT112 valke; S10N (rada 3.), S10A (rada 4.), S10F (rada 5.) ja F41R (rada 6.), koos EGFP (A) ja EGFP-N6AMT1 (B), EGFP-METTL5 (C) ja EGFP-WBSCR22 (D) ekspresseerivate plasmiididega. 48 h möödudes koguti rakud ja sooritati immunopretsipitatsioon GFP-Trap Beads'idega, misjärel analüüsiti proove Western blotiga. Input osa joonisel (A – D) tähistab kogutud rakkude lüsaati ja IP GFP-trap osa rakulüsaati pärast immunopretsipitatsiooni. Mõlemat osa analüüsiti kasutades EGFP, α -E2Tag ja α -TRMT112 vastaseid antikehi. TRMT112 antikehaga tulemuste pildil on näha nii üleekspresseeritud kui ka endogeenset TRMT112 valku.

2.4 Arutelu

Antud töö eesmärgiks oli uurida kuidas erinevate omadustega aminohapped mõjutavad TRMT112 stabiilsust ja ekspressiooni ning seondumist metüültransferaasidega. Selle tarvis disainiti ja konstrueeriti konstruktid, mis ekspresseerivad mutantset TRMT112 valku. Selles töös muteeriti aminohappeid asukohtadel 10 ja 41. 10. positsioonil asuv seriin (Ser10, S10), omab polaarseid laenguta kõrvalahelat ja on hüdrofiilne tänu oma hüdroksüülrühma võimele vesiniksidemeid moodustada. S10 asendati teiste aminohapetega, vastavalt:alaniin (Ala, A), mis on mittepolaarne ja omab hüdrofoobset kõrvalahelat, aspragiin (Asn, N), mis on hüdrofiilne ja omab polaarseid laenguta kõrvalahelat ning fenüülalaniin (Phe, F), mis on neutraalne ja mittepolaarne tänu oma aromaatsesele ning hüdrofoobsele kõrvalahelale, bensüülrühmale. 41. positsioonil asuv fenüülalaniin (Phe, F) on neutraalne ja mittepolaarne tänu oma aromaatsesele ning hüdrofoobsele kõrvalahelale, bensüülrühmale. F41 asendati arginiin (Arg, R), mis on aluseline ja hüdrofiilne ning omab positiivset laetud kõrvalahelat. Kokkuvõttes õnnestus TRMT112 mutantide konstruktide disainimine ja loomine.

Mutantide analüüsil Western blot meetodiga näidati, et TRMT112-S10N mutandi ekspressioon rakkudes oli madalam kui wt TRMT112, samal ajal TRMT112-S10A oli sarnase tasemega ning TRMT112-S10F oli hoopis suurenenud ekspressioonitasemega kui wt TRMT112. TRMT112-F41R valgu ekspressioonitase rakus oli tähelepanuväärselt madalam kui wt TRMT112. TRMT112-S10N ja TRMT112-F41R mutatsiooni selge ebastabiilsus võiks olla seletatav seriini ja aspragiini ning fenüülalaniini ja arginiini erinevate omadusega, aspragiin on seriinist hüdrofiilsem ja arginiin, olles hüdrofiilne, vastandub täielikult fenüülalaniinile, mis on hüdrofoobne. TRMT112 valgu interaktsioonipind on hüdrofoobne (van Tran *et al.*, 2019). Asendus hüdrofiilsema aminohappega antud piirkonnas vähendaks TRMT112 valgu interaktsioonipinna hüdrofoobsust ja seeläbi interaktsioonide tugevust. TRMT112 valk, mis ei suudaks luua interaktsioone võidaks rakus lagundada, võib oletada, et TRMT112-te lagundatakse ebastabiilsuse tõttu ja teda eksisteerib rakus ilma interaktsioonipartnerita vaid väga väikeses koguses. Sarnane mudel kehtiks ka ülejäänud TRMT112 mutantide kohta,alaniin ja fenüülalaniin on hüdrofoobsed ja suurendaksid interaktsioonipinna hüdrofoobsust, soodustades interaktsioonipartnerite seondumist ja seeläbi suurendaks TRMT112 valgu kogust rakus.

Õunap *et al.* näitas, et TRMT112 valgu allaregulatsioonil vähenes rakus WBSCR22 kogus. Sarnast fenomeni oli näha ka käesolevas töös TRMT112 ja tema metüültransferaaside analüüsimisel. Ko-transfektsioon METTL5 ja TRMT112 valguga suurendas tugevalt EGFP-

METTL5 taset rakus (Joonis 7C, EGFP paneel). Sama efekt oli ilmselge ka EGFP-N6AMT1 valgu ja TRMT112 ko-transfektsioonil (Joonis 7B, EGFP paneel). EGFP-WBSCR22 puhul oli efekt tagasihoidlikum. Huvitav on, et antud töös uuritud mutatsioonid ei mõjutanud oluliselt sellist positiivse tagasiside ringi.

Ko-ekspressioonil EGFP-N6AMT1-ga on TRMT112-S10N valgu tase madalam võrreldes wt TRMT112-ga, kuid IP analüüsil näidati, et TRMT112-S10N seostub EGFP-N6AMT1-ga peaaegu sama efektiivselt kui wt TRMT112-ga. Tõenäoliselt võib siiski S10N mutatsioon takistada TRMT112 valgul interaktsioonide loomist eelkõige N6AMT1-ga, mistõttu langeb nii TRMT112 kui ka N6AMT1 kogus rakus (Joonis 7B). W. Li *et al.* (2019) märgib, et Ser10 moodustab vesiniksideme N6AMT1 Gly107-ga, viidates positsiooni olulisusele just N6AMT1 interaktsioonides. EGFP-METTL5 ja EGFP-WBSCR22 ko-ekspressioonil oli TRMT112-S10N valgu tase rakkudes võrreldav wt TRMT112-ga. IP analüüsil näidati, et interaktsioon EGFP-METTL5- ja EGFP-WBSCR22-ga on sarnane wt TRMT112ga. Sellised tulemused viitavad, et TRMT112 valgu stabiilsuse juures mängivad väga olulist rolli erinevad interaktsiooni parterid ning nende hulk ja/või kättesaadavus rakus.

S10A mutatsiooniga TRMT112 valgu tase rakus oli võrdne wt TRMT112 valguga nii N6AMT1, METTL5 kui ka WBSCR22 ko-transfektsioonil. Aspargiini mutatsioon ei soosinud interaktsiooni N6AMT1-ga agaalani mutatsioonil suurenesid interaktsioonid nii N6AMT1- kui ka WBSCR22 valguga. TRMT112-S10A interaktsioon METTL5-ga jäi võrreldavaks wt TRMT112-ga. Tõenäoliselt sobibalaniin tänu oma hüdrofoobsusele paremini TRMT112 hüdrofoobsele interaktsioonipinnale. Miks aga üleekspresseeritud TRMT112 valgu kogus rakus seetõttu ei suurenenud, on raske öelda ja vajaks edasist uurimist.

Erinevalt S10N ja S10A mutatsioonist, oli S10F mutatsiooniga TRMT112 valgu tase rakus nii üksinda kui ko-ekspressioonil N6AMT1-, METTL5- ja WBSCR22-ga suurem võrreldes wt TRMT112 valguga. IP analüüsil näidati sarnast efekti kõigi metüültransferaasidega, nii N6AMT1, METTL5 kui ka WBSCR22 puhul oli TRMT112-S10F valgu tase rakus oli suurem võrreldes wt TRMT112 valguga. TRMT112-S10F valgu koguse kasvamine rakus oli tõenäoliselt põhjustatud TRMT112 valgul interaktsioonide suurenemisest. Sarnaseltalaniiniga on fenüüalaniin hüdrofoobne ja näib selle omaduse poolest sobivat hüdrofoobsele interaktsiooni alale.

TRMT112-F41R mutandi analüüsil näidati, et valgu ekspressioonitase rakus vähenes võrreldes wt TRMT112 valguga. Selgelt oli näha, et ko-transfektsioon METTL5-, N6AMT1- ja WBSCR22-ga oluliselt stabiliseeris TRMT112-F41R valku. Immunosadestamise tulemused

näitasid, et vähenesid interaktsioonid METTL5- ja WBSCR22 valkudega, kuid N6AMT1 interaktsioon oli võrreldav wt TRMT112-ga. W. Li *et al.* näitas, et 41. positsioonil asuv fenüülalaniin on oluline hüdrofoobse interaktsiooni tekitamisel TRMT112 ja N6AMT1 vahel. Käesolevas töös aga F41R mutatsioon ei muutnud N6AMT1 – TRMT112 vahelist interaktsiooni, seevastu TRMT112-F41R interaktsioon METTL5- ja WBSCR22-ga aga vähenes. See võib viidata TRMT112 eelis seondumisele N6AMT1 metüültransferaasiga, mistõttu enamuse TRMT112-F41R seondus N6AMT1-ga. Miks arginiin, mis on omaduselt hüdrofiilne, ei mõjuta interaktsiooni N6AMT1-ga on raske öelda.

Edaspidi oleks võimalik, loodud konstrukte kasutades, uurida TRMT112 eelistusi oma interaktsioonipartnerite valimisel ja mutatsioonide olulisust selles protsessis. Immunofluorestsentsmeetodil oleks võimalik määrata TRMT112, tema mutantide ja interaktsioonipartnerite lokaliseerumist rakus, eeldatavasti lokaliseerub TRMT112 selle interaktsioonipartneri juures, millega ta kõige soodsamalt seondub. Immunoensüümmeetod võimaldaks TRMT112, tema mutantide ja interaktsioonipartnerite kvantitatiivse koguse iseloomustamist, mille abil täpsemalt hinnata mutatsioonide mõju interaktsioonile.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli mutantsete TRMT112 plasmiidide disain ja konstruktsioon, mille abil uuriti kuidas mutatsioonid mõjutavad TRMT112 valgu stabiilsust, ekspressiooni ning interaktsiooni tema teadaolevate interaktsioonipartneritega (N6AMT1, WBSCR22 ja METTL5). Analüüs viidi läbi WB ja immunopretsipitatsiooni meetoditega

TRMT112 10. ning 41. aa positsiooni mutantide ekspressiooni analüüsil selgus, et erinevad mutatsioonid mõjutavad TRMT112 valgu stabiilsust erinevalt. Mutatsioonide mõju analüüsil selgusid mitmed sarnasused ja erinevused nii TRMT112 ekspressioonis kui ka interaktsioonis erinevate metüültransferaasidega.

Arvatavasti põhjustab stabiilsuse erinevust, TRMT112 valgu mutantide vahel, aminohapete omaduste erinevus. TRMT112 interaktsioonipinna hüdrofoobsust tugevdavad mutatsioonid nagu S10A ja S10F mõjusid soodsalt valgu stabiilsusele, hüdrofoobsust nõrgendavad mutatsioonid nagu S10N ja F41R aga mitte. Ko-transfektsioonil metüültransferaasidega suurenes TRMT112 valgu hulk nii wt TRMT112 kui TRMT112 mutantide puhul, samuti suurenes ka metüültransferaaside hulk. Sellist positiivse tagasiside ringi aga ei mõjutanud oluliselt erinevate mutatsioonide olemasolu. Ko-ekspressioonil metüültransferaasidega oli TRMT112 mutantide omavahelisel võrdlusel näha selgeid erinevusi interaktsioonide tugevuses. Mutatsioonid S10A ja F41R moodustasid nõrgemaid interaktsioone ning S10N ja S10F moodustasid tugevamaid interaktsioone.

Käesolevas bakalaureusetöös uuritud aminohappe positsioonid on olulised TRMT112 interaktsioonil metüültransferaasidega ning on oluliseks osaks suuremas TRMT112-metüültransferaaside võrgu uurimistöös.

Methyltransferase co-faktor TRMT112 mutation analysis

Robert Johannes Sarap

SUMMARY

Methylation is a biochemical process, during which methyl group is added to a wide range of molecular substrates such as lipids, proteins, DNA and RNA. Methylation plays an important role in regulatory mechanisms, such as epigenetics, imprinting, cellular biosynthesis, metabolism and signal transduction. Unregulated methylation is closely linked to cancer. Methylation reactions are catalysed by methyltransferases, which use S-adenosylmethionine as a methyl group donor. Methyltransferases (N6AMT1, WBSCR22 and METTL5) require a co-factor, TRMT112, for their metabolic stability and enzymatic activity. 30% of methyltransferases are associated with various diseases, cancers and mental disorders.

In the current thesis mutagenesis was performed in methyltransferase co-faktor TRMT112 to produce plasmids, encoding for TRMT112 protein mutants (TRMT112-S10A, TRMT112-S10N and TRMT112-F41R). These plasmids were used to analyse how TRMT112 mutations affect protein stability, expression and interaction with it's known interactionpartners (N6AMT1, WBSCR22 and METTL5).

The results show that the TRMT112 protein mutation stability is affected by the differences in amino acid properties. Analysis of the effect of mutations revealed several similarities and differences in both TRMT112 expression and interaction with different methyltransferases. S10A and S10F mutations produced stable proteins while S10N ja F41R mutations produced unstable ones. Co-transfection with methyltransferases increased the amount of TRMT112 protein in both wt TRMT112 and TRMT112 mutants. Additionally it was detected, the amount of methyltransferases increased as well as, thus creating a strong positive feedback loop between TRMT112 and analysed methyltransferases. However this was not significantly affected by the presence of different TRMT112 mutations. Co-expression with methyltransferases showed clear differences in the strength of the interactions between TRMT112 mutants, mostly corresponding to the observations made while studying stability.

The amino acid positions studied in this bachelor's thesis are important for the interactions of TRMT112 protein and it's methyltransferases and also an important part of the larger research of the TRMT112 methyltransferase network.

KIRJANDUSE LOETELU

- Alderman, M. H., & Xiao, A. Z. (2019). N(6)-Methyladenine in eukaryotes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(15), 2957–2966.
- Bedford, M. T., & Clarke, S. G. (2009). Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Molecular Cell*, 33(1), 1–13.
- Blanc, R. S., & Richard, S. (2017). Arginine Methylation: The Coming of Age. *Molecular Cell*, 65(1), 8–24.
- Bourgeois, G., L  toquart, J., van Tran, N., & Graille, M. (2017). Trm112, a Protein Activator of Methyltransferases Modifying Actors of the Eukaryotic Translational Apparatus. *Biomolecules*, 7(4), 7.
- Doll, A., & Grzeschik, K.-H. (2001). Characterization of two novel genes, WBSCR20 and WBSCR22, deleted in Williams-Beuren syndrome. *Cytogenetic and Genome Research*, 95(1–2), 20–27.
- Ehrlich, M., Wilson, G. G., Kuo, K. C., & Gehrke, C. W. (1987). N4-methylcytosine as a minor base in bacterial DNA. *Journal of Bacteriology*, 169(3), 939–943.
- Fu, D., Brophy, J. A. N., Chan, C. T. Y., Atmore, K. A., Begley, U., Paules, R. S., Dedon, P. C., Begley, T. J., & Samson, L. D. (2010). Human AlkB homolog ABH8 Is a tRNA methyltransferase required for wobble uridine modification and DNA damage survival. *Molecular and Cellular Biology*, 30(10), 2449–2459.
- Goll, M. G., & Bestor, T. H. (2005). EUKARYOTIC CYTOSINE METHYLTRANSFERASES. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 481–514.
- Gu, T., He, H., Zhang, Y., Han, Z., Hou, G., Zeng, T., Liu, Q., & Wu, Q. (2012). Trmt112 Gene Expression in Mouse Embryonic Development. *ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA*, 45(2), 113–119.
- Haag, S., Kretschmer, J., & Bohnsack, M. T. (2015). WBSCR22/Merm1 is required for late nuclear pre-ribosomal RNA processing and mediates N⁷-methylation of G1639 in human 18S rRNA. *RNA*, 21(2), 180–187.
- Han, D., Huang, M., Wang, T., Li, Z., Chen, Y., Liu, C., Lei, Z., & Chu, X. (2019). Lysine methylation of transcription factors in cancer. *Cell Death & Disease*, 10(4), 290.

- Hu, Z., Qin, Z., Wang, M., Xu, C., Feng, G., Liu, J., Meng, Z., & Hu, Y. (2010). The Arabidopsis SMO2, a homologue of yeast TRM112, modulates progression of cell division during organ growth. *The Plant Journal*, 61(4), 600–610.
- Huang, R. (2019). Chemical Biology of Protein N-Terminal Methyltransferases. *ChemBioChem*, 20(8), 976–984.
- Husmann, D., & Gozani, O. (2019). Histone lysine methyltransferases in biology and disease. *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(10), 880–889.
- Klock, H. E., & Lesley, S. A. (2009). The Polymerase Incomplete Primer Extension (PIPE) method applied to high-throughput cloning and site-directed mutagenesis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 498, 91–103.
- Leetsi, L., Öunap, K., Abroi, A., & Kurg, R. (2019). The Common Partner of Several Methyltransferases TRMT112 Regulates the Expression of N6AMT1 Isoforms in Mammalian Cells. *Biomolecules*, 9(9).
- Leismann, J., Spagnuolo, M., Pradhan, M., Wacheul, L., Vu, M. A., Musheev, M., Mier, P., Andrade-Navarro, M. A., Graille, M., Niehrs, C., Lafontaine, D. L., & Roignant, J. (2020). The 18S ribosomal RNA m⁶A methyltransferase Mettl5 is required for normal walking behavior in *Drosophila*. *EMBO Reports*, 21(7).
- Li, J., Ahn, J. H., & Wang, G. G. (2019). Understanding histone H3 lysine 36 methylation and its deregulation in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(15), 2899–2916.
- Li, W., Shi, Y., Zhang, T., Ye, J., & Ding, J. (2019). Structural insight into human N6amt1–Trm112 complex functioning as a protein methyltransferase. *Cell Discovery*, 5(1), 51.
- Liberman, N., O’Brown, Z. K., Earl, A. S., Boulias, K., Gerashchenko, M. V., Wang, S. Y., Fritsche, C., Fady, P.-E., Dong, A., Gladyshev, V. N., & Greer, E. L. (2020). N6-adenosine methylation of ribosomal RNA affects lipid oxidation and stress resistance. *Science Advances*, 6(17), eaaz4370.
- Liger, D., Mora, L., Lazar, N., Figaro, S., Henri, J., Scrima, N., Buckingham, R. H., van Tilbeurgh, H., Heurgué-Hamard, V., & Graille, M. (2011). Mechanism of activation of methyltransferases involved in translation by the Trm112 ‘hub’ protein. *Nucleic Acids Research*, 39(14), 6249–6259.

- Liscombe, D. K., Louie, G. V., & Noel, J. P. (2012). Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases. *Natural Product Reports*, 29(10), 1238.
- Liu, J., Zhu, Y., Luo, G.-Z., Wang, X., Yue, Y., Wang, X., Zong, X., Chen, K., Yin, H., Fu, Y., Han, D., Wang, Y., Chen, D., & He, C. (2016). Abundant DNA 6mA methylation during early embryogenesis of zebrafish and pig. *Nature Communications*, 7(1), 13052.
- Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., Jia, G., Yu, M., Lu, Z., Deng, X., Dai, Q., Chen, W., & He, C. (2014). A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature Chemical Biology*, 10(2), 93–95.
- Liu, P., Nie, S., Li, B., Yang, Z.-Q., Xu, Z.-M., Fei, J., Lin, C., Zeng, R., & Xu, G.-L. (2010). Deficiency in a Glutamine-Specific Methyltransferase for Release Factor Causes Mouse Embryonic Lethality. *Molecular and Cellular Biology*, 30(17), 4245–4253.
- Luo, C., Hajkova, P., & Ecker, J. R. (2018). Dynamic DNA methylation: In the right place at the right time. *Science*, 361(6409), 1336–1340.
- Martin, J. (2002). SAM (dependent) I AM: The S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(6), 783–793.
- Menezo, Y., Clement, P., Clement, A., & Elder, K. (2020). Methylation: An Ineluctable Biochemical and Physiological Process Essential to the Transmission of Life. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9311.
- Metzger, E., Wang, S., Urban, S., Willmann, D., Schmidt, A., Offermann, A., Allen, A., Sum, M., Obier, N., Cottard, F., Ulferts, S., Preca, B.-T., Hermann, B., Maurer, J., Greschik, H., Hornung, V., Einsle, O., Perner, S., Imhof, A., ... Schüle, R. (2019). KMT9 monomethylates histone H4 lysine 12 and controls proliferation of prostate cancer cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(5), 361–371.
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38.
- O’Brown, Z. K., Boulias, K., Wang, J., Wang, S. Y., O’Brown, N. M., Hao, Z., Shibuya, H., Fady, P.-E., Shi, Y., He, C., Megason, S. G., Liu, T., & Greer, E. L. (2019). Sources of artifact in measurements of 6mA and 4mC abundance in eukaryotic genomic DNA. *BMC Genomics*, 20(1), 445.

- Petrosian, T. C., & Clarke, S. G. (2011). Uncovering the Human Methyltransferasome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(1), M110.000976.
- Richard, E. M., Polla, D. L., Assir, M. Z., Contreras, M., Shahzad, M., Khan, A. A., Razzaq, A., Akram, J., Tarar, M. N., Blanpied, T. A., Ahmed, Z. M., Abou Jamra, R., Wieczorek, D., van Bokhoven, H., Riazuddin, S., & Riazuddin, S. (2019). Bi-allelic Variants in METTL5 Cause Autosomal-Recessive Intellectual Disability and Microcephaly. *The American Journal of Human Genetics*, 105(4), 869–878.
- Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1412–1417.
- Schubert, H. L., Blumenthal, R. M., & Cheng, X. (2003). Many paths to methyltransfer: A chronicle of convergence. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(6), 329–335.
- Sloan, K. E., Warda, A. S., Sharma, S., Entian, K.-D., Lafontaine, D. L. J., & Bohnsack, M. T. (2017). Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biology*, 14(9), 1138–1152.
- Sornjai, W., Lithanatudom, P., Erales, J., Joly, P., Francina, A., Hacot, S., Fucharoen, S., Svasti, S., Diaz, J. J., Mertani, H. C., & Smith, D. R. (2017). Hypermethylation of 28S ribosomal RNA in β -thalassemia trait carriers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 728–734.
- Sun, Q., Huang, M., & Wei, Y. (2021). Diversity of the reaction mechanisms of SAM-dependent enzymes. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(3), 632–650.
- Sun, T., Wu, R., & Ming, L. (2019). The role of m6A RNA methylation in cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112, 108613.
- Zhou, Y., Kong, Y., Fan, W., Tao, T., Xiao, Q., Li, N., & Zhu, X. (2020). Principles of RNA methylation and their implications for biology and medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110731.
- Zorbas, C., Nicolas, E., Wacheul, L., Huvelle, E., Heurgué-Hamard, V., & Lafontaine, D. L. J. (2015). The human 18S rRNA base methyltransferases DIMT1L and WBSCR22-TRMT112 but not rRNA modification are required for ribosome biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 26(11), 2080–2095.

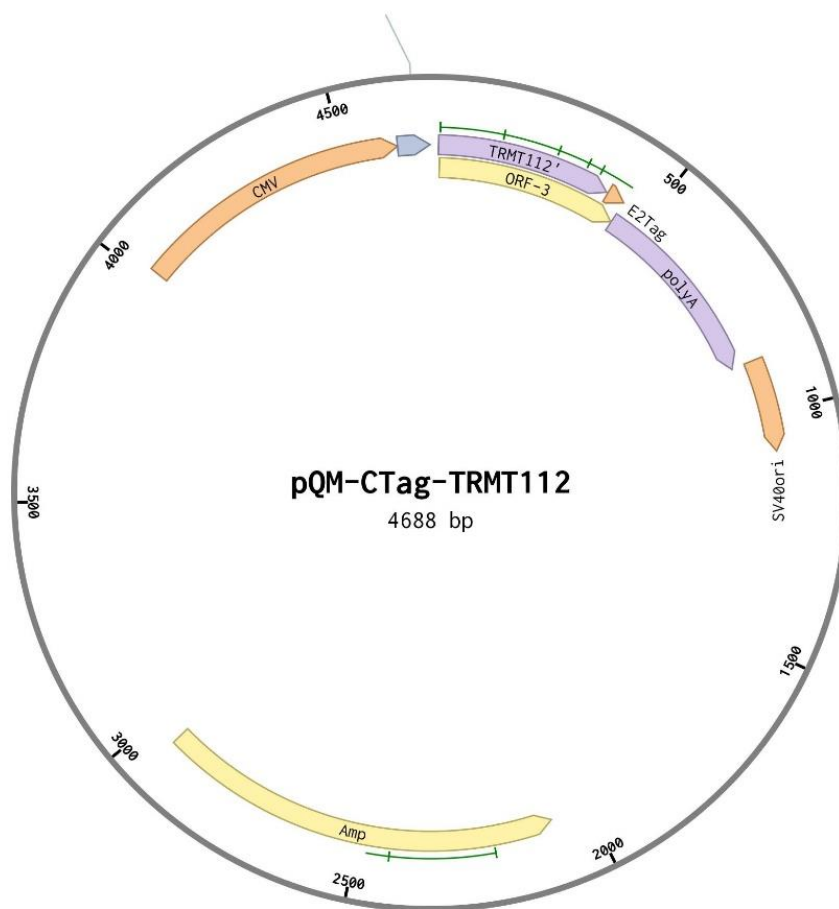
- Tewary, S. K., Zheng, Y. G., & Ho, M.-C. (2019). Protein arginine methyltransferases: Insights into the enzyme structure and mechanism at the atomic level. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(15), 2917–2932.
- van Tran, N., Ernst, F. G. M., Hawley, B. R., Zorbas, C., Ulryck, N., Hackert, P., Bohnsack, K. E., Bohnsack, M. T., Jaffrey, S. R., Graille, M., & Lafontaine, D. L. J. (2019). The human 18S rRNA m6A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112. *Nucleic Acids Research*, 47(15), 7719–7733.
- van Tran, N., Muller, L., Ross, R. L., Lestini, R., L  toquart, J., Ulryck, N., Limbach, P. A., de Cr  cy-Lagard, V., Cianf  rani, S., & Graille, M. (2018). Evolutionary insights into Trm112-methyltransferase holoenzymes involved in translation between archaea and eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 46(16), 8483–8499.
- Varland, S., Osberg, C., & Arnesen, T. (2015). N-terminal modifications of cellular proteins: The enzymes involved, their substrate specificities and biological effects. *PROTEOMICS*, 15(14), 2385–2401.
- Walker, J. M., & Rapley, R. (Toim). (2008). *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press.
- Wiener, D., & Schwartz, S. (2021). The epitranscriptome beyond m6A. *Nature Reviews Genetics*, 22(2), 119–131.
- Woodcock, C. B., Yu, D., Zhang, X., & Cheng, X. (2019). Human HemK2/KMT9/N6AMT1 is an active protein methyltransferase, but does not act on DNA in vitro, in the presence of Trm112. *Cell Discovery*, 5(1), 50.
- Wu, Q., Schapira, M., Arrowsmith, C. H., & Barsyte-Lovejoy, D. (2021). Protein arginine methylation: From enigmatic functions to therapeutic targeting. *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Wu, T. P., Wang, T., Seetin, M. G., Lai, Y., Zhu, S., Lin, K., Liu, Y., Byrum, S. D., Mackintosh, S. G., Zhong, M., Tackett, A., Wang, G., Hon, L. S., Fang, G., Swenberg, J. A., & Xiao, A. Z. (2016). DNA methylation on N6-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature*, 532(7599), 329–333.
-   unap, K., K  sper, L., Kurg, A., & Kurg, R. (2013). The Human WBSCR22 Protein Is Involved in the Biogenesis of the 40S Ribosomal Subunits in Mammalian Cells. *PLoS ONE*, 8(9), e75686.

Õunap, K., Leetsi, L., Matsoo, M., & Kurg, R. (2015). The Stability of Ribosome Biogenesis Factor WBSCR22 Is Regulated by Interaction with TRMT112 via Ubiquitin-Proteasome Pathway. *PloS One*, 10(7), e0133841–e0133841.

Xiao, C.-L., Zhu, S., He, M., Chen, D., Zhang, Q., Chen, Y., Yu, G., Liu, J., Xie, S.-Q., Luo, F., Liang, Z., Wang, D.-P., Bo, X.-C., Gu, X.-F., Wang, K., & Yan, G.-R. (2018). N6-Methyladenine DNA Modification in the Human Genome. *Molecular Cell*, 71(2), 306-318.e7.

Lisad

Lisa 1. pQM-TRMT112-E2Tag plasmiid



LIHTLITSENTS

Lihthitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Robert Johannes Sarap (sünnikuupäev: 21.07.1999),

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihthitsentsi) minu loodud teose „Metüültransferaaside ko-faktori TRMT112 mutatsioonanalüüs“, mille juhendaja on Margit Mutso, PhD ja mille kaasjuhendaja on Reet Kurg, PhD,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

1. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihthitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Robert Johannes Sarap

29.05.2021