

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

EGLĖ JAKUBAUSKIENĖ

**PRE-irNR SPLAISINGAS:
MONOAMINOOKSIDAZĖS B IR NUO
DEGUONIES KIEKIO PRIKLAUSOMŲ GENŲ
RAIŠKOS REGULIACIJA**

Daktaro disertacija
Technologijos mokslai, chemijos inžinerija (05T)

2017, Kaunas

Disertacija rengta 2001–2005, 2016–2017 metais Kauno technologijos universiteto Cheminės technologijos fakulteto Organinės chemijos katedroje ir 2010–2016 metais Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba ir Europos Sąjungos 7-osios bendrosios programos projektas.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas:

Dr. Arvydas Kanopka (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija, 01B).

Interneto svetainės, kurioje skelbiama disertacija, adresas:

<http://ktu.edu>

Redagavo:

Inga Nanartonytė (leidykla „Technologija“)

© E. Jakubauskienė, 2017

ISBN 978-609-02-1311-7

Leidinio bibliografinė informacija pateikiama Lietuvos nacionalinės Martyno Mažvydo bibliotekos Nacionalinės bibliografijos duomenų banke (NBDB)

TURINYS

SANTRUMPOS	5
ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1. Pre-iRNR splaisingas eukariotinėje ląstelėje	10
1.1.1. Pre-iRNR splaisingas	10
1.1.2. Reguluojamam pre-iRNR splaisingui svarbios sekos.....	10
1.1.3. Pagrindiniai reguliuojamo pre-iRNR splaisingo veiksniai	11
1.1.4. Pre-iRNR splaisingo mechanizmas	15
1.1.5. Splaisosomos U2 ir U12.....	16
1.1.6. Alternatyvusis pre-iRNR splaisingas.....	18
1.1.7. Alternatyvusis pre-iRNR splaisingas ir su juo susijusios ligos	20
1.2. Žmogaus monoaminooksidazė B ir jos įtaka Parkinsono ligai	22
1.2.1. Monoaminooksidazės ir jų reikšmė	22
1.2.2. Monoaminooksidazės B struktūra	23
1.2.3. Biogeninių aminų metabolizmas	23
1.2.4. Monoaminooksidazės B polimorfizmai ir Parkinsono liga	26
1.3. Hipoksija: hipoksijos indukuojami veiksniai (HIF) ir jų sąsajos su ligomis žmogaus organizme	27
1.3.1. Hipoksija ir jos reikšmė.....	27
1.3.2. Hipoksijos indukuojami veiksniai (HIF)	28
1.3.3. Hipoksijos indukuojamo veiksnio 1 (HIF-1) reguliacija ląstelėje	33
1.3.4. Hipoksijos veikiama genų raiška, pre-iRNR splaisingas ir ligos.....	35
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI	38
2.1. Medžiagos.....	38
2.1.1. Reagentai	38
2.1.2. Tirpalai	39
2.1.3. Rinkiniai	42
2.1.4. Plazmidinė DNR ir oligonukleotidai DNR amplifikacijai PGR metodu	42
2.1.5. Monokloniniai ir polikloniniai antikūnai.....	43
2.1.6. Ląstelių linijos ir mikroorganizmų kamienai.....	43
2.1.7. Molekulinės masės standartai.....	43
2.1.8. Fermentai.....	44
2.1.9. Bioinformatinė programa	44
2.2. Metodai	44
2.2.1. DNR ir RNR tyrimo metodai	44
2.2.2. Baltymų tyrimo metodai.....	48
2.2.3. Eukariotinių ląstelių kultivavimas ir tyrimo metodai	50
3. TYRIMŲ REZULTATAI	54
3.1. Trumpas mokslinio darbo apibūdinimas.....	54
3.2. Vieno nukleotido polimorfizmo, esančio <i>MAO-B</i> geno nekoduojančioje sekoje, įtaka pre-iRNR splaisingui	54
3.2.1. <i>MAO-B</i> geno 13-ame introne esančio vieno nukleotido polimorfizmo įtakos pre-iRNR splaisingui tyrimai.....	55
3.2.2. Rezultatų, gautų tiriant vieno nukleotido polimorfizmo įtaką pre-iRNR splaisingui, apibūdinimas	61
3.3. Nuo hipoksijos priklausomas alternatyvusis HIF-3 pre-iRNR splaisingas ir jo reguliacija eukariotinėse ląstelėse	62

3.3.1. Deguonies kiekio aplinkoje reguliuojamo alternatyviojo pre-iRNR splaisingo tyrimai	62
3.3.2. Rezultatų, gautų tiriant nuo hipoksijos priklausomą alternatyvųjį HIF-3 pre-iRNR splaisingą, apibendrinimas.....	75
BENDROSIOS IŠVADOS	76
LITERATŪROS SĄRAŠAS	77
PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS	87

SANTRUMPOS

a. r. – aminorūgštis;

ARNT – aromatinių angliavandenilinių junginių receptoriaus branduolio translokacinis baltymas (angl. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*);

ATP – adenosin-5'-trifosfatas;

bHLH – spiralės-kilpos-spiralės motyvas;

bp – bazių pora;

CIAX – karboanhidrazė IX (angl. *carbonic anhydrase*);

Cyr61 – daug cisteino turintis angiogenezės aktyviklis 61(angl. *cysteine-rich angiogenic inducer 61*);

CLK – CLK/STY šeimos kinazės (angl. *cell division cycle (CDC) like kinases*);

C-TAD – transkripcijos aktyvacijos motyvas C-galinėje aminorūgščių sekoje;

Da – daltonas;

DA – dopaminas;

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

ESE – egzoninė splaisingo efektyvumą stimuliuojanti seka;

ESS – egzoninė splaisingo efektyvumą slopinanti seka;

FIH-1 – dioksigenazių šeimos baltymas;

HeLa – žmogaus gimdos kaklelio adenokarcinomos ląstelės;

HIF – hipoksijos indukuojami veiksniai;

HIF-1 – heterodimerinis baltymų kompleksas, sudarytas iš HIF-1 α ir HIF- β subvienetų;

HIF-2 – heterodimerinis baltymų kompleksas, sudarytas iš HIF-2 α ir HIF- β subvienetų;

HIF-3 – heterodimerinis baltymų kompleksas, sudarytas iš HIF-3 α ir HIF- β subvienetų;

HIF- α – hipoksijos indukuojamo veiksnio alfa subvienetas;

HIF- β – hipoksijos indukuojamo veiksnio beta subvienetas;

hnRNP – heterogeninės branduolio ribonukleobaltyminės dalelės;

HRE – atsako į hipoksiją seka;

IPAS – inhibitorinis PAS motyvą turintis baltymas (angl. *inibitory PAS domain containing protein*);

iRNR – informacinė RNR;

ISE – introninė splaisingo efektyvumą stimuliuojanti seka;

ISS – introninė splaisingo efektyvumą slopinanti seka;

Y – pirimidino nukleotidas;

MAO – monoaminooksidazė;

MAO-A – monoaminooksidazė A;

MAO-B – monoaminooksidazė B;

NE / NE_{norm} – branduolių ekstraktai, paruošti iš normaliomis deguonies sąlygomis augintų HeLa ląstelių;

NE_{hyp} – branduolių ekstraktai, paruošti iš hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių;

NEPAS – naujagimių ir embrioninis PAS motyvą turintis baltymas (angl. *neonatal and embryonic PAS protein*);
nt – nukleotidai (A – adenino, G – guanino, C – citozino, U – uracilo);
N-TAD – transkripcijos aktyvacijos motyvas N-galinėje aminorūgščių sekoje;
ODD – nuo deguonies priklausomas degradacijos motyvas;
PAS – Per-ARNT-Sim motyvas;
PGR – polimerazės grandininė reakcija;
PHD – prolihidroksilazės;
PL – Parkinsono liga;
pre-iRNR – informacinės ribonukleorūgšties (RNR) pirmtakė;
R – purino bazę turintis nukleotidas;
RNP – ribonukleobaltyminė dalelė;
RNR – ribonukleorūgštis;
RRM – RNR atpažinimo motyvas;
RRMH – RRM homologas;
RS – daug pasikartojančių arginino (R) ir serino (S) aminorūgščių liekanų turintis motyvas;
SF1 – splaisingo veiksnys 1;
SNP – vieno nukleotido polimorfizmas;
snRNP – maža branduolio ribonukleobaltyminė dalelė;
snRNR – maža branduolio ribonukleorūgštis;
SR – daug arginino / serino turintys baltymai (SRSF1, SRSF2 ir kt.);
SR_{np}x – SR baltymai, išgryninti iš hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių;
SR_{norm} – SR baltymai, išgryninti iš normaliomis deguonies sąlygomis augintų HeLa ląstelių;
SRPK – SR šeimos baltymų kinazės (angl. *serine-arginine protein kinases*);
U2AF – U2 snRNP pagalbinis veiksnys;
U2AF³⁵ – U2 snRNP pagalbinio veiksnio mažasis subvienetas;
U2AF⁶⁵ – U2 snRNP pagalbinio veiksnio didysis subvienetas;
VMAT – vezikulės monoamino nešiklis (angl. *vesicular monoamine transporter*).

ĮVADAS

Darbo aktualumas

Pastaraisiais dešimtmečiais vis didėja sergamumas įvairiomis ligomis, todėl kyla išsamios informacijos apie ląstelėje vykstančių biologinių procesų pokyčius poreikis. Siekdami išsiaiškinti ir pašalinti ligų vystymosi žmogaus organizme priežastis, daug pasaulio mokslininkų atlieka molekulinės ligų patogenezės tyrimus. Viena iš įvairių ligų atsiradimo priežasčių yra pakitęs pre-iRNR splaisingas. Ląstelės branduolyje vykstančio pre-iRNR splaisingo metu nekoduojančios pre-iRNR sekos yra pašalinamos, o baltymą koduojančios sekos sujungiamos. Šio proceso netikslumai nulemia pakitusių iRNR izoformų susidarymą ir genų raiškos pokyčius, siejamus su neurodegeneracinių, onkologinių, plaučių, širdies ir kraujagyslių ligų atsiradimu ir progresavimu. Todėl pre-iRNR splaisingo pokyčių ląstelėje tyrimai išlieka aktualūs, o atlikti darbai papildo žinias apie daugybės ligų vystymosi priežastis.

Šiame moksliniame darbe aprašomi du tyrimo objektai: *monoaminooksidazės B (MAO-B)* geno polimorfizmo, esančio nekoduojančioje sekoje, įtaka iRNR susidarymui ir nuo sumažėjusio deguonies kiekio aplinkoje priklausomų genų pre-iRNR splaisingas.

Lėtinė neurodegeneracinė Parkinsono liga (PL), atsirandanti 50–70 metų amžiuje, pasireiškia tam tikros smegenų srities (*substantia nigra*), kontroliuojančios valingus judesius, pakitimais. Viena iš šios ligos priežasčių yra *MAO-B* geno nekoduojančioje sekoje aptinkamas vieno nukleotido polimorfizmas – G nukleotido pakeitimas į A nukleotidą. Rengiant šį darbą atlikti tyrimai parodė, kad šis polimorfizmas lemia nekoduojančios sekos pašalinimo efektyvumą, nuo kurio priklauso susidariusios *MAO-B* iRNR kiekis ir baltymo raiška. Nustačius, kad sveikų ir Parkinsono liga sergančių žmonių kraujyje skiriasi *MAO-B* baltymo raiška, tokio pobūdžio tyrimai gali būti panaudojami diagnozuojant Parkinsono ligą. Atliktas darbas suteikia vertingos informacijos apie *MAO-B* geno nekoduojančioje sekoje esančio G/A polimorfizmo įtaką pre-iRNR splaisingui, kartu ir Parkinsono ligos patogenezei.

Daugybės ligų, pvz., infarkto, išeminės širdies ligos, periferinių ir koronarinių arterijų ligų, širdies nepakankamumo, anemijos, plaučių arterijos hipertenzijos, obstrukcinės miego apnėjos, eritrocitozės, onkologinių ligų, atsiradimas ir vystymasis susijęs su sumažėjusiu deguonies kiekiu ląstelėje. Deguonies trūkumas (hipoksija) stabilizuoja hipoksijos indukuojamus veiksnius (HIF), aktyvinančius genų, reikalingų ląstelei išgyventi hipoksinėmis sąlygomis, transkripciją. Ląstelei prisitaikant prie aplinkos pokyčių didelę reikšmę turi alternatyvusis pre-iRNR splaisingas, kurio metu nuo tos pačios pre-iRNR susidaro skirtingus baltymus koduojančios iRNR izoformos. Šių izoformų susidarymui įtakos turi pakitęs splaisingo veiksnių aktyvumas. Nustatyta, kad pakitusi ląstelės aplinka lemia pre-iRNR splaisingo pokyčius, tačiau šį procesą reguliuojantys veiksniai iki šiol nėra nustatyti. Todėl nuo deguonies kiekio aplinkoje priklausomo alternatyviojo pre-iRNR splaisingo ir jį reguliuojančių veiksnių tyrimai yra aktualūs siekiant

išsiaiškinti šio proceso pokyčių priežastis ir rasti būdų slopinti hipoksinėse ląstelėse pakitusių iRNR susidarymą, kartu lėtinant ligų vystymąsi.

Darbo tikslai ir uždaviniai

Šio darbo **tikslai**:

1. Ištirti *MAO-B* geno 13-o introno sekoje aptinkamo G/A polimorfizmo įtaką pre-iRNR splaisingui, nustatyti splaisingo reguliacijos procese dalyvaujančius veiksnius ir *MAO-B* baltymo raiškos lygio pokyčius Parkinsono liga sergančių ir sveikų žmonių kraujo trombocitų frakcijoje.

2. Nustatyti veiksnius, reguliuojančius nuo deguonies koncentracijos aplinkoje priklausomą alternatyvų pre-iRNR splaisingą, ir rasti būdų kontroliuoti nuo hipoksijos priklausomų alternatyvių pre-iRNR splaisingo taikinių pasirinkimą.

Pirmajam tikslui pasiekti buvo išskelti šie **uždaviniai**:

1. Nustatyti, ar *MAO-B* baltymo raiškos lygio pokyčiai Parkinsono liga sergančių ir sveikų asmenų kraujo trombocitų frakcijoje gali būti naudojami Parkinsono ligos diagnostikoje.

2. Išsiaiškinti G/A polimorfizmo, aptinkamo *MAO-B* geno 13-o introno sekoje, įtaką pre-iRNR splaisingui.

3. Nustatyti veiksnius, darančius įtaką *MAO-B* pre-iRNR splaisingui.

Antrajam tikslui pasiekti buvo suformuluoti šie **uždaviniai**:

1. Nustatyti veiksnius, darančius įtaką nuo deguonies kiekio aplinkoje priklausomam splaisingui, kaip modelinę sistemą naudojant pelės HIF-3 α pre-iRNR.

2. Išsiaiškinti, kas lemia veiksnių, reguliuojančių nuo hipoksijos priklausomą pre-iRNR splaisingą, pokyčius.

3. Patvirtinti gautus *in vitro* splaisingo reguliavimo rezultatus ląstelėse, naudojant endogenines pre-iRNR, kurių alternatyvūs pre-iRNR splaisingas priklauso nuo hipoksijos.

Darbo mokslinis naujumas ir praktinė vertė

Disertacinis darbas sudarytas iš dviejų dalių, kuriose tyrinėjamos konstitutinio ir alternatyvio pre-iRNR splaisingo pokyčių priežastys ir jų sąsajos su žmogaus ligomis.

Pirmoje dalyje atlikti išsamūs vieno nukleotido polimorfizmo, esančio *MAO-B* geno nekoduojančioje sekoje, įtakos pre-iRNR splaisingui tyrimai. Duomenų apie tokius tyrimus literatūroje skelbta nebuvo. Pirmą kartą eksperimentais parodyta, kad G/A polimorfizmas 13-o introno sekoje nulemia nekoduojančios sekos pašalinimo iš *MAO-B* pre-iRNR efektyvumą ir kartu reguliuoja *MAO-B* iRNR susidarymo greitį. Pademonstruota, kad itin svarbias funkcijas pre-iRNR splaisingo procese atliekanti SR baltymų šeima skirtingai sąveikauja su laukinio tipo („G“ alelis) ir mutuota („A“ alelis) *MAO-B* geno 13-o introno seka. Ištirta, kad SR šeimos baltymai, stipriau sąveikaujantys su mutuota *MAO-B* geno 13-o introno seka, lemia padidėjusį splaisosomos komplekso susidarymo greitį, o tai daro įtaką nekoduojančios sekos pašalinimui iš pre-iRNR. Gauti nauji duomenys leidžia paaiškinti padidėjusios *MAO-B* raiškos Parkinsono ligos atveju priežastis, o šio baltymo raiškos pokyčiai gali būti panaudojami kaip Parkinsono ligos žymuo.

Antroje mokslinio darbo dalyje išsamiai apibūdinti nuo hipoksijos priklausomo alternatyviojo pre-iRNR splaisingo ir šį procesą reguliuojančių veiksnių tyrimai. Splaisingo tyrimuose *in vitro* kaip modelinė sistema naudota pelės HIF-3 α pre-iRNR. Pademonstruota, kad hipoksinėse (1 % O₂) ląstelėse SR šeimos baltymų aktyvumai skiriasi nuo šių baltymų aktyvumų normaliomis deguonies (21 % O₂) sąlygomis kultivuotose ląstelėse. Atlikus nuodugnius SR šeimos baltymų, išskirtų iš normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis augintų ląstelių, tyrimus, buvo nustatyta, kad aktyvumų skirtumus lemia skirtingi šių baltymų modifikacijos lygiai. Pirmą kartą buvo parodyta, kad padidėjusį SR baltymų fosforilinimą hipoksinėse ląstelėse lemia padidėjusi specifinių SR šeimos baltymų kinazių (SRPK1, SRPK2 ir CLK1) raiška. Padidėjusią kinazės CLK1 raišką lemia hipoksijos indukuojamas transkripcijos veiksnys HIF-1, aktyvuojantis šio geno transkripciją hipoksinėse ląstelėse. *In vitro* sistemoje gauti rezultatai patvirtinti eksperimentais ląstelėse, naudojant endogenines pre-iRNR, kurių alternatyvusis splaisingas reguliuojamas priklausomai nuo deguonies kiekio aplinkoje. Rengiant šį darbą atlikti tyrimai yra itin vertingi siekiant išsiaiškinti hipoksinėse ląstelėse vykstančių procesų priežastis, o gauti rezultatai suteikia galimybę reguliuoti nuo hipoksijos priklausomą pre-iRNR splaisingą. Remiantis šiais naujais duomenimis, galima slopinti hipoksinėse ląstelėse pakitusių iRNR susidarymą, užkertant kelią ligų vystymuisi žmogaus organizme.

Pirmosios darbo dalies ginamieji teiginiai

1. MAO-B baltymo raiškos lygio pokytis Parkinsono liga sergančių ir sveikų asmenų kraujo trombocitų frakcijoje gali būti naudojamas kaip naujas žymuo diagnozuojant Parkinsono ligą.
2. MAO-B geno 13-o introno sekoje esantis G/A polimorfizmas daro įtaką pre-iRNR splaisingui.
3. Vieni iš MAO-B raiškos reguliatorių yra splaisingo veiksnių grupė – SR šeimos baltymai.

Antrosios darbo dalies ginamieji teiginiai

1. Deguonies kiekio aplinkoje pokyčiai lemia pakitusį vienų iš splaisingo veiksnių – SR šeimos baltymų aktyvumą.
2. Skirtingą SR šeimos baltymų aktyvumą hipoksinėse ląstelėse lemia pakitusi šių baltymų RS motyvų modifikacija.
3. Skirtingus SR baltymų modifikacijos lygius lemia specifinių SR baltymų kinazių raiška.
4. CLK1 raiškos sumažinimas keičia nuo hipoksijos priklausomą alternatyvųjį pre-iRNR splaisingą ląstelėse.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Pre-iRNR splaisingas eukariotinėje ląstelėje

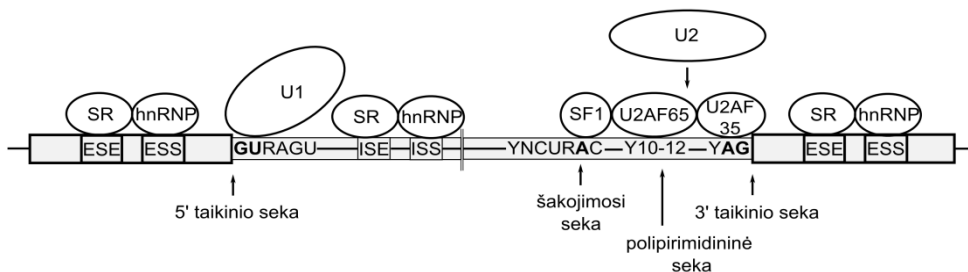
1.1.1. Pre-iRNR splaisingas

Dauguma eukariotų genų sudaryti iš koduojančių sekų, vadinamų egzonais, ir nekoduojančių sekų – intronų. Procesas, vykstantis eukariotinės ląstelės branduolyje, kurio metu iš pre-iRNR pašalinamos introninės sekos, o egzoninės sekos sujungiamos, vadinamas pre-iRNR splaisingu. Tai labai tikslus procesas, nuo kurio priklauso ląstelėje susintetintų baltymų funkcionalumas. Intronų pašalinimo ir egzonų sujungimo netikslumai nulemia iRNR izoformų susidarymą, taip pat genų raiškos pasikeitimus ir sukelia įvairius sutrikimus žmogaus organizme. Remiantis literatūros duomenimis, maždaug 20 % genetinių ligų priežastis – mutacijos splaisingo taikinių sekose, lemiančios introninių sekų pašalinimo netikslumus (Cologne *et al*, 2014; Fedor, 2008).

Skiriami du pre-iRNR splaisingo būdai: savaiminis ir reguliuojamas. Savaiminio splaisingo metu nekoduojančių sekų pašalinimą katalizuoja tos pačios RNR molekulės. Šis procesas vyksta eubakterijose, archėjose, žemesniųjų eukariotų branduoliuose ir žemesniųjų bei aukštesniųjų eukariotų organelėse (Saldanha *et al*, 1993). Manoma, kad evoliucionuojant gyvybei iš savaiminio splaisingo išsivystė reguliuojamas pre-iRNR splaisingas, vykstantis aukštesniųjų eukariotų branduoliuose ir katalizuojamas dinamiško ribonukleobaltyminio komplekso – splaisosomos (Rogozin *et al*, 2012).

1.1.2. Reguliuojamam pre-iRNR splaisingui svarbios sekos

Tikslus introninių sekų pašalinimas priklauso nuo pre-iRNR splaisingo procese dalyvaujančių veiksnių, kuriuos galima suskirstyti į *cis* ir *trans* elementus (1.1 pav.).



1.1 pav. Pre-iRNR splaisingui svarbios sekos ir splaisingo procese dalyvaujantys pagrindiniai veiksniai. ESE / ISE ir ESS / ISS – atitinkamai egzoninės / introninės splaisingo efektyvumą stimuliuojančios ir slopinančios sekos; A – šakojimosi taško adenozino nukleotidas; SR, hnRNP, U2AF65 ir U2AF35, SF1 – splaisingo veiksniai; U1, U2 – mažos branduolio ribonukleobaltyminės dalelės

Prie *cis* elementų priskiriamos pre-iRNR svarbios sekos:

1. Trumpos ir konservatyvios sekos, esančios egzono ir introno sandūros srityse. Aukštesniuose eukariotuose šios sekos apibrėžiamos konservatyviais nukleotidais: 5' splaisingo taikinio seka – AG/GURAGU ir 3' splaisingo taikinio seka – YAG/G (kur „/“ – egzono ir introno sandūra, R – purino nukleotidas, Y – pirimidino nukleotidas).

2. Šakojimosi taško YNCRAC seka (kur N – bet koks nukleotidas, A – šakojimosi taško adenozino nukleotidas), esanti maždaug 18–40 nukleotidų nuo 3' splaisingo taikinio sekos.

3. Polipirimidininė seka, turinti daug U ir (ar) C nukleotidų, kuri yra tarp šakojimosi taško ir 3' splaisingo taikinio sekų.

4. Egzonuose / intronuose esančios trumpos (dažniausiai 6–18 nt ilgio) egzoniškos / introniškos splaisingo efektyvumą stimuliuojančios sekos (angl. *exonic / intronic splicing enhancer* – ESE / ISE) bei egzoniškos / introniškos splaisingo efektyvumą slopinančios sekos (angl. *exonic / intronic splicing silencer* – ESS / ISS). Su šiomis sekomis sąveikauja splaisingo veiksniai, pvz., daug serino / arginino C-galinėje srityje turinti SR baltymų šeima, heterogeninės branduolio ribonukleobaltyminės hnRNP dalelės ir kt. Nustatyta, kad SR ir hnRNP splaisingo veiksniai dėl sąveikos su RNR sekomis konkuruoja tarpusavyje. Nuo šių veiksmų ir *cis* elementų sąveikos priklauso splaisingo taikinių pasirinkimas. ESE sekos dažniausiai turi daug AG ir AC nukleotidų, o ISE sekoms yra būdingas G nukleotidų tripletas. Su šiomis ESE ir ISE sekomis sąveikaujantys SR baltymai žinomi kaip teigiami splaisingo reguliatoriai, aktyvuojantys splaisingo taikinių pasirinkimą. Su ESS ir ISS sekomis, turinčiomis daug CA nukleotidų, sąveikaujančios hnRNP dalelės veikia kaip neigiami splaisingo reguliatoriai, slopinantys splaisingo taikinių panaudojimą (Akerman *et al*, 2015; Wang, Burge, 2008; Wang *et al*, 2004).

1.1.3. Pagrindiniai reguliuojamo pre-iRNR splaisingo veiksniai

Prie *trans* elementų priskiriamos mažos branduolio ribonukleobaltyminės dalelės (snRNP) ir splaisingo veiksniai, atliekantys svarbias funkcijas reguliuojant splaisingo taikinių pasirinkimą. (Faustino, Cooper, 2003; Mcmanus, Graveley, 2011; Nilsen, Graveley, 2010). Pagrindiniai iš jų (1.1 pav.):

1. Heterodimerinis U2 snRNP pagalbinis veiksnys U2AF (angl. *U2 snRNP auxiliary factor*) sudarytas iš didžiojo 65 kDa ir mažojo 35 kDa subvienetų (atitinkamai U2AF⁶⁵ ir U2AF³⁵). U2AF heterodimeras dalyvauja ankstyvojo splaisosomos komplekso susidarymo procese: U2AF⁶⁵ sąveikauja su polipirimidinine seka, o U2AF³⁵ – su 3' splaisingo taikinio sekos AG dinukleotidu ir padeda stabilizuoti U2AF⁶⁵ sąveiką su polipirimidinine seka.

2. Splaisingo veiksnys SF1 jungiasi prie šakojimosi taško sekos, sąveikauja su U2AF⁶⁵ ir stabilizuoja didžiojo U2AF subvieneto sąveiką su polipirimidinine seka. SF1 ir U2AF⁶⁵ lemia tikslią U2 snRNP sąveiką su šakojimosi taško seka (Zhang *et al*, 2013).

3. Heterogeninės branduolio ribonukleobaltyminės hnRNP dalelės jungiasi prie ESS / ISS sekų ir reguliuoja splaisingo taikinių pasirinkimą. Taip pat hnRNP dalyvauja iRNR pernešimo į translacijos vietas, iRNR translacijos ir stabilumo

reguliacijos procesuose. Šiuo metu yra žinoma mažiausiai 20 šios šeimos baltymų (Geuens *et al.*, 2016).

4. Pre-iRNR splaisingo procese dalyvauja viena svarbiausių *trans* splaisingo veiksmų grupė – SR baltymų šeima, kuri randama visuose eukariotiniuose organizmuose, išskyrus *Saccharomyces cerevisiae*. Šiuo metu žmogaus ląstelėje nustatyta 12 SR šeimai priklausančių baltymų: SFRS1 (ASF / SF2, SRp30a), SFRS2 (SC35, SRp30b), SFRS3 (SRp20), SFRS4 (SRp75), SFRS5 (SRp40), SFRS6 (SRp55), SFRS7 (9G8), SFRS8 (žmogaus SRp46), SFRS9 (SRp30c), SFRS10 (SRp38, SRp40, TASR1), SFRS11 (SRp54, p54) ir SFRS12 (SRp35). Visiems SR šeimos baltymams būdinga panaši struktūra (1.2 pav.). N-galinėje aminorūgščių liekanų sekoje šie baltymai turi vieną ar du RNR atpažinimo motyvus (angl. *RNA recognition motif* – RRM ir RRM homologų – RRMH), reikalingus sąveikai su pre-iRNR. C-galinėje šių baltymų srityje yra iš pasikartojančių arginino (R) ir serino (S) aminorūgščių liekanų sudarytas kintamo ilgio RS motyvas, per kurį vyksta sąveika su kitais splaisingo veiksniais (Manley, Krainer, 2010).

Genų pavadinimai	Kiti pavadinimai	Struktūra
SFRS1	SF2/ASF SRp30a SC35	RRM RRMH RS
SFRS2	PR264 SRp30b	RRM RS
SFRS3	SRp20	RRM RS
SFRS4	SRp75	RRM RRMH RS
SFRS5	SRp40 HRS	RRM RRMH RS
SFRS6	SRp55 B52	RRM RRMH RS
SFRS7	9G8	RRM ZnF RS
SFRS8	SRp46	RRM RS
SFRS9	SRp30c	RRM RRMH RS
SFRS10	SRp38 SRp40	RRM RS
SFRS11	TASR1 SRp54 p54	RRM RS
SFRS12	SRp35	RRM RS

1.2 pav. SR baltymų šeimos struktūra. RS – daug arginino / serino aminorūgščių liekanų turinti baltymo sritis; RRM – RNR atpažinimo motyvas; RRMH – RRM homologas; ZnF – cinko pirštų (angl. *zinc finger*) motyvas, reikalingas sąveikai su RNR

SR šeimos baltymai atlieka įvairias funkcijas konstitutyviojo ir alternatyviojo pre-iRNR splaisingo procese (Graveley, 2000):

- sąveikauja su ESE / ISE sekomis, padeda mažai branduolio ribonukleobaltyminei U1 snRNP dalelei prisijungti prie 5' splaisingo taikinio sekos ir stabilizuoja šią sąveiką aktyvindami pre-iRNR splaisingą;
- sąveikauja su U2AF 35 kDa subvienetu pritraukdami U2AF 65 kDa subvienetą prie polipirimidinės sekos ir stabilizuoja šią sąveiką palengvindami splaisosomos susirinkimą;
- suartina 5' ir 3' splaisingo taikinių sekas;
- padeda U5 / U4 / U6 tri-snRNP dalelei prisijungti prie pre-iRNR;
- konkuruoja su hnRNP dalelėmis dėl sąveikos su pre-iRNR, taip reguliuodami splaisingo taikinių pasirinkimą (Anko, 2014);
- sąveikauja su ISS sekomis ir trukdo formuotis splaisosomos kompleksui, taip slopindami iRNR susidarymą (Shepard, Hertel, 2009);
- dalyvauja iRNR pernašos iš branduolio procese (SFRS1, SFRS3 ir SFRS7);
- SFRS1, SFRS3 ir SFRS7 nustatyti transliacijos komplekso sudėtyje, tačiau konkreti jų funkcija transliacijos procese nėra aiški;
- SFRS1, SFRS2, SFRS5 ir SFRS6 dalyvauja beprasmės (angl. *non-sense*) RNR degradacijos procese (Long, Caceres, 2009).

SR šeimos baltymų, kontroliuojančių konstitutyvųjų ir alternatyvųjų pre-iRNR splaisingą ląstelėse, aktyvumas yra reguliuojamas priklausomai nuo RS motyve esančių serino aminorūgščių liekanų fosforilinimo lygio. RS motyvo fosforilinimo lygis priklauso nuo ląstelių ciklo ir aplinkos sąlygų (Anko, 2014).

SR šeimos baltymų RS motyvo fosforilinimas yra svarbus veiksnys baltymo ir baltymo, baltymo ir RNR sąveikoms, SR šeimos baltymų lokalizacijai ląstelėje ir iRNR pernašai. SR šeimos baltymų RS motyvo fosforilinimas stimuliuoja ankstyvojo splaisosomos komplekso susirinkimą, o šio motyvo defosforilinimas reikalingas splaisingo reakcijos katalizei. Dinamiškas fosforilinimo ir defosforilinimo ciklas reguliuoja SR baltymų funkcijas, nuo kurių priklauso aktyviosios splaisosomos susidarymas, lemiantis pre-iRNR splaisingo eigą (Howard, Sanford, 2015; Thapar, 2015). Nustatyta, kad alternatyviojo pre-iRNR splaisingo metu SR baltymų RS motyve esančių serino aminorūgščių liekanų fosforilinimo lygis daro įtaką alternatyvių 3' ir 5' taikinio sekų pasirinkimui (Lee, Rio, 2015; Pal *et al.*, 2012).

Eukariotinėje ląstelėje SR šeimos baltymų fosforilinimą katalizuoja specifinės baltymų kinazės, kurios kontroliuoja SR šeimos baltymų lokalizaciją ir aktyvumą. Skiriamos dvi specifinės kinazių šeimos, fosforilinančios serino aminorūgščių liekanas RS motyve (Naro, Sette, 2013):

1. SR šeimos baltymų kinazės (angl. *serine-arginine protein kinases* – SRPK): SRPK1, SRPK2 ir SRPK3, randamos visose eukariotinėse ląstelėse, taip pat augaluose. SRPK1 yra nuolat sintetinamas ląstelėje, o jo homologai SRPK2 ir SRPK3 daugiausia randami atitinkamai nervų sistemos ir raumenų ląstelėse. Tai parodo, kad atskiri SRPK šeimos nariai skirtingų tipų ląstelėse turi unikalias funkcijas.

2. CLK/STY šeimos kinazės (angl. *cell division cycle (CDC) like kinases* – CLK): CLK1, CLK2, CLK3 ir CLK4, kurių raiška panaši visose eukariotinėse ląstelėse.

Pagrindinis skirtumas tarp SRPK ir CLK kinazių šeimų yra jų lokalizacija ląstelėje: SRPK šeimos narių randama citoplazmoje ir branduolyje, o CLK – tik branduolyje. Skirtinga lokalizacija rodo, kad viena kitą pakeisdamos abi kinazių šeimos dalyvauja fosforilinant SR baltymų RS motyvus, t. y. SRPK kinazės fosforilina serino aminorūgščių liekanas citoplazmoje, o CLK tęsia fosforilinimo procesą branduolyje (Zhou, Fu, 2013). Pavyzdžiui, SRPK1 kinazė fosforilina SFRS1 baltymo C-galinėje sekoje esantį RS motyvą ir tai palengvina šio baltymo pernašą į branduolį. Branduolyje CLK šeimos kinazės toliau fosforilina SFRS1 baltymo RS motyvą. Taip pat yra žinoma, kad SR šeimos baltymų lokalizacija kinta priklausomai nuo ląstelės ciklo. Pavyzdžiui, ląstelės interfazės metu SR baltymai kaupiasi branduolio taškeliuose (angl. *nuclear speckles*), jai pasibaigus, šie baltymai pritraukiami į aktyvias transkripcijos vietas – jose vyksta pre-iRNR splaisingas.

Nustatyta, kad SRPK ir CLK kinazių šeimos turi skirtingus specifiskumus substratui. SRPK kinazės fosforilina baltymo RS motyve esančias serino aminorūgščių liekanas, o CLK kinazės turi platesnį specifiskumą: fosforilina serino / lizino arba serino / prolino aminorūgščių liekanas.

RS domeno fosforilinimo lygis yra svarbus veiksnys pre-iRNR splaisingo reguliacijai. Parodyta, kad atskirai šios kinazės gali skirtingai reguliuoti splaisingą. Pavyzdžiui, kraujagyslių endotelio augimo veiksnys VEGFA, stimuliuojantis kraujagyslių augimą ir angiogenezę, turi dvi alternatyvias 8-o egzono 3' taikinių sekas ir skirtingas šių sekų panaudojimas lemia skirtingų VEGFA izoformų susidarymą: artimesnės 3' taikinio sekos pasirinkimas sudaro proangiogeninę VEGFA_{xxx} izoformą, o tolimesnės 3' taikinio sekos pasirinkimas sudaro antiangiogeninę VEGFA_{xxxb} izoformą. Šių skirtingų izoformų susidarymas priklauso nuo SRPK ir CLK kinazių. SRPK kinazės raiškos ląstelėje padidėjimas lemia angiogenezę skatinančios VEGFA_{xxx} iRNR izoformos susidarymą, o CLK raiškos padidėjimas skatina angiogenezę slopinančios VEGFA_{xxxb} iRNR izoformos formavimąsi (Nowak *et al*, 2008; Oltean *et al*, 2012).

Pre-iRNR splaisingą reguliuojančių specifinių SR šeimos baltymų kinazių aktyvumo, SR šeimos baltymų RS motyvo fosforilinimo ir raiškos pokyčiai stimuliuoja ląstelės atsparumą apoptozei, ląstelės proliferacijai ir migracijai, o tai siejama su onkologinių ir įvairių kitų ligų atsiradimu ir vystymusi žmogaus organizme. Padidėjusi SRPK1 ir SRPK2 raiška randama įvairiuose vėžio tipuose, pvz., krūties, žarnos, kasos, leukemijos ir plaučių karcinomose, o padidėjusi SRPK1 raiška krūties ir žarnos vėžio atveju koreliuoja su naviko stadijomis (Da Silva *et al*, 2015). SR baltymų sąveikos su RNR pokyčiai susidarant pakitusioms iRNR izoformoms gali būti labai svarbūs veiksniai reguliuojant onkogenų ar vėžio supresorinių genų raišką (Naro, Sette, 2013).

SR šeimos baltymų aktyvumai reguliuojami ne tik fosforilinimu, bet ir kitomis potransliacinėmis modifikacijomis: metilinimu ir acetilinimu. Šių modifikacijų įtaka pre-iRNR splaisingui nėra itin gerai ištyrinėta. Pavyzdžiui, nustatyta, kad SFRS1 baltymo trys arginino aminorūgščių liekanos metilinamos ir ši modifikacija

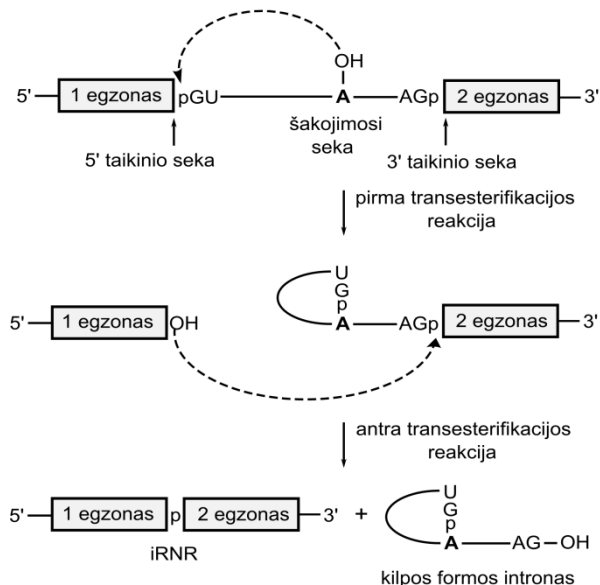
kontroliuoja baltymo lokalizaciją ląstelėje: metilintas SFRS1 dalyvauja pernašos į branduolį procese; slopinant metilinimą sumažėja šio baltymo kiekis branduolyje; padidėjęs SFRS1 kiekis citoplazmoje stimuliuoja transliaciją (Sinha *et al*, 2010). Kitas pavyzdys – SFRS2 baltymo vienos lizino aminorūgščių liekanos acetilinimas, skatinantis SFRS2 baltymo degradaciją (Edmond *et al*, 2011).

1.1.4. Pre-iRNR splaisingo mechanizmas

Intronai iš pre-iRNR pašalinami vykstant dviejų stadijų transesterifikacijos reakcijoms (1.3 pav.):

1. Pirmosios reakcijos metu introne esančio šakojimosi sekos adenozino nukleotido ribozės 2'-OH grupė veikia kaip nukleofilas ir atakuoja tarp pirmojo egzono ir introno esančią 5' taikinio sekos fosfatinę grupę. 3',5'-fosfodiesterinis ryšys tarp egzono 3'-galinės sekos ir introno 5'-galinės sekos nutrūksta susidarant 5' egzonui su 3'-galinėje sekoje esančia guanozino nukleotido laisva ribozės 3'-OH grupe ir tarpinei kilpos formos struktūrai – 3' egzonui su prijungta intronine seka, kurios 5'-galinė seka 5',2'-fosfodiesteriniu ryšiu sujungta su šakojimosi sekoje esančiu adenozinu.

2. Antrosios transesterifikacijos reakcijos metu pirmojo 5' egzono 3'-galinėje sekoje esančio guanozino nukleotido ribozės 3'-OH grupė atakuoja tarp introno ir antrojo egzono esančią 3' taikinio sekos fosfatinę grupę. Nutrūkus 3',5'-fosfodiesteriniam ryšiui tarp antrojo egzono 5'-galinės sekos ir introno 3'-galinės sekos, susidaro sujungti 5' ir 3' egzonai – susiformavusi iRNR, o kilpos formos intronas su 3'-OH grupe atpalaiduojamas (Wimalasena, 2011).



1.3 pav. Pre-iRNR splaisingo mechanizmas. Linija žymi introninę seką; p – fosfatinę grupę 5' ir 3' taikinio sekose

1.1.5. Splaisosomos U2 ir U12

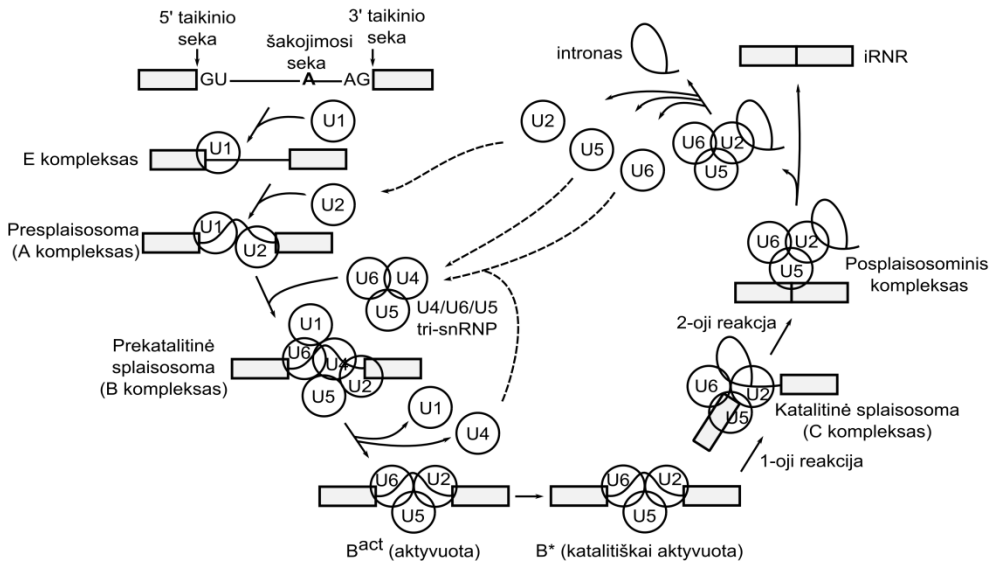
Eukariotinės ląstelės branduolyje intronų pašalinimas katalizuojamas didelio ir dinamiško ribonukleobaltyminio komplekso – splaisosomos (Wahl *et al*, 2009) bei papildomų baltymų, kurie, priklausomai nuo splaisosomos formavimosi etapų, varijuoja nuo 150 iki 300 (Rappsilber *et al*, 2002).

Daugumoje eukariotų koegzistuoja dviejų tipų unikalios splaisosomos – U2 ir U12. U2 yra vadinama pagrindine splaisosoma ir katalizuoja didžiosios daugumos eukariotinių organizmų U2 tipo intronų pašalinimą. O U12 splaisosoma katalizuoja retų nekoduojančių sekų – U12 tipo intronų, kurie sudaro mažiau nei 0,5 % visų intronų eukariotuose, pašalinimą. Šios splaisosomos tarpusavyje skiriasi sudėtimi, atpažįstamomis sekomis ir iškerpamo introno forma (Sharp, Burge, 1997; Singh, Cooper, 2012).

1.1.5.1. U2 tipo splaisosomos komplekso struktūra ir funkcijos

Pagrindinę U2 tipo splaisosomą sudaro penkios mažos branduolio ribonukleobaltyminės dalelės (snRNP): U1, U2, U4, U5 ir U6. snRNP sudėtyje yra daug uridino turinčios mažos branduolio RNR (U1, U2, U4, U5 ir U6), septyni kiekvienai dalelei bendri Sm (B/B', D3, D2, D1, E, F ir G) baltymai, suformuojantys žiedinį kompleksą – snRNP šerdį, ir keletas unikalių baltymų (Vaughan, Foster, 2013). Šis snRNR ir baltymų kompleksas katalizuoja ~99 % introninių sekų pašalinimą žmogaus ląstelėse (Chen, Moore, 2014).

Eukariotinėje ląstelėje U2 tipo splaisosoma (1.4 pav.) formuojasi susidarant tarpiniams E, A, B, B^{act}, B* kompleksams ir aktyviajam C kompleksui.



1.4 pav. U2 splaisosomos komplekso formavimosi etapai (Will, Luhrmann, 2011). U1, U2, U4, U5, U6 – mažos branduolio ribonukleobaltyminės dalelės

Nuo ATP nepriklausomas ankstyvasis splaisosomos kompleksas E (angl. *early*) susidaro SR baltymams jungiantis prie pre-iRNR egzonišės 5' taikinio sekos; šie baltymai pritraukia U1 snRNP dalelę. U1 snRNP sąveikauja su 5' taikinio sekoje esančia konservatyviaja GU bazių pora. Papildomas splaisingo veiksnys SF1/mBBP (angl. *branchpoint binding protein*, su šakojimosi seka besirišantis baltymas) jungiasi prie šakojimosi sekos adenozino, o heterodimerinio U2 pagalbinio veiksnio 65 kDa ir 35 kDa subvienetai – atitinkamai prie polipirimidininės sekos ir 3' taikinio sekos AG nukleotidų. Šiame etape labai svarbi yra SR šeimos baltymų sąveika su egzonišėmis 5' ir 3' splaisingo taikinio sekomis, padedančiomis stabilizuoti U2AF ir U1 snRNP sąveikas su RNR (Ritchie *et al*, 2009).

U2 snRNP dalelei prisijungus prie pre-iRNR šakojimosi taško sekos susiformuoja vadinamasis A splaisosomos kompleksas (presplaisosoma). Šiai sąveikai reikiama energija gaunama ATP hidrolizės metu. SF1/mBBP disocijuoja, o U2 snRNP sąveikaujant su šakojimosi taško seka susidaro RNR/RNR dupleksas, kur šakojimosi sekos adenozinas išsikiša ir sudaro palankias sąlygas tolesnei nukleofilinei atakai, nukreiptai į 5' splaisingo taikinio seką (Fredericks *et al*, 2015).

Prie splaisosomos A komplekso prisijungus trinariam snRNP dalelių kompleksui, susiformuoja nuo ATP priklausomas prekatalitinis B kompleksas. snRNP dalelių kompleksą sudaro trys U5 ir U4/U6 snRNP dalelės, kur U4/U6 snRNP dėl didelio komplementarumo sąveikauja tarpusavyje. Šio proceso metu vyksta splaisosomos konformaciniai pokyčiai, suartinantys 5' ir 3' taikinio sekas. Identifikavus žmogaus prekatalitinį B kompleksą nustatyta, kad jis turi visas U snRNP ir daugiau nei 110 papildomų baltymų. Šio ir kitų kompleksų susidarymo procese yra reikalingi DExD/H-box šeimos baltymai, pvz., Prp5, UAP56, Prp2, Prp16, Prp22, Prp43, turintys ATPazinius aktyvumus, kurie rodo, kad tolesniuose splaisosomos formavimosi etapuose reikia energijos (Wahl *et al*, 2009).

Susidarant aktyviajam B^{act} kompleksui vyksta struktūriniai RNR/RNR ir RNR/baltymo sąveikų pokyčiai. Šiame etape suardomi U4/U6 snRNP komplekso vandeniliniai ryšiai ir U1 bei U4 snRNP atpalaiduojamos. Formuojasi sąveikos tarp U6 snRNP su 5' taikinio seka ir U2 snRNP, o U5 snRNP sąveikauja su 5' ir 3' splaisingo taikinių sekomis. Šie persitvarkymai padeda tiksliai atpažinti 5' taikinio seką ir sustiprina sąveiką su šakojimosi seka (Karijolic, Yu, 2010).

Formuojantis katalitiškai aktyviam B* kompleksui, katalizuojama pirmoji pre-iRNR splaisingo transesterifikacijos reakcija. Susidaro laisvas 5' egzonas ir 3' egzonas su prijungta kilpos formos intronine seka.

Įvykus konformaciniams persitvarkymams, susiformuoja C kompleksas – aktyvioji splaisosoma, kuri katalizuoja antrąją pre-iRNR splaisingo transesterifikacijos reakciją. Formuojantis C kompleksui introno 3'-galinėje sekoje esantis A nukleotidas ir introno 5'-galinėje sekoje esantis G nukleotidas atsiduria arti vienas kito ir susijungia. Gaunama kilpos formos introninė seka, susijungusi su U2, U5, U6 snRNP dalelėmis, ir susidariusi iRNR (posplaisosominis kompleksas). snRNP dalelės disocijuoja ir vėl dalyvauja formuojantis kitai splaisosomai. Procesas kartojasi (Will, Luhrmann, 2011).

1.1.5.2. U12 tipo splaisosomos struktūra ir funkcijos

Eukariotinėje ląstelėje kartu su pagrindine U2 tipo splaisosoma egzistuoja ir U12 tipo splaisosoma, katalizuojanti retų U12 tipo intronų, kurių randama svarbias funkcijas (pvz., DNR replikacija, transkripcija, RNR brendimas ir transliacija) ląstelėje atliekančiuose genuose, pašalinimą. U12 tipo intronai yra iškerpami ir sujungiami tris–penkis kartus lėčiau, palyginti su pagrindiniu U2 tipo intronų pašalinimo mechanizmu, o tai apriboja genų, turinčių tokius intronus, raišką (Turunen *et al.*, 2013).

U12 tipo splaisosomą sudaro keturios unikalios snRNP dalelės, turinčios U11, U12, U4atac bei U6atac ir papildomų baltymų. O U5 snRNP randama abiejose splaisosomose (Lim *et al.*, 2015). Nepaisant abiejų tipų splaisosomų formavimosi stadijų bei funkcijų panašumo (Shen *et al.*, 2004), nustatyta ir keletas skirtumų: U12 splaisosomoje 5' splaisingo taikinio seką ir šakojimosi seką vienu metu atpažįsta U11-U12 di-snRNP kompleksas.

U12 tipo intronai turi AT/AC dinukleotidais apibrėžtas 5' ir 3' intronines taikinių sekas, itin konservatyvias 5' splaisingo taikinio ir šakojimosi taško sekas, tačiau neturi polipirimidinės sekos. U12 tipo intronams būdingas dažnas AC nukleotidų pasikartojimas introno 3' taikinio sekoje, o atstumas nuo šakojimosi taško iki 3' taikinio sekų yra trumpas (11–13 nt) (Sharp, Burge, 1997). Lyginant abi splaisosomas buvo pastebėta, kad nors U12 ir U2 tipo intronai yra panašaus ilgio (vidurkiai: U12 – 3600 nt, U2 – 4130 nt), tačiau U12 nerasta trumpų (apie 100 nt ir mažiau) iškerpamų intronų.

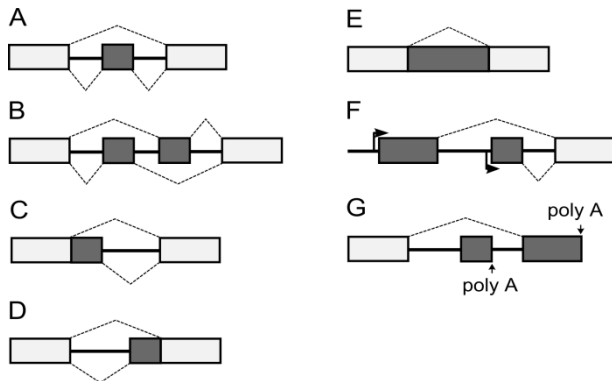
U12 splaisosomos reikšmė nėra iki galo aiški, bet jos egzistavimas kartu su U2 splaisosoma rodo, kad ji turi unikalių funkcijų aukštesniuosiuose eukariotuose ir yra svarbi reguliuojant specifinių genų raišką. Nustatyta keletas ligų, kurios susijusios su U12 tipo intronų pašalinimo sutrikimais. Tai mutacijos U12 tipo 5' taikinio sekoje *LKB1* ir *SEDL* genuose, kurios atitinkamai sukelia Peutzo ir Jegherso sindromą ir spondiloepifizinę displaziją (Launonen, 2005; Shaw *et al.*, 2003)

1.1.6. Alternatyvusis pre-iRNR splaisingas

Alternatyvusis pre-iRNR splaisingas yra vienas iš genų raiškos reguliavimo mechanizmų, lemiančių baltymų įvairovę aukštesniuosiuose eukariotuose. Alternatyviojo pre-iRNR splaisingo metu skirtingai sujungiant 5' ir 3' taikinių sekas, įjungiant ar praleidžiant koduojančias sekas, iš vienos pre-iRNR gaunamos skirtingos iRNR izoformos. Puikus alternatyviojo splaisingo pavyzdys yra gerai išanalizuotas *Drosophila Down syndrome cell adhesion molecule (Dscam)* genas, kuris alternatyviojo splaisingo būdu gali sukurti 38 016 izoformų iš 95 egzonų (Wojtowicz *et al.*, 2004). Alternatyvusis splaisingas leidžia paaiškinti, kaip ląstelėje pasiekiami baltymų įvairovė esant ribotam aukštesniuosiuose eukariotuose randamų genų skaičiui.

Nustatyti septyni alternatyviojo pre-iRNR splaisingo variantai (1.5 pav) (Wang, Burge, 2008): egzono praleidimas arba įterpimas – 38,4 %; alternatyvių 5' arba 3' taikinio sekų panaudojimas – atitinkamai 7,9 % ir 18,4 %; introno išsaugojimas – 2,8 %; vieno iš dviejų egzonų pasirinkimas, alternatyvių promotoriaus ir poliadenilinimo sekų panaudojimas – 32,4 % (Le *et al.*, 2015).

Vykstant alternatyviajam pre-iRNR splaisingui gali būti tarpusavyje derinami keli paminėti variantai.



1.5 pav. Ląstelėse randami alternatyviojo pre-iRNR splaisingo variantai: *A* – egzono praleidimas arba įterpimas; *B* – vieno iš dviejų egzonų pasirinkimas; *C* – alternatyvios 5' taikinio sekos panaudojimas; *D* – alternatyvios 3' taikinio sekos panaudojimas; *E* – introno išsaugojimas, *F* – alternatyvių promotoriaus sekų pasirinkimas; *G* – alternatyvių poliadenilinimo sekų panaudojimas. Keturkampiai ir linijos žymi atitinkamai egzonines ir intronines sekas

Alternatyviojo pre-iRNR splaisingo variantų pasirinkimas priklauso nuo *cis* ir *trans* elementų, kurie yra svarbūs splaisingo taikinių sekoms atpažinti ir tinkamai splaisingo eigai. Pastebėta, kad alternatyvieji splaisingo taikiniai dažniausiai turi skirtingo stiprumo taikinių sekas ir dėl šios priežasties jas ne taip greitai atpažįsta, palyginti su reguliariosiomis taikinių sekomis. Silpnų splaisingo taikinių sekų polipirimidininėje sekoje tarp pirimidino bazių dažnai būna įsiterpusių pasikartojančių purino bazių, todėl U2AF splaisingo veiksnys su jomis sąveikauja silpnai, o šakojimosi taško sekos nukleotidų konservatyvumas, palyginti su kanonine seka, yra nedidelis. Todėl šie taikiniai naudojami labai neefektyviai arba tik tam tikrais atvejais, pvz., esant pakitusioms ląstelių aplinkos sąlygoms. Silpnos taikinių sekos yra viena pagrindinių alternatyviojo splaisingo variantų pasirinkimo priežasčių (Fu, Ares, 2014; Srebrow, Kornblihtt, 2006). Be to, alternatyvių splaisingo taikinių pasirinkimui įtaką gali daryti chromatinio struktūra ir pačios transkripcijos eiga. Literatūroje aprašomos dvi skirtingos idėjos, kaip alternatyvusis splaisingas gali vykti kotranskripciškai:

1. Teigiama, kad vienas ar keli splaisingo veiksniai sąveikauja su transkripcijos aktyvukliais, koaktyvukliais ar RNR polimerazės II C-galine sritimi (angl. *carboxy terminal domain* – CTD), o tai nulemia splaisingo taikinių pasirinkimą (Kornblihtt *et al*, 2013).

2. Teigiama, kad RNR polimerazės II elongacijos greitis reguliuoja splaisingo taikinių atpažinimą ir nulemia splaisingo efektyvumą. Kai RNR polimerazės II elongacijos greitis mažinamas, į susidariusią iRNR įterpiami silpnus splaisingo taikinius turintys alternatyvūs egzonai. Kai RNR polimerazės II elongacijos greitis spartesnis, yra pasirenkama stipresnė 3' splaisingo taikinio seka, o tai padidina alternatyvių egzonų prašokimą. Sumažėjęs RNR polimerazės II elongacijos greitis

didina bendrąjį pre-iRNR splaisingo efektyvumą, ir atvirkščiai (Ip *et al*, 2011; Moehle *et al*, 2014).

1.1.7. Alternatyvusis pre-iRNR splaisingas ir su juo susijusios ligos

Literatūroje teigiama, kad ~95 % žmogaus genų yra alternatyviai splaisinami, nuo tos pačios pre-iRNR susidarant dviem ar daugiau iRNR izoformoms (Khan *et al*, 2012). Todėl nekeista, kad alternatyviojo splaisingo pokyčiai gali keisti baltymo funkcines savybes ir netgi pakeisti geno vaidmenį ląstelių procesuose. Alternatyvusis pre-iRNR splaisingas kinta pakitus aplinkos sąlygoms ar atsiradus pokyčių *cis* ir *trans* elementuose, o tai lemia įvairių ligų vystymąsi žmogaus organizme (Cieply, Carstens, 2015).

Aplinkos pokyčiai ląstelėje, lemiantys alternatyviojo pre-iRNR splaisingo pakitimus, ypač dažnai siejami su onkologinių ligų atsiradimu ir progresavimu. Pavyzdžiui, apoptozės reguliacijos procese dalyvaujantis *FAS* (*Apo-1/CD-95*) genas alternatyviojo splaisingo būdu iš penkiolikos pre-iRNR egzonų sudaro dvi izoformas su skirtingomis funkcijomis. Viena – proapoptotinė (*Fas*) – izoforma gaunama sujungiant 5, 6, 7 egzonus į subrendusią iRNR, kita – antiapoptotinė (*sFas*) – izoforma, neturinti 6-o egzono, koduojančio baltymo transmembraninį motyvą, slopina ląstelės žūtį ir sudaro sąlygas vėžinei ląstelei išgyventi (Izquierdo *et al*, 2005). Taip pat nustatyti kitų onkologiniuose procesuose dalyvaujančių genų – *VEGF*, *BCL-X*, *CYR61*, *CIAX* – alternatyviojo splaisingo pokyčiai, koduojantys skirtingas funkcijas turinčius baltymus, inicijuojančius naviko atsiradimą ir vystymąsi. Pavyzdžiui, už kraujagyslių augimą ir angiogenezę atsakingas *VEGFA* genas alternatyviojo splaisingo metu iš aštuonių pre-iRNR egzonų sudaro antiangiogenines (*VEGF_{xxx}b*) ir proangiogenines (*VEGF_{xxx}*) izoformas. Nustatyta, kad *VEGFA_{xxx}* izoformos skatina angiogenezę ir jų raiška navikuose padidėjusi (Arcondeguy *et al*, 2013).

Mutacijos *cis* elementuose yra aptinkamos, kai sergama neurologinėmis ir raumenų degeneracijos ligomis, pvz., šonine amiotrofinė skleroze, frontotemporaline demencija, Parkinsono, Alzheimerio ir Huntingtono ligomis (angl. *tauopathies*). *Cis* elementų mutacijos taip pat nustatytos augimo hormono nepakankamumo (IGHD II), Freizerio (Frasier) sindromo, cistinės fibrozės (Faustino, Cooper, 2003) ir kai kurių onkologinių ligų atvejais (Grabowski, Black, 2001). Literatūroje paskelbta, kad taškinė mutacija, pasitaikanti *cis* elementų – 5' ir 3' taikinių, šakojimosi taško ir polipirimidininėje sekose, sukelia apie 10 % genetinių ligų (Cooper *et al*, 2009). Pavyzdžiui, autonominę nervų sistemos ligą – disautonomiją sukelia mutacija *IKBKAP* geno 20-o egzono 5' taikinio sekoje, kuri suardo sąveiką su U1 dalele, taip skatindama šio egzono praleidimą (Douglas, Wood, 2011). Taip pat mutacijos egzoninėse / introninėse splaisingo efektyvumą stimuliuojančiose ir slopinančiose sekose pakeičia įprastų splaisingo taikinių panaudojimą, ir susidaro pakitusios iRNR izoformos. Mutacija ISS / ESS sekoje lemia, kad paprastai į susidarančią iRNR neįjungiamas egzonas yra įterpiamas, o mutacija ESE / ISE sekoje lemia egzono praleidimą (Singh, Cooper, 2012). Pavyzdžiui, ląstelės apoptozės reguliacijos procese dalyvaujančio *BRCA1* geno 18-o egzono ESE sekoje esanti mutacija (prie kurios jungiasi *SFRS1* veiksnys) skatina šio egzono pašalinimą, kuris lemia *BRCA1*

funkcijų pasikeitimą krūties ir kiaušidžių vėžio atvejais. *Cis* elementuose esantys polimorfizmai taip pat turi įtakos alternatyviajam pre-iRNR splaisingui, pavyzdžiui, cistinė fibrozė siejama su *CFTR* geno 8-o introno sekoje esančiais keliais polimorfizmais, kurie skatina 9-o egzono praleidimą susidarant nefunkcionaliam baltymui (Faustino, Cooper, 2003).

Mutacijos *trans* elementuose sukelia pigmentinį retinimą, stuburo raumenų atrofiją, miotoninę distrofiją (Faustino, Cooper, 2003), autizmą, amiotrofinę lateralinę sklerozę ir yra ypač dažnos įvairių vėžinių ligų atvejais (Singh, Cooper, 2012). Pavyzdžiui, miotoninės distrofijos DM2 ligos atveju *ZNF9* geno 1-ame introne nustatyta mutacija – CCTG nukleotidų pasikartojimai, pakeičiantys splaisingo veiksnių sąveiką su RNR ir lemiantys alternatyviojo pre-iRNR splaisingo pokyčius.

Kaip jau buvo minėta, vieni svarbiausių *trans* veiksnių alternatyviojo splaisingo procese yra SR ir hnRNP šeimų baltymai, kurie, priklausomai nuo jų sąveikos su RNR, veikia kaip teigiami (skatina egzonų įterpimą) arba neigiami (skatina egzonų praleidimą) splaisingo reguliatoriai (Busch, Hertel, 2012). Pavyzdžiui, ląstelės apoptozėje dalyvaujantis *CASP-9* genas alternatyviojo splaisingo būdu iš vienuolikos pre-iRNR egzonų sudaro dvi izoformas. Kai prie 3-io egzono ESS sekos jungiasi hnRNP L baltymas, skatinantis 3, 4, 5 ir 6 egzonų praleidimą, gaunama Caspase-9b (antiapoptotinė) izoforma. Priešingai veikia SRSF1 baltymas, skatinantis šių keturių egzonų įterpimą į RNR sudėtį sudarant Caspase-9a (proapoptotinę) izoformą (Liu, Cheng, 2013). Alternatyvusis pre-iRNR splaisingas kinta ne tik atsiradus *trans* splaisingo elementų mutacijoms, bet ir pakitus *trans* splaisingo veiksnių raiškai, lokalizacijai ir (ar) aktyvumui, o tai pakeičia taikinio sekų atpažinimą ir sukelia įvairių organizmo sutrikimų (Pedrotti, Cooper, 2014). Pavyzdžiui, padidėjusi veiksnio SFRS1 raiška skatina tirozino kinazės receptoriaus Ron alternatyvųjį splaisingą, kurio metu susidaro 11-o egzono neturinti Ron izoforma su pasikeitusiomis receptoriaus funkcinėmis savybėmis – aktyvinamas ląstelių judėjimas ir invazija. Padidėję 11-o egzono neturinčios Ron iRNR izoformos kiekiai randami daugelyje navikų ir siejami su metastazių formavimusi (Zhang, Manley, 2013). Kitas pavyzdys kai kuriais vėžinių ligų atvejais rodo, kad sumažėjus SR baltymų fosforilinimo lygiui, lemiančiam šių baltymų aktyvumą, keičiasi apoptozę reguliuojančio *BCL-X* alternatyvusis pre-iRNR splaisingas: sumažėja proapoptotinės (*BCL-X_S*) izoformos ir padaugėja antiapoptotinės (*BCL-X_L*) izoformos.

Nors minėtos ligos priskiriamos *cis* bei *trans* mutacijas turintiems elementams, tačiau daugumos jų atveju randama abiejų splaisingo elementų pokyčių. Pavyzdžiui, neurodegeneraciniuose procesuose dalyvaujančio *MAPT* (angl. *microtubule-associated protein tau*) geno alternatyvusis splaisingas sutrinka pakitus abiem (*cis* ir *trans*) elementams. Esant mutacijų 10-o egzono ESS ir (ar) greta esančio 10-o introno ISS sekose, į susidarančią *MAPT* iRNR yra įterpiamas 10 egzonas, o to paties geno ESE sekoje aptinkama viena mutacija skatina 10-o egzono praleidimą. *Trans* elementų mutacijos keičia splaisingo veiksnių SRSF11, Tra-2 β , SRSF1, SRSF9, SRSF6 sąveikas su RNR. Abiem atvejais šie pokyčiai nulemia skirtingų iRNR izoformų susidarymą, pakeičiantį *tau* baltymo funkcijas (Qian, Liu, 2014).

Taigi alternatyvusis pre-iRNR splaisingas yra vienas esminių procesų, reguliuojančių genų raišką eukariotinėse ląstelėse, kurio metu kintant įprastai susidarančių baltymų raiškai sukuriama funkciskai pakitę baltymai. Nustačius ląstelėje vykstančių alternatyviojo pre-iRNR splaisingo pokyčių priežastis, būtų galima kontroliuoti pakitusių iRNR susidarymą ir įvairių ligų analizei sukurti naujus ligų žymenis ar gydymo metodus.

1.2. Žmogaus monoaminooksidazė B ir jos įtaka Parkinsono ligai

1.2.1. Monoaminooksidazės ir jų reikšmė

Monoaminooksidazės (MAO) yra fermentai, katalizuojantys biogeninių ir ksenobiotinių aminų oksidacinį deamininimą. Eukariotuose randamos dvi monoaminooksidazių izoformos: MAO-A ir MAO-B. Žmogaus X chromosomoje esantys *MAO-A* ir *MAO-B* genai sudaryti iš identiškos egzoniškos-introniškos struktūros, jų sekų panašumai siekia iki 70 %. Lyginant abi MAO baltymo izoformas buvo nustatyta, kad skiriasi jų substratai ir inhibitoriai. MAO-A fermentas katalizuoja biogeninių aminų, pvz., serotonino, noradrenalino, oksidacinį deamininimą ir yra inaktyvinamas inhibitoriaus chloirilino. MAO-B efektyviau veikia vykstant feniletilamino bei benzilamino metabolizmui, o inaktyvinamas deprenilo. Dopaminas, tiraminas, triptaminas, oktopaminas yra galimi abiejų izoformų substratai ir inhibuojami pargilino. Jeigu vienos MAO izoformos ląstelėje trūksta, tada ji pakeičiama kita izoforma (Bortolato, Shih, 2011).

Abiejų MAO-A ir MAO-B fermentų randama išorinėje mitochodrijų membranoje, o jų raiška randama įvairiuose žmogaus audiniuose. Didžiausia abiejų fermentų raiška nustatyta kepenyse ir smegenyse. Centrinėje nervų sistemoje MAO-A lokalizuojasi katecholaminerginiuose (noradrenerginiuose ir dopaminerginiuose) neuronuose, o MAO-B – serotoninerģiniuose, histaminerginiuose neuronuose ir glijos ląstelėse. Tačiau kai kuriuose periferiniuose audiniuose randama tik vieno MAO tipo raiška, pavyzdžiui, placentos ląstelėse randama tik MAO-A, o trombocituose ir limfocituose – tik MAO-B raiška (Kaludercic *et al*, 2014). Atrasta, kad MAO-B iRNR raiška didesnė suaugusio žmogaus smegenyse nei embriono smegenyse. Tai rodo šio fermento raiškos pasikeitimus bėgant metams. Taip pat nustatyta, kad žmogui senstant didėja MAO-B fermento aktyvumas smegenyse. Manoma, kad tai priklauso nuo glijos ląstelių padaugejimo senėjimo metu (Nagatsu, 2004).

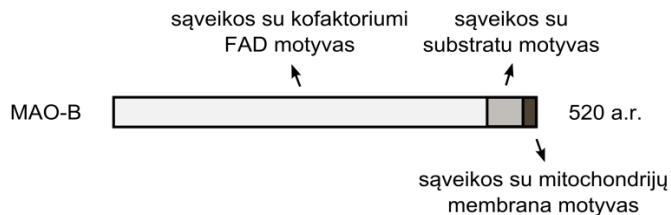
Monoaminooksidazės yra labai svarbios biogeninių aminų metabolizmui, ir bet kokie jų aktyvumo ar raiškos pokyčiai yra susiję su įvairiomis žmogaus ligomis. Padidėjęs MAO-A fermento aktyvumas sukelia psichikos sutrikimų, pvz., depresiją ir šizofreniją, o padidėjęs MAO-B aktyvumas nustatytas sergant neurodegeneracinėmis, pvz., Parkinsono, Alzheimerio ir Huntingtono, ligomis. Sumažėjus MAO-B fermento aktyvumui susergama Norrie liga, kurios požymiai – aklumas, kurtumas ir protinis atsilikimas (Shih, Thompson, 1999). Be to, MAO-B fermento aktyvumo sumažėjimas siejamas su elgsenos pasikeitimais: polinkiu į agresiją, alkoholizmą ir savižudybę.

Nustatyta, kad daugelis medicinoje naudojamų farmacinių preparatų, skirtų psichikos ligoms gydyti ir Parkinsono, Alzheimerio, Huntingtono ligų

progresavimui lėtinti, yra MAO-A ir MAO-B fermentų inhibitoriai (Bortolato *et al*, 2008). MAO-B inhibitoriai, pvz., deprenilas, rasagilinas ir kt., slopina dopamino metabolizmą ir taip palengvina Parkinsono ligos motorinius simptomus (Fernandez, Chen, 2007).

1.2.2. Monoaminooksidazės B struktūra

Žmogaus MAO-B genas sudarytas iš 15 egzonų, kur 12 egzonus koduoja kofaktoriaus FAD, flavinadenindinukleotido, sąveikos vietą (Nagatsu, Sawada, 2006). Žmogaus MAO-B fermento struktūra sąlygiškai suskirstyta į tris motyvus (1.6 pav.): sąveikos su kofaktoriumi FAD, sąveikos su substratu ir sąveikos su išorine mitochondrijų membrana motyvus. Fermento N-galinėje aminorūgščių sekoje yra sąveikos su kofaktoriumi FAD motyvas, kovalentiškai besijungiantis prie cisteino liekanos, kurio būtinai reikia funkciškai aktyviam fermentui susidaryti ir tolesnei neuromediatorių katalizės eigai. C-galinėje aminorūgščių sekoje yra transmembraninis hidrofobinis fragmentas, kurio reikia sąveikai su išorine mitochondrijų membrana (Edmondson *et al*, 2004; Edmondson *et al*, 2007). Nustatyta, kad su išorine mitochondrijų membrana MAO-B fermentas sąveikauja kaip homodimeras. Manoma, kad dimerizacija reikalinga tinkamai baltymo dipolio momento orientacijai membranos paviršiuje (Binda *et al*, 2011). Kitas C-galinėje baltymo srityje esantis sąveikos su substratu ar inhibitoriumi motyvas turi didelę reikšmę MAO-B katalizės mechanizmui (Gaweska, Fitzpatrick, 2011). Šis motyvas dažniausiai yra hidrofobinis ir specifiskas skirtingam substratui ar inhibitoriui (Edmondson *et al*, 2009).



1.6 pav. Žmogaus MAO-B struktūros schema

Besiformuojanti monoaminooksidazės polipeptidinė grandinė patiria kitas posttransliacines modifikacijas. Nustatyta, kad MAO-B atveju N-galinėje aminorūgščių sekoje vyksta metionino pašalinimas (Met 1) ir serino liekanos (Ser 2) acetilinimas. Taip pat nustatytos kelios tam tikram audiniui būdingos modifikacijos: N-galinėje sekoje esančios aminorūgšties lizino liekanos (Lys 52) acetilinimas ir galimas serino liekanų fosforilinimas, kurių poveikis MAO-B fermento funkcijoms vis dar nėra aiškus (Kaludercic *et al*, 2014).

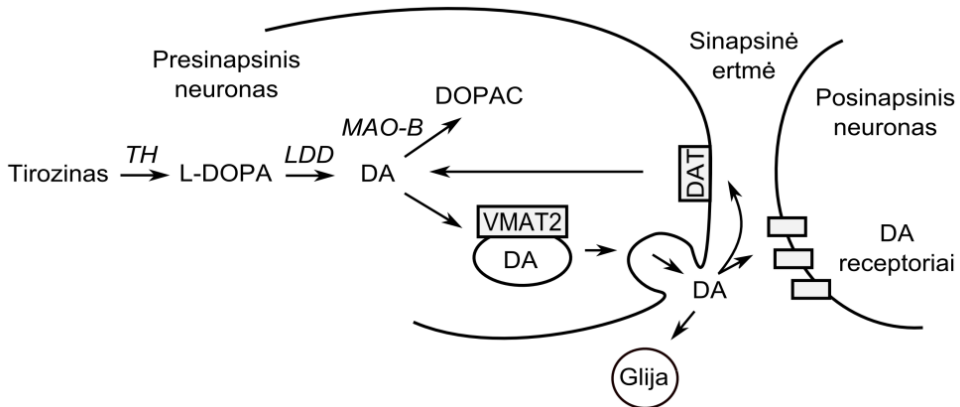
1.2.3. Biogeninių aminų metabolizmas

MAO-B fermento funkcija yra katalizuoti daugybės biogeninių ir ksenobiotinių aminų oksidacinį deamininimą žmogaus centrinėje nervų sistemoje ir periferiniuose audiniuose. Pagrindiniai MAO-B substratai yra dopaminas,

noradrenalinas ir adrenalinas, dalyvaujantys informacijos perdavimo nervų sistemoje procese (Ramsay, 2016).

1.2.3.1. Dopamino biosintezė ir metabolizmo kelias nervinėse ląstelėse

Dopamino biosintezė nervinių ląstelių citoplazmoje vyksta dviem etapais (1.7 pav.). Pirmiausia tirozino aminorūgštis hidroksilinama dalyvaujant tirozino hidroksilazės fermentui (TH) ir susidaro L-3,4-dihidroksifenilalaninas (L-DOPA). Antrame etape L-DOPA yra dekarboksilinamas, dalyvaujant piridoksalfosfatui (aktyviajai vitamino B6 formai) ir fermentui L-DOPA dekarboksilazei (LDD), ir susidaro dopaminas (DA). DA yra tolesnės reakcijos substratas, iš kurio gaunamas noradrenalinas ir adrenalinas (Meiser *et al*, 2013; Munoz *et al*, 2012).



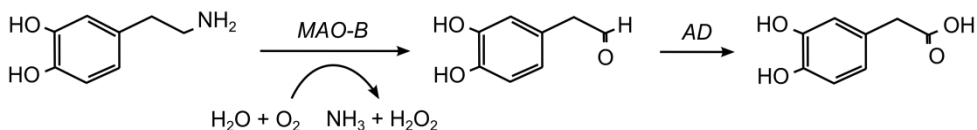
1.7 pav. Dopamino biosintezė nervinėse ląstelėse ir jo metabolizmas dalyvaujant MAO-B (Eisenhofer, Kopin *et al.*, 2004). TH – tirozino hidroksilazė; L-DOPA – L-3,4-dihidroksifenilalaninas; LDD – L-DOPA dekarboksilazė; DA – dopaminas; MAO-B – monoaminooksidazė B; DOPAC – 3,4-dihidroksifenilacto rūgštis; VMAT2 – vezikulės monoamino nešiklis 2; DAT – dopamino nešiklis

Susintetinti dopaminai lokalizuojasi vezikulėse, kurios pernešamos į sinapsinę ermtę (1.7 pav.). Šiame procese labai svarbią funkciją atlieka vezikulės monoamino nešiklis 2 (VMAT2), nuo kurio raiškos priklauso dopaminų lokalizacija, apsauga nuo oksidacijos vezikulėse ir jų pernaša į sinapsę (Wimalasena, 2011). Nustatyta, kad sumažėjus VMAT2 raiškai vyksta dopaminų homeostazės pokyčiai, sukeltys ląstelės pažeidimus Parkinsono ligos atveju (Caudle *et al*, 2007).

Sinapsinėje ermtėje dopaminai atpalaiduojami ir sąveikauja su receptoriais, taip perduodami signalą kitam neuronui (1.7 pav.). Nedidelė dalis dopamino molekulių disocijuoja nuo receptoriaus ir vyksta jų reabsorbcija dalyvaujant dopamino nešikliui (DAT). DAT yra svarbus dopaminų koncentracijai reguliuoti ir jiems pernešti per membraną. Šis nešiklis pasižymi dideliu giminingumu įvairiems monoaminams, pvz., amfetaminui ir kitiems neurotoksinams, kuriuos gali pernešti vietoje dopamino, tokiu būdu sukeldamas dopamino homeostazę, nulemiančią dopaminerginių neuronų funkcijų sutrikimus (Vaughan, Foster, 2013). Aktyvūs

farmaciniai preparatai, pvz., antidepresantai, gali sąveikauti su DAT ir blokuoti dopamino pernašą (Chen, Reith, 2000).

Nervinių ląstelių citoplazmoje MAO-B fermentas katalizuoja iš vezikulių nutekėjusių (apie 1/10) dopaminų oksidacinį deamininimą. Susidaro tarpiniai produktai: 3,4-dihidroksifenilacetaldehidai, amoniakas ir vandenilio peroksidas, kurie yra toksiški ląstelei. Todėl bet kokie MAO-B fermento raiškos ar aktyvumo pokyčiai ląstelei yra žalingi. Gautas tarpinis 3,4-dihidroksifenilacetaldehidai, toliau katalizuojamas aldehido dehidrogenazės (AD), sudaro 3,4-dihidroksifenilacto rūgštį (DOPAC) (1.8 pav.) (Eisenhofer *et al*, 2004).

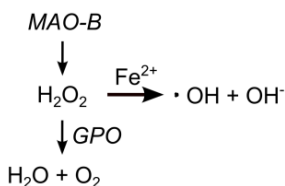


1.8 pav. Dopamino oksidacinio deamininimo, katalizuojamo MAO-B fermento, reakcija (Youdim, Bakhle, 2006). MAO-B – monoaminooksidazė B; AD – aldehido dehidrogenazė

1.2.3.2. Monoaminooksidazės B ryšys su Parkinsono liga

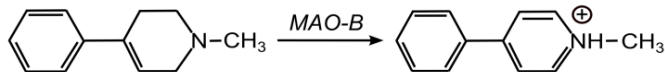
MAO-B fermento aktyvumo ar baltymo raiškos pokyčiai sukelia visų biogeninių aminų metabolizmo metu susidarantių reakcijos produktų pusiausvyros sutrikimus, o šie pažeidžia neuronus ir glijos ląsteles centrinėje nervų sistemoje ir periferiniuose audiniuose ir lemia įvairių žmogaus neurologinių ligų bei kitų sutrikimų, pvz., obstrukcinės miego apnėjos, diabeto, širdies ir kraujagyslių ligų, vystymąsi ir eigą (Bisogni *et al*, 2016; Kaludercic *et al*, 2014). Literatūroje nurodoma, kad Parkinsono ligos atveju randamas padidėjęs MAO-B fermento aktyvumas ir jo raiška (Bonuccelli *et al*, 1990; Ramsay, 2016). Nustatytos kelios šios ligos vystymosi priežastys:

1. Padidėjus MAO-B aktyvumui, vyksta dopamino metabolizmo pokyčiai, o dėl jų susidaro daugiau tarpinių produktų, t. y. 3,4-dihidroksifenilacetaldehido, amoniako ir vandenilio peroksido. Glutationo peroksidazės (GPO) fermentas skaido vandenilio peroksidą į vandenį ir deguonį, tačiau, susidarius didesniais produkto kiekiu, šis fermentas nebesugeba jo viso suardyti (1.9 pav.). Tuomet, katalizuojant neuromelaninui ir geležies(II) jonui, iš vandenilio peroksido susidaro hidroksilo jonas ir toksiškas hidroksilo laisvasis radikalas. Padidėjęs reaktyviojo hidroksilo radikalo susidarymas sukelia oksidacinį stresą, ardantį dopaminerginius neuronus (Dorszewska *et al*, 2013; Shih *et al*, 1999).



1.9 pav. Neurotoksinio mechanizmo ląstelėje schema (Youdim, Bakhle, 2006). GPO – glutationo peroksidazė; $\cdot\text{OH}$ – hidroksilo radikalas; OH^- – hidroksilo jonas

2. Didelę įtaką Parkinsono ligos sindromų atsiradimui turi į organizmą patekusios cheminės medžiagos, pvz., ksenobiotikai, metalai ir kt. Nustatyta, kad MAO-B katalizuoja į smegenis patekusį ksenobiotiką 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridiną (MPTP) į aktyvųjį neurotoksiną – 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridino katijoninį junginį (MPP⁺) ne dopaminerginiuose, o serotogeniniuose neuronuose bei glijos ląstelėse (1.10 pav.). Susidaręs MPP⁺ yra kaip substratas DAT nešikliui, kuris jį perneša į dopaminerginius neuronus vietoje dopamino. Tuomet mitochondrijose slopinamas oksidacinis fosforilinimas – tai inicijuoja reaktyvaus hidroksilo radikalo, kuris sukelia pažeidimus dopaminerginiuose neuronuose bei glijos ląstelėse, susidarymą (Dauer, Przedborski, 2003).



1.10 pav. 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinas MAO-B katalizuojamas į 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridino katijoninį junginį (Fahn, Sulzer, 2004)

1.2.4. Monoaminooksidazės B polimorfizmai ir Parkinsono liga

Parkinsono liga yra vienas dažniausių neurodegeneracinių sutrikimų. Ji vargina apie 2 % vyresnių nei 60 metų žmonių, o pasaulyje suskaičiuojama 6,3 mln. šios ligos atvejų. Sergant šia liga, galvos vidurinių smegenų juodojoje medžiagoje (*substantia nigra*) nyksta nervinės ląstelės, dalyvaujančios motorikos kontrolės procese, todėl sulėtėja ir pasunkėja judesiai. Yra žinoma, kad šios ligos pagrindą sudaro dopamino kiekio sumažėjimas nervų sistemoje, lemiantis dopaminerginių neuronų netekimą, dėl kurio nebeužtikrinama įprasta žmogaus judesių kontrolė (Dorszewska *et al*, 2013).

Literatūroje aprašoma, kad viena iš galimų Parkinsono ligos priežasčių yra *MAO-B* gene aptinkami DNR polimorfizmai (Andreou *et al*, 2014). Įvairių žmonių populiacijose *MAO-B* gene randama skirtingų DNR polimorfizmų (1.1 lent.). Daugiausia nustatyta vieno nukleotido polimorfizmų (SNP), ir tik tam tikrose populiacijose: 7 iš 10 SNP aptinkami juodaodžių amerikiečių ir indėnų populiacijose – tiriant baltaodžius ir azijiečius jų nerasta. Vienas plačiausiai paplitusių polimorfizmų įvairių žmonių populiacijose yra kintamo skaičiaus (GT)_n nukleotidų pasikartojimai, aptinkami 2-ame introne.

Tik vienas polimorfizmas – G nukleotido pakeitimas į A nukleotidą *MAO-B* geno 13-o introno sekoje – aptinkamas visose žmonių populiacijose. Kadangi šis vieno nukleotido pokytis randamas nekoduojančioje sekoje, todėl literatūroje esama prieštaringų nuomonių: vieni tvirtina, kad šis pokytis neturi įtakos *MAO-B* baltymo raiškai (Costa-Mallen *et al*, 2004), o kiti teigia, kad G/A polimorfizmas yra susijęs su *MAO-B* fermento aktyvumu ir baltymo raiškos žmogaus smegenyse pakitimu, kuris nulemia neurodegeneracinius ir psichinius sutrikimus (Balciuniene *et al*, 2002; Bialecka *et al*, 2007). Literatūros šaltiniuose teigiama, kad šis 13-ame introne esantis G/A polimorfizmas koreliuoja su *MAO-B* fermento aktyvumu ir baltymo raiška žmogaus smegenų nervinėse ląstelėse bei trombocituose. Neuropsichiatrinių ligų tyrimai atskleidė, kad tiek neuronai, tiek trombocitai turi panašius biocheminius ir

farmakologinius procesus, todėl daugeliu atvejų trombocitus galima naudoti kaip modelinę sistemą neurobiologiniuose tyrimuose (Bortolato, Shih, 2011; Nikolac Perkovic *et al.*, 2016a)

1.1 lentelė. MAO-B gene aptinkami polimorfizmai. Lentelėje naudoti J. Balčiūnienės ir bendraautorių (Balciuniene *et al.*, 2001) duomenys

Polimorfizmas	Lokalizacija	Populiacija
(GT) _n pasikartojimai	2 intronas	plačiai paplitęs įvairiose populiacijose
A→G	5 egzonas	indėnai
A→G	6 egzonas	juodaodžiai amerikiečiai
C→T	6 intronas	juodaodžiai amerikiečiai
A→G	10 egzonas	juodaodžiai amerikiečiai
7-ią C pašalinimas	10 intronas	juodaodžiai amerikiečiai
A→G	10 intronas	švedai
T→C	10 intronas	juodaodžiai amerikiečiai
A→G	13 intronas	azijiečiai, baltaodžiai, juodaodžiai
T→C	14 intronas	juodaodžiai amerikiečiai, indėnai
C→T	15 egzonas	skirtingos

Literatūroje yra duomenų, rodančių, kad MAO-B „A“ alelis du kartus padidina riziką susirgti Parkinsono liga (Ho *et al.*, 1995). Įdomu tai, kad moterims ir vyrams ši rizika skiriasi (moterims ji yra didesnė) dėl juos skirtingai veikiančių biologinių ir aplinkos veiksnių, pvz., hormonų ir rūkymo (Kang *et al.*, 2006). Šie duomenys leidžia dar kartą patvirtinti, kad vieno nukleotido polimorfizmas yra svarbus Parkinsono ligos patogenezėje.

1.3. Hipoksija: hipoksijos indukuojami veiksniai (HIF) ir jų sąsajos su ligomis žmogaus organizme

1.3.1. Hipoksija ir jos reikšmė

Degūnis yra trečias pagal svarbą elementas (po vandenilio ir helio) visatoje. Jis sudaro 20,8 % oro. Tai – vienas pagrindinių, visų stuburinių organizmų gyvybinei veiklai būtinų elementų. Degūnis – galutinis elektronų akceptorius oksidacinio fosforilavimo grandinėje mitochondrijose, kurio būtinai reikia ląstelės energijos (ATP) gamybos procesui. Jis taip pat dalyvauja įvairių junginių metabolizmo ir svarbių baltymų, pvz., kolageno, sintezės procesuose. Ląstelėje ar audinyje pasireiškęs degūnies trūkumas vadinamas hipoksija (1–5 %). Hipoksijos metu ląstelėje vyksta daugybės fiziologinių procesų, pvz., jonų homeostazės, eritropoetės, angiogenezės, apoptozės ir kt., pakitimai. Su hipoksija siejamos įvairios širdies, kraujagyslių, plaučių ir onkologinės ligos (Biddlestone *et al.*, 2015).

Kiekviena žinduolių ląstelė reaguoja į degūnies koncentracijos pokyčius. Pirmiausia į tai reaguoja karotidinio ir neuroepitelinio audinio chemoreceptoriai. Jie perduoda signalus į centrinę nervų sistemą ir aktyvuoja neuronus, darančius įtaką kraujagyslių vaskuliarizacijos ir kvėpavimo sistemos pokyčiams (Semenza, 1999). Manoma, kad yra keli mechanizmai, kaip ląstelė jaučia degūnies trūkumą. Vienas – per hemo grupę turinčius baltymus, gebančius prisijungti degūnį. Kai degūnis prisijungia kitoje baltymo vietoje nei hemo grupė, sukeliama alosteriniai baltymo pokyčiai: iš aktyviosios (*oksi*) formos pakeičiami į neaktyviają (*deoksi*); pastarosios

padaugėjus organizmas pradeda reaguoti į hipoksiją. Kitas mechanizmas – membranos jonų laidumas, susijęs su deguonies koncentracijai jautriais jonų kanalų veiklos pasikeitimais (K^+ , Ca^{2+} , Na^+). Vykstant jonų homeostazės pokyčiams ląstelės viduje sumažėja K^+ ir padaugėja Na^+ ir Ca^{2+} jonų, o tai sutrikdo mitochondrijų metabolizmą, aktyvuoja tam tikras lipazes, proteazes ir reaktyviojo deguonies (angl. *reactive oxygen species* – ROS) sintezę (Taylor, 2008; Wenger, 2000).

Priklausomai nuo laiko, ląstelės atsakas į hipoksiją gali būti ūmus (sekundės, minutės) ir lėtinis (valandos, dienos) (Lopez-Barneo *et al*, 2001; Prabhakar, Semenza, 2012). Ūmus atsakas į deguonies trūkumą siejamas su jonų kanalų homeostazės pokyčiais (K^+ , Ca^{2+} , Na^+) ir hipoksijos indukuojamų veiksnių (angl. *hypoxia inducible factors* – HIF) stabilizacija. Lėtinio atsako į hipoksiją metu vyksta genų raiškos pokyčiai; šie lemia naujų baltymų, padedančių ląstelei išgyventi, sintezę (Lahiri *et al*, 2006; Semenza, 1999).

Hipoksijos metu ląstelėje stabilizuojami hipoksijos indukuojami transkripcijos veiksniai (HIF), aktyvuojantys genų, reikalingų ląstelei išgyventi sumažėjus deguonies kiekiui aplinkoje, raišką. Genų raiškos pokyčiai ląstelėje lemia daugybės ligų atsiradimą ir vystymąsi žmogaus organizme (Palmer, Clegg, 2014; Ruan *et al*, 2009; Wenger, 2002).

1.3.2. Hipoksijos indukuojami veiksniai (HIF)

Hipoksijos indukuojami veiksniai – heterodimeriniai kompleksai, sudaryti iš spiralės-kilpos-spiralės ir Per-ARNT-Sim (bHLH/PAS) transkripcijos veiksnių šeimai priklausančių α ir β subvienetų (Wang *et al*, 1995; Wang, Semenza, 1995). PAS motyvas pavadintas pagal tris tokį motyvą turinčius pirmuosius atrastus baltymus *Drosophila melanogaster* muselėje: Per – paros ritmo reguliacinis baltymas (angl. *period circadian protein*), ARNT – aromatinių angliavandenilinių junginių receptoriaus branduolio translokacinis baltymas (angl. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), Sim – neuronų vystymosi baltymas (angl. *single-minded protein*). PAS motyvą turinčių baltymų randama bakterijose, archėjose bei eukariotuose – šie baltymai dalyvauja vystymosi bei deguonies homeostazės procesuose. HIF- β subvienetas identifikuotas kaip aromatinių angliavandenilinių junginių receptoriaus branduolio translokacinis baltymas (ARNT), kuris yra nuolat sintetinamas ląstelėje. O α subvienetas yra specifiškas atsakui į deguonies trūkumą ir ląstelėje funkcionuoja kaip deguonies jutiklis (Hirota, Semenza, 2005; Rocha, 2007).

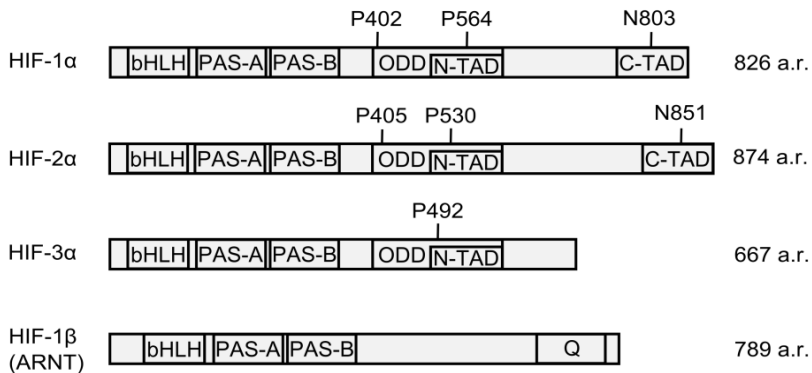
Aukštesniųjų eukariotų ląstelėse identifikuoti trys hipoksijos indukuojamų veiksnių α subvienetai: HIF-1 α , HIF-2 α (EPAS1) ir HIF-3 α (Ratcliffe, 2013; Wang, Semenza, 1995).

1.3.2.1. HIF- α struktūra ir funkcijos

Transkripcijos veiksnys HIF-1 yra vienas iš pagrindinių žinduolių ląstelių atsako į deguonies trūkumą reguliatorių. Jis aktyvuoja daugybės su hipoksija siejamų genų transkripciją (1.2 lent.) (Semenza, 2009a; Semenza, 2009b).

Geriausiai išnagrinėtas HIF-1 veiksnio α subvienetas savo N-galinėje aminorūgščių sekoje turi bHLH ir PAS motyvus, pastarasis dar skirstomas į PAS-A

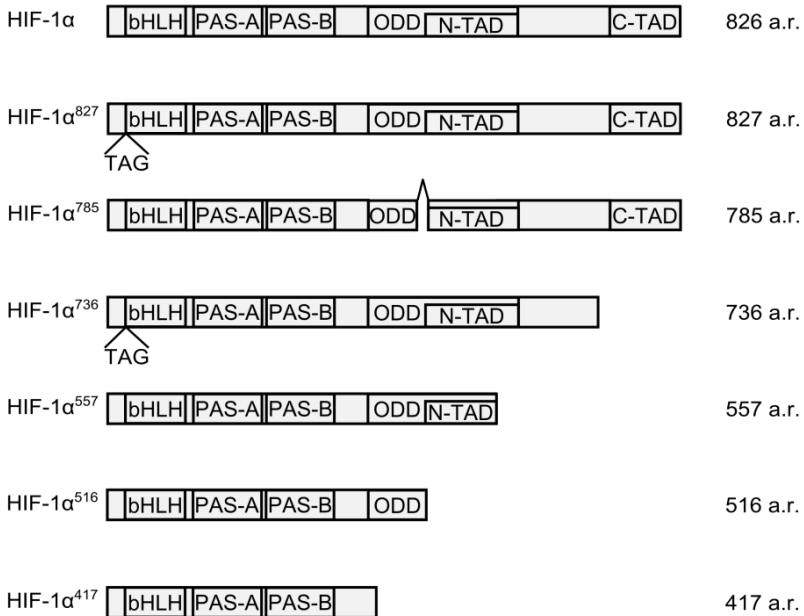
ir PAS-B sritis (1.11 pav.). Šios sritys yra reikalingos HIF veiksnio α ir β subvienetų dimerizacijai ir sąveikai su DNR, atsako į hipoksiją (angl. *hypoxia response element* – HRE) konservatyviaja 5'-RCGTG-3' (kur R yra A arba G) seka, esančia genų promotoriaus regione. C-galinėje dalyje HIF- α baltymas turi du transkripcijos aktyvacijos motyvus: N-TAD ir C-TAD (angl. *transcription activation domain*), kurie pritraukia transkripcijos koaktyviklius, pvz., p300/CBP, SRC-1, TIF2, ir aktyvina genų transkripciją. Taip pat C-galinėje HIF-1 α baltymo sekoje yra nuo deguonies koncentracijos priklausomas degradacijos motyvas ODD (angl. *oxygen dependent domain*), reguliuojantis subvieneto stabilumą (Ke, Costa, 2006; Semenza, 2014).



1.11 pav. Žmogaus HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) ir HIF- β , priklausančių bHLH/PAS transkripcijos veiksnių šeimai, struktūros schema. bHLH – spiralės-kilpos-spiralės motyvas; PAS – Per-ARNT-Sim motyvas; ODD – nuo deguonies priklausomas degradacijos motyvas; N-TAD ir C-TAD – C-galinėje dalyje esantys transkripcijos aktyvacijos motyvai; Q – daug C-galinės dalies glutamino turintis transkripcijos aktyvacijos motyvas; P ir N atitinkamai žymi modifikuojamas prolino ir asparagino aminorūgščių liekanas

Žmogaus HIF-1 α iRNR sudaryta iš 15 egzonų. Įdomu tai, kad žmogaus ląstelėse nustatytos 8 HIF-1 α iRNR izoformos, susidaranti alternatyviojo splaisingo būdu: HIF-1 α ⁸²⁷, HIF-1 α ⁷³⁶, HIF-1 α ⁵⁵⁷, HIF-1 α ⁵¹⁶, HIF-1 α ⁷⁸⁵, HIF-1 α ⁴¹⁷, HIF-1 α ^{TE}, HIF-1 α ^{1.2} (1.12 pav.). Analizuojant šiuos splaisingo variantus nustatyta, kad: HIF-1 α ⁸²⁷ atveju įterpiami trys papildomi TAG nukleotidai (1 a. r. liekana, nekeičianti nuskaitymo rėmelio) 1-o ir 2-o egzonų sandūroje; HIF-1 α ⁷⁸⁵ praleidžiamas 11 egzonas; HIF-1 α ⁷³⁶ įterpiami papildomi TAG nukleotidai 1-o ir 2-o egzonų sandūroje ir praleidžiamas 14 egzonas; HIF-1 α ⁵⁵⁷ praleidžiamas 12 egzonas; HIF-1 α ⁵¹⁶ praleidžiami 11 ir 12 egzonai; HIF-1 α ⁴¹⁷ praleidžiamas 10 egzonas. HIF-1 α ^{TE} ir HIF-1 α ^{1.2} splaisingo variantai yra panašūs į laukinio tipo HIF-1 α , tik skiriasi naudojamomis alternatyviomis promotoriaus sekomis (1.12 pav. neparodyti). Visi HIF-1 α splaisingo variantai, išskyrus HIF-1 α ⁵¹⁶, dimerizuojasi su HIF-1 β ir inicijuoja genų transkripciją (Kaur *et al*, 2005; Lee *et al*, 2004). Pastebėta, kad HIF-1 α ⁵¹⁶ pasižymi kaip neigiamas HIF-1 α reguliatorius *in vitro*. Jis sąveikauja su HIF-1 α neleidamas dimerizuotis su HIF-1 β ir tokiu būdu slopindamas HIF-1 komplekso susidarymą bei genų, kurių produktai reikalingi ląstelei išgyventi, transkripciją. Taip

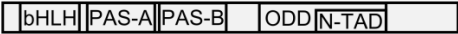
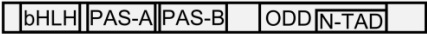
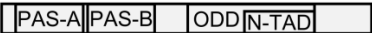



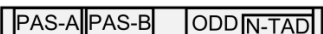
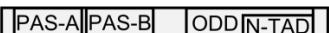
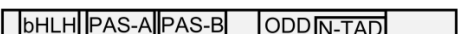

pat nustatyta, kad HIF-1 α ⁷³⁶ izoforma yra specifinė krūties navikų ląstelėms (Chun *et al*, 2002; Dales *et al*, 2010).



1.12 pav. Žmogaus HIF-1 α baltymų, susidarančių nuo alternatyviojo pre-iRNR splaisingo būdu sintetinamų iRNR izoformų (HIF-1 α ⁸²⁷, HIF-1 α ⁷⁸⁵, HIF-1 α ⁷³⁶, HIF-1 α ⁵⁵⁷, HIF-1 α ⁵¹⁶, HIF-1 α ⁴¹⁷), struktūros. bHLH – spiralės-kilpos-spiralės motyvas; PAS – Per-ARNT-Sim motyvas; ODD – nuo deguonies priklausomas degradacijos motyvas; N-TAD ir C-TAD – C-galinėje dalyje esantys transkripcijos aktyvacijos motyvai

HIF-2 α aminorūgščių sekos homologiškumas siekia 48 %, palyginti su HIF-1 α subvienetu. Abu α subvienetai yra struktūriškai bei funkciškai panašūs (1.11 pav.) (Koh, Powis, 2012). Lyginant HIF-1 ir HIF-2 raišką žinduoliuose, nustatyta, kad HIF-1 raiška randama visų audinių ir ląstelių tipuose, o HIF-2 veiksnio raiška – specifiniuose ląstelių tipuose: plaučių, širdies, inkstų, plonosios žarnos organuose ir smegenų endotelio ląstelėse (Rankin, Giaccia, 2008). Skirtingose ląstelių linijose hipoksijos indukuojami veiksniai veikia individualiai: HIF-1 veikia kaip greitas atsakas į ūmią hipoksiją (<24 val.), o HIF-2 kontroliuoja atsaką lėtinės hipoksijos metu (>24 val.).

HIF-3 α , kaip HIF-1 ir HIF-2 α subvienetai, N-galinėje aminorūgščių liekanų sekoje turi bHLH ir PAS (PAS-A ir PAS-B) motyvus (1.11 pav.), tačiau neturi C-galinėje dalyje esančio transkripcijos aktyvacijos motyvo (C-TAD). Kadangi HIF-3 α baltymas turi tik vieną transkripcijos aktyvacijos motyvą (N-TAD), todėl negali sąveikauti su koaktyvikiu p300/CBP ir tai lemia, kad HIF-3, palyginti su HIF-1 ir HIF-2 veiksniais, yra silpnas transkripcijos aktyviklis (Pasanen *et al*, 2010). HIF-3 α raiška aptinkama įvairiuose audiniuose, pavyzdžiui, plaučiuose, smegenyse, širdyje, inkstuose, kepenyse, akyse.

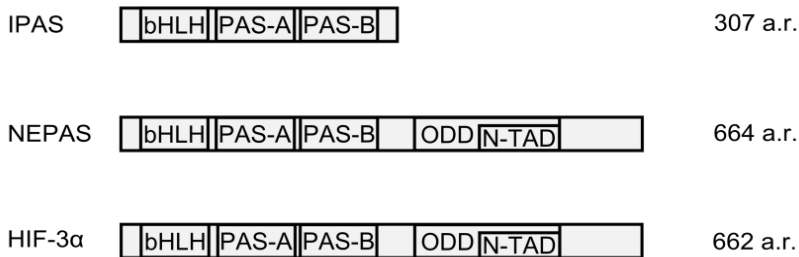
HIF-3α1		667 a.r.
HIF-3α2		632 a.r.
HIF-3α3		648 a.r.
HIF-3α4		363 a.r.
HIF-3α5		450 a.r.
HIF-3α6		237 a.r.
HIF-3α7		607 a.r.
HIF-3α8		613 a.r.
HIF-3α9		669 a.r.
HIF-3α10		7 a.r.

1.13 pav. Žmogaus HIF-3α (HIF-3α1, HIF-3α2, HIF-3α3, HIF-3α4, HIF-3α5, HIF-3α6, HIF-3α7, HIF-3α8, HIF-3α9, HIF-3α10) baltymų, susidarančių nuo alternatyviojo pre-iRNR splaisingo būdu susintetintų iRNR izoformų, struktūros. bHLH – spiralės-kilpos-spiralės motyvas; PAS – Per-ARNT-Sim motyvas; ODD – nuo deguonies priklausomas degradacijos motyvas; N-TAD – C-galinėje dalyje esantis transkripcijos aktyvacijos motyvas

Šiuo metu nustatyta, kad žmogaus HIF-3α sudarytas iš 17 egzonų. Žmogaus ląstelėse alternatyviojo splaisingo būdu susidaro 10 HIF-3α iRNR izoformų: HIF-3α1, HIF-3α2, HIF-3α3, HIF-3α4, HIF-3α5, HIF-3α6, HIF-3α7, HIF-3α8, HIF-3α9 ir HIF-3α10 (Heikkilä *et al*, 2011; Maynard *et al*, 2003). Visos šios iRNR izoformos turi tris alternatyvias transkripcijos pradžios sekas unikalčiuose 1a, 1b, 1c egzonuose, taip pat 13 ir 14 egzonai turi atitinkamai dvi ir tris alternatyvias formas, nuo kurių sintetinami skirtingų funkcijų baltymai (1.13 pav.). Esant deguonies trūkumui, visos žmogaus HIF-3α izoformos lokalizuojasi branduolyje ir tik HIF-3α4 – citoplazmoje. Visi HIF-3α splaisingo variantai gali sąveikauti su HIF-β. Iš šių izoformų išsiskiria žmogaus HIF-3α4, kuris nesąveikauja su β subvienetu, bet sąveikauja su HIF-1α baltymu ir slopina HIF-1 transkripcinį aktyvumą (Maynard *et al*, 2005). Literatūroje parodyta, kad padidinta HIF-3α4 izoformos raiška slopina meningiomas ląstelius

proliferaciją ir sumažina neovaskuliarizaciją bei gliukozės metabolizmą meningiomose atveju (Ando *et al*, 2013).

Pelės HIF-3 α iRNR sudaryta iš 15 egzonus. Nustatytos dvi HIF-3 α iRNR izoformos, susidarančios alternatyviojo splaisingo būdu: IPAS (angl. *inhibitory PAS protein*) ir NEPAS (angl. *neonatal and embryonic PAS protein*) (Heikkila *et al*, 2011). IPAS baltymo raiška būdinga tik hipoksinėms ląstelėms (Makino *et al*, 2002). Lyginant pelės HIF-3 α ir IPAS baltymų struktūras nustatyta, kad pastarasis C-galinėje aminorūgščių liekanų sekoje neturi abiejų transkripcijos aktyvacijos (N-TAD ir C-TAD) motyvų ir nuo deguonies priklausomo degradacijos ODD motyvo (1.14 pav.). Palyginus HIF-3 α ir IPAS iRNR sekas nustatyta, kad IPAS turi tris unikalius 1a, 4a, 16 egzonus, taip pat du trumpesnius egzonus: 3-io egzono 3' taikinio sekoje trūksta 14 nt, o 6-o egzono 5' taikinio seka trumpesnė 87 nt, palyginti su HIF-3 α seka. IPAS iRNR brendimo metu tarp 3-io ir 4-o egzono įterpiamas papildomas 4a egzonas, kuris HIF-3 α iRNR sintezės atveju praleidžiamas, ir įjungiamas papildomas 16 egzonas (3.10 pav., A). Šie skirtumai nulemia unikalias IPAS baltymo funkcijas (Makino *et al*, 2002).



1.14 pav. Pelės IPAS, NEPAS ir HIF-3 α baltymų struktūros schema. bHLH – spiralės-kilpos-spiralės motyvas; PAS – Per-ARNT-Sim motyvas; ODD – nuo deguonies priklausomas degradacijos motyvas; N-TAD – C-galinėje dalyje esantis transkripcijos aktyvacijos motyvas

IPAS nesudaro heterodimero su HIF- β subvienetu ir formuoja neaktyvius kompleksus su HIF- α baltymu – tai trukdo HIF α ir β subvienetų sąveikai. Susidaręs IPAS-HIF- α kompleksas nesąveikauja su DNR HRE seka, dėl to nevyksta nuo HIF veiksnio priklausomas genų transkripcijos aktyvinimas. Pelių smegenų Purkinjė ląstelėse bei akies ragenos epitelio ląstelėse rasta didžiausia IPAS baltymo raiška ir sumažėjusi nuo hipoksijos priklausomo kraujagyslių endotelio augimo veiksnio VEGF (angl. *vascular endothelial growth factor*) raiška. Tai rodo, kad IPAS inhibuoja nuo hipoksijos priklausomų genų transkripcinį aktyvumą, ir leidžia nustatyti IPAS neigiamą funkciją HIF-1 reguliavimo procese (Makino *et al*, 2007). Todėl šis baltymas ir buvo pavadintas inhibitoriniu PAS motyvą turinčiu baltymu (IPAS).

Kitas alternatyviojo HIF-3 α splaisingo variantas – NEPAS, rastas pelės embriono ir naujagimių plaučių ir širdies kraujagyslių endotelio ląstelėse. HIF-3 α retai aptinkamas pelių embriono vystymosi metu ir naujagimiuose. Tyrimai atskleidė, kad NEPAS yra svarbus plaučių formavimuisi ir širdies vystymuisi.

Lyginant HIF-3 α ir NEPAS iRNR izoformų sekas nustatyta, kad NEPAS baltymo pirmos 8 a. r. yra koduojamos IPAS 1a egzono, o nuo 2-o egzono iki 15-o – HIF-3 α (1.14 pav.). Literatūroje parodyta, kad NEPAS, kaip ir HIF-3 α , dimerizuojasi su HIF- β subvienetu ir veikia kaip silpnas transkripcijos aktyviklis (10 kartų silpniau nei HIF-1/2 α) (Yamashita *et al*, 2008).

1.3.2.2. HIF- β struktūra ir funkcijos

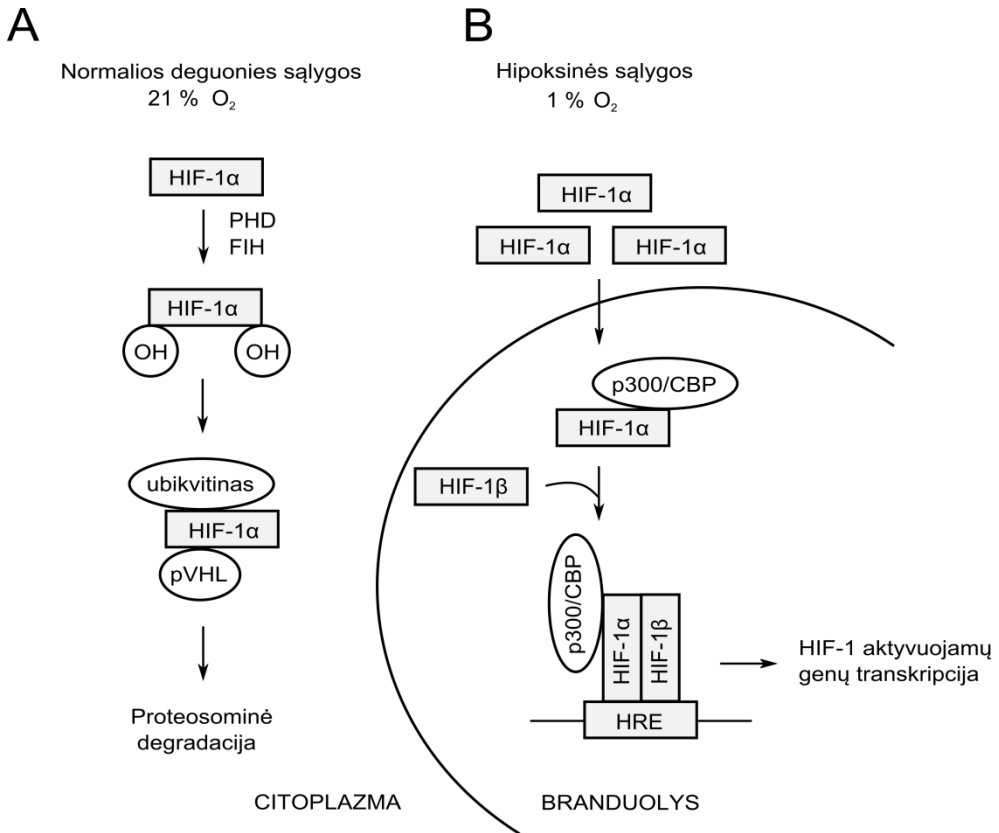
HIF- β , kaip ir α subvieneto, N-galinėje aminorūgščių sekoje yra bHLH ir PAS motyvai, o C-galinėje sekoje ARNT turi daug glutamino (Q) turintį transkripcijos aktyvacijos motyvą (1.11 pav.). Taip pat yra identifikuotas dar vienas HIF β subvienetas – ARNT2. Palyginus ARNT2 ir ARNT aminorūgščių sekas, nustatytas 63 % identiškumas. O jų raiška skirtingų žmogaus organų ląstelėse skiriasi: ARNT raiška pastovi visų tipų ląstelėse, o ARNT2 raiška randama tik centrinės nervų sistemos ir inkstų ląstelėse. Abu β subvienetai dimerizuojasi su visais bHLH/PAS šeimos nariais ir sudaro transkripciškai aktyvius heterodimerinius kompleksus (Aitola, Pelto-Huikko, 2003; Dougherty, Pollenz, 2008).

1.3.3. Hipoksijos indukuojamo veiksnio 1 (HIF-1) reguliacija ląstelėje

HIF-1 α subvieneto kiekis ląstelėje priklauso nuo deguonies koncentracijos aplinkoje. Esant normalioms deguonies sąlygoms, HIF-1 α subvienetas nuolat sintetinamas, hidroksilinamas ir degraduojamas proteosomoje (gyvavimo pusperiodis ~5 min.). Fermentai prolilhidroksilazės (angl. *prolyl hydroxylase domain containing proteins* – PHD) katalizuoja prolyno aminorūgščių liekanų, esančių HIF- α baltymo ODD motyve, hidroksilinimą (HIF-1 α atveju yra hidroksilinamos Pro402 ir (arba) Pro564, HIF-2 α – Pro405 ir (arba) Pro531, HIF-3 α – Pro492 aminorūgščių liekanos). Šiuo metu eukariotinėse ląstelėse rastos 3 prolilhidroksilazės (PHD1, PHD2, PHD3), priklausančios Fe(II) ir 2-oksoglutarato oksigenazių šeimai. Šių fermentų aktyvumas priklauso nuo deguonies koncentracijos. Hidroksilintą α subvienetą atpažįsta von Hippelio-Lindau (pVHL) baltymas, pasižymintis E3 ubikvitino ligazės aktyvumu. pVHL baltymas prisijungia prie HIF-1 α subvieneto ir jį ubikvitilina, yra nukreipiamas į 26S proteosomą ir ten degraduojamas (1.15 pav., A) (Ruas, Poellinger, 2005; Zimna, Kurpisz, 2015).

HIF- α subvienetų aktyvumo reguliacijos procese taip pat dalyvauja deguoniui jautrus fermentas FIH-1 (angl. *factor inhibiting HIF*), priklausantis oksigenazių šeimai, kaip PHD hidroksilazės. FIH-1 hidroksilina asparagino 803 aminorūgšties liekaną, esančią HIF-1 α baltymo C-TAD motyve. Hidroksilintas HIF-1 α nesąveikauja su p300/CBP, ir tokiu būdu slopinamas HIF-1 aktyvumas (Mahon *et al*, 2001).

PHD šeimos baltymai ir FIH-1 katalizuoja dioksigenazės reakcijas; kaip substratas naudojamas deguonis, α -ketoglutaratas ir kofaktorius Fe(II), kur vienas deguonies atomas prijungiamas prie HIF- α prolyno / asparagino aminorūgšties liekanos, o kitas deguonies atomas – prie α -ketoglutarato, suformuojant sukcinatą ir CO₂ (Chowdhury *et al*, 2008).



1.15 pav. HIF-1 α reguliacijos normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis schema (Zimna, Kurpisz, 2015). *A* – normaliomis deguonies sąlygomis HIF-1 α hidroksilinamas, ubikvitilinamas ir degraduojamas proteosomoje; *B* – hipoksinėmis sąlygomis HIF-1 α subvienetas stabilizuojamas, pernešamas į ląstelės branduolį ir jame dimerizuojasi su β subvienetu, sudaro aktyvųjį transkripcijos HIF-1 veiksnį

Kitos HIF-1 α aktyvumui ir stabilumui svarbios modifikacijos yra: aminorūgšties lizino 532 liekanos acetilinimas, kuris sustiprina sąveiką su pVHL baltymu ir taip skatina HIF-1 α baltymo degradaciją (Jeong *et al.*, 2002); aminorūgšties lizino 391 ir 477 sumoilinimas, kuris inhibuoja jo degradaciją ir padidina HIF-1 transkripcinį aktyvumą (Shao *et al.*, 2004).

Deguonies trūkumo sąlygomis HIF-1 α baltymo ODD motyve esančios prolino aminorūgščių liekanos nehidroksilinamos, dėl to su juo nesąveikauja E3 ubikvitino ligazės aktyvumu pasižymintis pVHL baltymas ir todėl HIF-1 α subvienetas stabilizuojamas (1.15 pav., *B*). HIF-1 α pernešamas į ląstelės branduolį, jame dimerizuojasi su HIF-1 β baltymu dalyvaujant transkripcijos koaktyvikiui p300/CBP ir inicijuojama transkripcijos aktyvacija. Susidaręs transkripciškai aktyvus HIF-1 baltymo kompleksas jungiasi prie DNR HRE sekos ir inicijuoja genų, padedančių ląstelėms išgyventi sumažėjusios deguonies koncentracijos aplinkoje sąlygomis, transkripciją. Nustatyta, kad žmogaus ląstelėse HIF-1 aktyvuoja apie 150 įvairių

genų transkripciją (1.2 lent.). Šis sąrašas nuolat ilgėja – tai įrodo, kad HIF-1 yra svarbus veiksnys patofiziologiniuose procesuose (Kaelin, Ratcliffe, 2008).

1.2 lentelė. HIF-1 aktyvuojami genai (Lee *et al*, 2004; Semenza, 2003)

Funkcijos	Genai
Ląstelės proliferacija	ciklinas G2; p53 inhibuojantis baltymas (WAF-1); augimą transformuojantys veiksniai (TGT- α , TGT β 3); insulinoidinis augimo veiksnys IGF-2; insulinoidinį augimo veiksnį jungiantys baltymai (IGF-BP1, IGF-BP2, IGF-BP3);
Ląstelės išgyvenimas	adrenomedulinas (ADM); eritropoetinas (EPO); azoto monoksido sintazė (NOS2); insulinoidinis augimo veiksnys (IGF-2); insulinoidinį augimo veiksnį jungiantys baltymai (IGF-BP1, IGF-BP2, IGF-BP3); augimą transformuojantis veiksnys (TGF- α); kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (VEGF);
Apoptozė	proapoptotiniai baltymai (NIP3, NIX); nuo streso priklausomas baltymas (RTP801);
Judėjimas	gliukozės fosfato izomerazė (AMF/GPI); hepatocitų augimo veiksnio receptoriai (c-MET); su LDL receptoriu susijęs baltymas (LRP1); augimą transformuojantis veiksnys (TGF- α);
Citoskeleto struktūra	vimitinas (VIM); keratinai (KRT14, KRT18, KRT19);
Ląstelių adhezija	glikoproteinas (MIC2);
Eritropoezė	eritropoetinas (EPO);
Angiogenezė	endokrinių liaukų VEGF (EG-VEGF); endoginas (ENG); leptinas (LEP); su LDL receptoriu susijęs baltymas (LRP1); augimą transformuojantis veiksnys (TGF- β 3); kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (VEGF);
pH reguliacija	karboanhidrazė IX (CAIX);
Kraujagyslių tonusas	adrenomedulinas (ADM); endotelinas (ET1); azoto monoksido sintazė (NOS2); hemo oksigenazė 1; α 1B-adrenerginis receptoriai; adenilato kinazė 3; ekto-5'-nukleotidazė;
Nukleotidų metabolizmas	transferinas; transferino receptoriai; ceruloplazminas;
Geležies metabolizmas	heksokinazės (HK1, HK2); gliukozės fosfato izomerazė (AMF/GPI); enolazė (ENO1); fosfofruktokinazė PFKL; gliukozę pernešantis baltymas (GLUT1); glicerinaldehido-3-fosfato dehidrogenazė GAPDH;
Gliukozės metabolizmas	laktato dehidrogenazė LDHA; fosfoglicerato kinazė (PGK1); piruvatkinazė (PKM); triozių fosfatų izomerazė (TPI); aldolazės (ALDA, ALDC);
Energijos metabolizmas	leptinas (LEP);
Tarpląstelinio užpilo metabolizmas	katepsinas (CATHD); V tipo kolagenas (α 1); fibronektinas (FN1); metaloproteinazė (MMP2); prolil-4-hidroksilazė α (1); plazminogeno aktyvoklio inhibitorius (PAI1); urokinazės plazminogeno aktyvinimo receptoriai (UPAR);
Aminorūgščių metabolizmas	transglutaminazė 2
Atsparumas vaistiniams preparatams	kšenobiotikų kiekį mažinantis glikoproteinas (MDR1)
Epitelinė homeostazė	žarnų treofilinis veiksnys
Transkripcijos reguliacija	diferencijuotų chondrocitų baltymai (DEC1, DEC2); ląstelės branduolio receptoriai (NUR77);
HIF-1 aktyvumo reguliacija	su p300/CBP sąveikaujantis baltymas p53 (P35srj).

1.3.4. Hipoksijos veikiama genų raiška, pre-iRNR splaisingas ir ligos

Organizme vykstantys fiziologiniai ir patologiniai procesai, susiję su deguonies homeostaze, yra reguliuojami hipoksijos indukuojamų veiksmių.

Susidarius hipoksinėms sąlygoms, HIF-1 veiksnys aktyvuoja daugybės genų transkripciją, susijusią su įvairių ligų, pvz., infarkto, išeminės širdies ligos, periferinių ir koronarinių arterijų ligų, širdies nepakankamumo, anemijos, plaučių arterijos hipertenzijos, obstrukcinės miego apnėjos, eritrocitozės, onkologinių ligų, atsiradimu ir vystymusi. Nustatyta, kad deguonies trūkumo zonos ypač būdingos navikams. Atlikus imunohistocheminius žmogaus naviko biopsijos analizės tyrimus nustatytas HIF-1 α ir (arba) HIF-2 α baltymų kiekio padidėjimas daugelyje navikų, palyginti su sveikais audiniais. Tai skatina ląstelių išgyvenamumą ir kartu naviko progresavimą onkologinių ligų, pvz., šlapimo pūslės, smegenų, krūties, gaubtinės žarnos, stemplės, galvos ar kaklo, kepenų, plaučių, kasos, odos, skrandžio, gimdos, taip pat ūmios limfocitinės bei mieloidinės leukemijos atvejais (Semenza, 2014). Pastebėta, kad padidėjęs HIF-1 α raiškos lygis koreliuoja su blogesne ligos prognoze ir yra susijęs su mažiau efektyviu gydymu ir didesniu mirtingumu. Nustatyta, kad slopinant HIF-1 aktyvumą sumažėja naviko augimas, vaskuliarizacija ir energijos metabolizmas. Dėl šios priežasties HIF-1 inhibicija gali būti taikoma vėžinių ligų terapijoje (Masoud, Li, 2015; Semenza, 1999; Semenza, 2002).

Kaip minėta, ląstelėms prisitaikant prie deguonies trūkumo sąlygų, jose pradeda keistis genų, reguliuojančių ląstelei išgyventi reikalingus biologinius procesus, pvz., gliukozės metabolizmą, ląstelės proliferaciją, migraciją bei angiogenezę ir kt. (1.2 lentelė), raiška. Be genų transkripcijos pokyčių, vyksta ir alternatyviojo pre-iRNR splaisingo pakitimai. Nuo susidariusių pakitusių iRNR izoformų sintetinami baltymai, reikalingi ląstelei išgyventi hipoksinėmis sąlygomis, skiriasi savo aktyvumu ir funkcijomis. Pavyzdžiui, sudarius hipoksiją imituojančias (CoCl₂, 24 val.) sąlygas, žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelėse (HUVEC) nustatyti 1583 genai, kurių raiška pakitusi: 300 genų raiška padidėjo ir 1283 genų – sumažėjo. Detektuoti 342 alternatyviojo splaisingo variantai, priklausę 293 transkriptams, lemiantys genų raiškos pokyčius (Hang *et al.*, 2009). Tiriant genų raiškos pokyčius HUVEC ląstelėse, inkubuotose hipoksinėmis sąlygomis (1% O₂, 48 val.), rasti 294 genai, iš kurių 61 vyksta alternatyvusis splaisingas, ir pakitusi raiška: 86 su angiogeneze ir gliukozės metabolizmu susijusių genų raiška padidėjo, o 208 už ląstelės ciklą ir DNR pažaidų taisymą atsakingų genų raiška sumažėjo (Weigand *et al.*, 2012).

Nustatyta, kad hipoksinėmis sąlygomis žmogaus kepenų vėžinėse Hep3B ląstelėse 2005 genai sudaro 3059 alternatyviojo splaisingo variantus: egzono praleidimas arba įterpimas sudaro 51 %, alternatyvus 5' taikinio sekos panaudojimas – 16 %, alternatyvus 3' taikinio sekos panaudojimas – 14 %, introno išsaugojimas – 11 %, vieno iš dviejų egzonų pasirinkimas – 4 % visų splaisingo variantų. Egzono praleidimas arba įterpimas yra hipoksinėse ląstelėse dažniausiai pasitaikantis alternatyviojo splaisingo variantas (Sena *et al.*, 2014).

Neseniai literatūroje buvo parodyta, kad HIF-1 stabilizacija ir transkripcijos aktyvacija esant ūmiai hipoksijai daro įtaką neurodegeneracinėms (Alzheimerio, Parkinsono ir Huntingtono) ligoms (Correia, Moreira, 2010). Žinoma, kad ypač jautriai į deguonies koncentracijos pokyčius aplinkoje reaguoja smegenys. Nervinėse ląstelėse prasideda patologiniai procesai, pvz., aprūpinimo deguonimi ir gliukoze sutrikimas, geležies homeostazė, būdingi visoms neurodegeneracinėms ligoms.

Atlikus tyrimus su pelėmis nustatyta, kad hipoksinėmis sąlygomis aktyvaus HIF-1 α baltymo susidarymas gali apsaugoti neuronus nuo pažeidimų, nes inicijuoja genų, pvz., gliukozės nešiklio (GLUT) ir angiogenezės veiksnio (VEGF), kurie padeda aprūpinti gliukoze ir deguonimi nervines ląsteles, raiškos padidėjimą. Parkinsono ligos atveju HIF-1 aktyvuoja dopamino sintezę ir skatina dopaminerginių neuronų augimą. Šie tyrimai rodo, kad trumpos ir švelnios hipoksijos sąlygomis HIF-1 aktyvumo padidėjimas neurodegeneracinių ligų atvejais gali turėti apsauginį poveikį nervinėms ląstelėms (Zhang *et al*, 2011). Tačiau lėtinio atsako į hipoksiją metu sukeliama neuronų funkcijų pažeidimai, lemiantys jų žūtį.

Pažymėtina, kad nuo hipoksijos priklausomų genų raiškos ir alternatyviojo pre-iRNR splaisingo tyrimai yra svarbūs plečiant žinias apie hipoksinėje ląstelėje vykstančius procesus, todėl reguliuojančiųjų veiksnių nustatymas gali padėti užkirsti kelią minėtų ligų vystymuisi bei progresavimui ir atrasti naujus ligų žymenis.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

Agarozė; bromfenolio mėlis; etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA); glicerolis; natrio hidrofosfatas; tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris), *Tween-20*; mielių ekstraktas; triptono peptono mišinys; 4-(2-hidroksietil)-1piperazin-etansulfonrūgštis (HEPES); chloroformas; fenolis; glicinas; pieno milteliai; Kumasio briliantinio mėlio dažas R-250; hidrochinonas; izopropilo alkoholis; natrio tiosulfatas; karbamidas (UREA); *Tween-20* (*Roth*, Vokietija).

Fetalinis veršiuko serumas (FBS); L-glutaminas; penicilinas / streptomicinas; tripsinas / EDTA (*Biochrom*, Vokietija).

Acto rūgštis; 2-merkaptioetanolis (*Merck*, Vokietija).

Chromatografinis popierius; nitroceliuliozinė baltymų pernešimo membrana (*Whatman, Schleicher & Schuell*, Vokietija).

Biotin-16-UTP, 1 × proteazių inhibitorius (*Roche Diagnostics*, Vokietija).

Roswell Park memorialinio instituto terpė (RPMI 1640); Dulbecco modifikuota *Eagle* terpė (DMEM) (*Lonza*, Šveicarija).

N,N,N',N'-tetrametiletilendiaminas (TEMED); akrilamidas; bisakrilamidas; amonio peroksodisulfatas (APS); fenilmetilsulfonilfluoridas (PMSF); betainas; kalio fluoridas; ksilencianolis; natrio bikarbonatas; guanidino hidrochloridas (*Fluka*, Šveicarija).

Cap nukleotidas ($m^7G^5'pppG^5'$), TMB reagentas; *Repel-Silan* tirpalas (*Amersham Pharmacia Biotech*, Didžioji Britanija).

Boro rūgštis; jaučio serumo albuminas (BSA); etidžio bromidas; kalio chloridas; kalio dihidrofosfatas; kalio bromidas; kalio hidroksidas; kalio fosfatas; natrio chloridas; natrio hidroksidas; natrio acetatas; natrio karbonatas; natrio azidas; natrio sulfitas; natrio dodecilsulfatas (SDS); ditionitritolis (DTT); metilo alkoholis; magnio chloridas; amonio acetatas; amonio sulfatas; amonio chloridas; kalcio chloridas; kreatinfosfatas; ličio chloridas; metolis; polivinilo alkoholis (PVA); tRNR; ampicilinas; ficolio reagentas; tripano mėlis; izopentilo alkoholis (*Sigma*, JAV).

$[\gamma\text{-P}^{32}\text{]-ATP}$; $[\alpha\text{-P}^{32}\text{]-CTP}$ (*PerkinElmer Life Sciences*, JAV).

Streptavidinagarozė (*Novagen*, JAV).

dNTP; NTP; formamidas; Bradfordo reagentas (*Coomassie Plus*); *Lipofectamine RNAiMAX* transfekcijos reagentas; *Ponceau S*; LMP agarozė; dimetilsulfoksidas (DMSO), baltymo-G dalelė (*Thermo Fisher Scientific*, JAV).

Natrio heparinas (*AppliChem*, JAV).

Druskos rūgštis (*Chempur*, Lenkija).

Etilo alkoholis (*Vilniaus degtinė*, Lietuva).

Skystas azotas (*Achema*, Lietuva).

2.1.2. Tirpalai

DNR elektroforezei:

1 × Tris – acetatinis buferinis tirpalas (TAE) (pH 7,2): 40 mM Tris, 20 mM CH₃COOH, 1 mM EDTA (pH 8,0).

Agarozės gelio tirpalai: 1 %, 1,5 % agarozės 1 × TAE buferiniame tirpale.

1 × Tris – boratinis buferinis tirpalas (TBE) (pH 8,0): 45 mM Tris, 45 mM H₃BO₃, 1 mM EDTA.

Etidžio bromido tirpalas: 0,5 µg/ml etidžio bromidas.

In vitro transkripcijai:

40 % *Maxam* gelio tirpalas (AA:bis-AA = 29:1): 29 dalys akrilamido, 1 dalis bisakrilamido.

4 % *Maxam* poliakrilamidinis gelis: 4 % akrilamido tirpalas (gaunamas iš 40 % *Maxam* gelio tirpalo (29:1)), 1 × TBE buferinis tirpalas, 7 M karbamidas, 0,06 % amonio peroksoulfatas, 0,03 % TEMED.

RNR mėginių elektroforezės poliakrilamidiniam geliui dažas: 80 % formamidas, 0,5 M Tris-HCl (pH 7,9), 0,1 M EDTA (pH 8,0), 0,3 % bromfenolio mėlis, 0,3 % ksileno cianolas.

RNR elucijos buferinis tirpalas: 0,75 M amonio acetatas, 0,1 % SDS, 10 mM magnio acetatas, 0,1 mM EDTA (pH 8,0).

Fenolio, chloroformo ir izopentilo alkoholio mišinys: 25 dalys fenolio, 24 dalys chloroformo, 1 dalis izopentilo alkoholio.

Chloroformo ir izopentilo alkoholio mišinys: 24 dalys chloroformo, 1 dalis izopentilo alkoholio.

70 % etilo alkoholio tirpalas: 70 % etilo alkoholis (v/v).

Pre-iRNR splaisingui in vitro:

40 % *Sanger* gelio tirpalas (AA:bis-AA = 19:1): 38 % akrilamidas, 2 % bisakrilamidas.

6 % *Sanger* poliakrilamidinis gelis: 6 % akrilamido tirpalas (gaunamas iš 40 % *Sanger* gelio tirpalo (19:1)), 1 × TBE buferinis tirpalas, 7 M karbamidas, 0,06 % amonio peroksoulfatas, 0,03 % TEMED.

Poliakrilamidinio gelio fiksavimo tirpalas: 10 % etanolis, 10 % acto rūgštis.

8 % *Sanger* poliakrilamidinis gelis: 8 % akrilamido tirpalas (gaunamas iš 40 % *Sanger* gelio tirpalo (19:1)), 1 × TBE buferinis tirpalas, 7 M karbamidas, 0,06 % amonio peroksoulfatas, 0,03 % TEMED.

Buferinis D tirpalas: 20 mM HEPES (pH 7,9), 20 % glicerolis 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 mM DTT.

Proteinazės K buferinis tirpalas: 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 % SDS.

Baltymų elektroforezei:

1 × baltymų elektroforezės buferinis tirpalas: 25 mM Tris, 250 mM glicinas, 0,1 % SDS.

2 × baltymo mėginio dažas: 0,12 M Tris (pH 6,8), 4 % SDS, 20 % glicerolis, 25 mM EDTA (pH 8,0), 20 % bromfenolio mėlis, 2 % 2-merkaptioetanolis.

Akrilamido ir bisakrilamido tirpalas: 30 % akrilamidas, 0,8 % bisakrilamidas.

Amonio peroksosulfato tirpalas: 10 % amonio peroksosulfatas.

SDS tirpalas: 10 % SDS.

1,5 M Tris tirpalas: 1,5 M Tris (pH 8,8).

1 M Tris tirpalas: 1 M Tris (pH 6,8).

Kumasio briliantinio mėlio dažas: 40 % etanolis, 10 % acto rūgštis, 0,1 % Kumasio briliantinio mėlio R-250 dažas.

Plovimo tirpalas: 30 % etanolis, 10 % acto rūgštis.

Imunohibridizacijai Western blot metodu:

1 × baltymų pernešimo buferinis tirpalas: 26 mM Tris, 108 mM glicinas, 20 % metanolis.

1 × PBS buferinis tirpalas: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄×2H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄.

1 × TBST buferinis tirpalas: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5 M EDTA tirpalas (pH 8,0), 0,05 % Tween-20.

Blokavimo buferinis tirpalas: 5 % pieno milteliai 1 × TBST buferiniame tirpale.

Ryškinimo tirpalai:

Ryškalas: 0,022 M metolis, 0,57 M Na₂SO₃, 0,08 M C₆H₄(OH)₂, 0,45 M Na₂CO₃, 0,034 M KBr.

Fiksažas: 1 M Na₂S₂O₃, 0,6 M (NH₄)₂SO₂.

Mitybinės terpės:

HeLa ląstelių auginimo terpė: DMEM terpė, 10 % FBS, 2 mM L-glutaminas, 100 U penicilino ir 0,1 mg/ml streptomicino mišinys.

LB terpė *E. coli* auginti: 1 % triptono ir peptono mišinys, 0,5 % mielių ekstraktas, 0,5 % NaCl.

Agarizuota LB terpė: 1,5 % agarų LB terpėje.

Šaldymo terpė: 10 % DMSO fetaliniame veršiuko serume.

Kompetentinių *E. coli* ląstelių paruošimas:

MgCl₂ tirpalas: 0,1 M MgCl₂.

CaCl₂ tirpalas: 0,1 M CaCl₂.

Laikymo tirpalas: 0,1 M CaCl₂, 12 % glicerolis.

RNR ir baltymų kompleksų skyrimo tirpalai:

10 × heparino dažas (ruošiamas 1 × TBE buferiniame tirpale): 6,5 mg/ml heparino sulfatas, 40 % glicerolis, 0,5 % bromfenolio mėlis, 0,5 % ksileno cianolas.

Agarozinio gelio fiksavimo tirpalas: 10 % acto rūgštis, 10 % metanolis.

1,5 % LMP agarozės tirpalas: 1,5 % LMP agarozė 0,5 × TBE buferiniame tirpale.

Plazmidinės DNR skyrimo tirpalai:

TE buferinis tirpalas: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0).

NaOH-SDS tirpalas: 1 % SDS, 0,1 M NaOH.

Natrio acetato tirpalas (pH 4,8): 3 M CH₃COONa.

LiCl tirpalas: 10 M LiCl.

TER buferinis tirpalas: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8,0), 20 µg/ml RNazė.

Branduolių ekstrakto skyrimo tirpalai:

Buferinis tirpalas A: 10 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT.

Buferinis tirpalas C: 20 mM HEPES (pH 7,9), 25 % glicerolis, 0,6 M KCl, 0,2 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 mM DTT.

Dializės buferinis tirpalas: 20 mM HEPES (pH 7,9), 20 % glicerolis, 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 mM DTT.

Tripano mėlio dažas: 0,4 % tripano mėlis.

SR baltymų skyrimo tirpalai:

Izoliacinis buferinis tirpalas: 65 mM KCl, 15 mM NaCl, 10 mM HEPES (pH 7,6), 10 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM DTT, 5 mM KF, 5mM β-glicerolfosfatas, 0,2 mM PMSF, 2 µg/ml aprotininas.

Dializės buferinis tirpalas: 65 mM KCl, 15 mM NaCl, 10 mM HEPES (pH 7,6), 1 mM EDTA (pH 8,0), 2 mM DTT, 5 mM KF, 5 mM β-glicerolfosfatas, 0,2 mM PMSF.

5 % glicerolio buferinis D tirpalas: 20 mM HEPES (pH 7,9), 5 % glicerolis, 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF.

90 % amonio sulfato įsotintas izoliacinis buferinis tirpalas: 90 % amonio sulfato izoliaciniame buferiniame tirpale.

Dviejų dimensijų gelio analizės tirpalai:

1 × 2D elektroforezės rehidracijos mėginio buferinis tirpalas: 7 M karbamidai, 2 % CHAPS detergentas, 0,5 % amfolitai (pH 3–10), 0,002 % bromfenolio mėlis, 0,05 M DTT.

1 × 2D elektroforezės buferinis tirpalas: 0,3 % Tris, 1,44 % glicinas, 0,1 % SDS.

1 × 2D elektroforezės mėginio dažas: 50 mM Tris-HCl (pH 8,8), 6 M karbamidai, 30 % glicerolis, 2 % SDS, 0,002 % bromfenolio mėlis.

1,5 M DTT tirpalas: 1,5 M DTT.

Tirpalai chromatino imunoprecipitacijai:

Formaldehido tirpalas: 1 % formaldehido tirpalas.

Buferinis tirpalas I: 0,25 % Triton-X100, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH 6,5).

Buferinis tirpalas II: 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH 6,5).

Lizės buferinis tirpalas: 1 % SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 × proteazių inhibitorius.

Skiedimo buferinis tirpalas: 1 % Triton-X100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 × proteazių inhibitorius.

TSE I buferinis tirpalas: 0,1 % SDS, 1 % Triton-X100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,1), 150 mM NaCl.

TSE II buferinis tirpalas: 0,1 % SDS, 1 % Triton-X100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,1), 500 mM NaCl.

TSE III buferinis tirpalas: 0,25 M LiCl, 1 % natrio dezoksicholatas, 1 mM EDTA, 1 % NP-40 detergentas, 10 mM Tris-HCl (pH 8,1).

Eliucijos buferinis tirpalas: 1 % SDS, 0,1 M NaHCO₃.

2.1.3. Rinkiniai

DNR skyrimo iš agarozės gelio rinkinys *GeneJET™ Gel Extraction Kit*, DNR gryninimo rinkinys *GeneJet PCR Purification Kit*, atvirkštinės transkripcijos rinkinys *RevertAid™ RT Kit*, realaus laiko PGR rinkinys *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix*, citoplazminio ir branduolių ekstrakto skyrimo rinkinys *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific, JAV)* ir RNR skyrimo iš eukariotinių ląstelių rinkinys *Quick-RNA™ Miniprep Kit (Zymo Research)*.

2.1.4. Plazmidinė DNR ir oligonukleotidai DNR amplifikacijai PGR metodu

PGR fragmentams klonuoti naudota *pBluescript II KS (+)* plazmidinė DNR (*Thermo Fisher Scientific, JAV*).

Oligonukleotidai PGR amplifikacijos reakcijoms buvo gauti iš *Metabion (Vokietija)* (2.1 lent.).

2.1 lentelė. Darbe naudoti oligonukleotidai (pradmenys)

Pavadinimas	Nr.	Pradmenų sekos
MAO-B _g	P1/P2	(5'-d(AAGGAGAGCTCGGATTTACTTTGCAGGCACC)-3')/ (5'-d(TTCCTAAGCTTCTGGAGAGTTGGTCTCCAGG)-3')
MAO-B _a	P3/P4	(5'-d(AAGGAAAGCTTTTATZCCACAGGAGAAAGACC)-3')/ (5'-d(TTCCTCTCGAGCAGACTCTGGTTCTGACTGC)-3')
β-globin	P5/P6	(5'-d(AAGGAGAGCTCGAATACAAGCTTGGGCTG)-3')/ (5'-d(TTCCTCTGCAGGGCGACTACTCTGTTTCTAC)-3')
β-globin- MAO-B	P7/P8	(5'-d(AAGGACTGCAGTTTATGGGAGCAGATTAGAAG)-3')/ (5'-d(TGGGTAGACAACCAGCCTGAAATGAAAGAACACACTGG)-3')
HIF-3α	P9/P10 P11/P12	(5'-d(AAGGATCTAGAAGAGCCACTGGACGCCTGC)-3')/ (5'-d(TTCCTAAGCTTCCATCACCAGTGGGGGTGTG)-3')/ (5'-d(AAGGAAAGCTTGAGAGCAGACATGACTGCTG)-3')/ (5'-d(TTCCTCTCGAGTCTTTGACAGGTTCCGGCCTGG)-3')
IPAS	P9/P10 P13/P14	(5'-d(AAGGAAAGCTTGATCAGCAGGGAGTGGACAC)-3')/ (5'-d(TTCCTCTCGAGAGAGAAATTGGTACCA GGAGTG)-3')
β-globin	P15/P16	(5'-d(ATTAATACGACTCACTATAGAATACAAGCTTGGGCTG)-3')/ (5'-d(GAGGACAGGTCCCCAAAG)-3')
CLK1	P17/P18	(5'-d(ATTTTGTGTGGTGGTGC CGA)-3')/ (5'-d(TCCTTCGGTGACTCTTCCCA)-3')

SRPK1	P19/P20	(5'-d(GGACAAAGCCCAAAGGAAATCT)-3')/ (5'-d(GCAGTGGAAGCCCCTGATAA)-3')
SRPK2	P21/P22	(5'-d(GGAATGAGCTCCCGGAAAGT)-3')/ (5'-d(ATCTTTTCCCCTGCATATCCCA)-3')
18S	P23/P24	(5'-d(AACTCACTGAAGATGAGGTG)-3')/ (5'-d(CAGACAAGGCCTACAGACTT)-3')
CLK1- HRE	P25/P26	(5'-d(CGTACAGGTCTGCAGCAACCTC)-3')/ (5'-d(GCCTCACCTCTCCT TCTGC)-3')
FL CAIX	P27/P28	(5'-d(TATCTGCACTCCTGCCCTCTG)-3')/ (5'-d(CACAGGGTGTGTCAGAGAGGGTGT)-3')
AS CAIX	P29/P30	(5'-d(TATCTGCACTCCTGCCCTCTG)-3')/ (5'-d(CTAGGATGTCACCTGCTTAGCACTC)-3')
Cyr61	P31/P32	(5'-d(GGCAGACCCTGTGAATATAA-3')/ (5'-d(CAGGGTTGTCATTGGTAACT)-3')

2.1.5. Monokloniniai ir polikloniniai antikūnai

Darbe buvo naudojami:

1. Pirminiai antikūnai:

- monokloniniai pirminiai antikūnai: pelės anti- β -aktinas, triušio anti-SRPK1 (*Abcam*, Didžioji Britanija); pelės anti-HIF-1 α (*BD Biosciences*, JAV); pelės anti-SR (*LifeSpan Biosciences*, JAV). Anti-fosfo-SR pelės monokloniniai antikūnai (mAB104) buvo gauti iš Nacionalinio sveikatos ir medicinos mokslinių tyrimo instituto (*National Institute of Health and Medical Research*) Prancūzijoje.

- polikloniniai pirminiai antikūnai: pelės anti-SRPK2; triušio anti-CLK1 (*Abcam*, Didžioji Britanija); ožkos anti-MAO-B (*Santa Cruz Biotechnology*, JAV).

2. Polikloniniai ožkos antriniai antikūnai prieš triušio ir pelės IgG, konjuguoti su krienų peroksidaze (*DakoCytomation*, Danija).

2.1.6. Ląstelių linijos ir mikroorganizmų kamienai

Branduolių ekstraktams skirti naudota iš Švedijos gauta HeLa (gimdos kaklelio adenokarcinomos) ląstelių linija.

E. coli DH5 α kamienas buvo naudojamas plazmidinių DNR transformacijai (*Thermo Fisher Scientific*, JAV).

Sveikų ir Parkinsono liga sergančių asmenų kraujas buvo gautas iš Kauno Kalniečių poliklinikos.

2.1.7. Molekulinės masės standartai

DNR fragmentams agaroziniame gelyje atpažinti naudotas *GeneRulerTM DNR Ladder Mix* molekulinės masės standartas ir *6 x DNR Loading Dye* mėginių dažas (*Thermo Fisher Scientific*, JAV).

Naudotas *PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder* baltymų molekulinį masių standartas (*Thermo Fisher Scientific*, JAV) ir pačių padarytas baltymų mėginių dažas.

2.1.8. Fermentai

Taq DNR polimerazė; *Pfu:Taq* DNR polimerazių mišinys (1:10); T7 RNR polimerazė; ribonukleazių inhibitorius RNasinas; T4 DNR ligazė; DNazė; RNazės A/T1; proteinazė K; atvirktinė transkriptazė *RevertAid H Minus M-MuLV*, restrikcijos endonukleazės: *SacI*, *PstI*, *XhoI*, *XmiI* (*AccI*), *XbaI*, *HindIII* (*Thermo Fisher Scientific*, JAV).

2.1.9. Bioinformatinė programa

MAO-B geno 13-o introno sekos analizė atlikta naudojant *Human Splicing Finder* (HSF) programą (<http://www.umd.be/HSF/>).

2.2. Metodai

2.2.1. DNR ir RNR tyrimo metodai

2.2.1.1. DNR fragmento amplifikacija polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu

Mišinio sudėtis vienam mėginiui: 1 × *Taq* buferinis tirpalas su (NH₄)₂SO₄, 0,2 mM dNTP mišinys, 50 pmol tiesioginis pradmuo, 50 pmol atvirktinis pradmuo, 2 mM MgCl₂, 1 vnt. *Taq* DNR polimerazės, 0,5–1 μg DNR, H₂O iki 20 μl. Reakcija vykdoma termocikleryje naudojant 2.1 lentelėje pateiktus pradmenis pagal rekomenduojamas sąlygas (2.2 lent.):

2.2 lentelė. Reakcijos taikant PGR metodą sąlygos. T_m – pradmenų lydymosi temperatūra

1.	95 °C	5 min.	1 ciklas
2.	95 °C	1 min.	
3.	T _m - 5 °C	1 min.	
4.	72 °C	1 kb/min.	23–40 ciklų
5.	72 °C	5 min.	1 ciklas

2.2.1.2. DNR elektroforezė. DNR fragmento skyrimas agarozės gelyje

Paruošiamas atitinkamos koncentracijos agarozės gelis (1–1,5 %), mėginys sumaišomas su 1 × *DNR Loading Dye* mėginių dažu ir vykdoma DNR elektroforezė 1 × TAE buferiniame tirpale esant 10 V/cm įtampai. Po elektroforezės gelis 10 min. dažomas etidžio bromido tirpalu ir DNR fragmentai vizualizuojami UV šviesoje.

Reikiamo dydžio DNR fragmentas išpjaunamas UV šviesoje ir iš agarozės gelio išskiriamas naudojant *GeneJetTM Gel Extraction Kit* rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.1.3. Koncentracijos nustatymas

Nukleorūgščių koncentracija nustatoma spektrofotometriniu būdu, matuojant šviesos sugertis, kai bangos ilgis yra 260 ir 280 nm. A_{260}/A_{280} santykis parodo mėginio švarumą.

Baltymų koncentracija nustatoma kolorimetriniu būdu, naudojant Bradfordo reagentą. Kalibracinei kreivei sudaryti paruošiami skirtingos koncentracijos BSA tirpalai. Tiriamo mėginio absorbcija matuojama esant 595 nm bangos ilgiui, ir pagal sudarytą kalibracinę kreivę nustatoma baltymų koncentracija.

2.2.1.4. DNR skaldymas restrikcijos endonukleazėmis

Restrikcijos reakcijos mišinio sudėtis: apie 1 μ g plazmidinės DNR arba 0,2 μ g PGR fragmento, 1 \times restrikcijos endonukleazių veikimo buferinis tirpalas, 10 vnt. atitinkamų restrikcijos endonukleazių, H₂O iki 10 μ l. Mišinio inkubacijos laikas, temperatūra ir buferiniai tirpalai parenkami pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.1.5. DNR fragmento įjungimas į plazmidinę DNR (ligavimas)

Ligavimo reakcijos sudėtis: 100 ng restrikcijos endonukleazių paveikta plazmidinė DNR, 50 ng restrikcijos endonukleazių paveiktas PGR fragmentas, 1 \times T4 ligazės veikimo buferinis tirpalas, 5 vnt. T4 DNR ligazės, H₂O iki 10 μ l. Ligavimo mišinys inkubuojamas 3 val. kambario temperatūroje.

2.2.1.6. Kompetentinių *E. coli* ląstelių paruošimas

E. coli DH5 α ląstelės 16 val. auginamos 5 ml LB terpėje kratytuve 37 °C temperatūroje, kol suspensijos optinis tankis 600 nm bangos ilgio šviesoje pasiekia 0,5. Ląstelės surenkamos, atšaldomos ledo vonioje ir 15 min. centrifuguojamos 4 °C temperatūroje esant 1280 \times g. Supernatantas nupilamas ir ląstelės suspenduojamos 25 ml atšaldyto 0,1 M MgCl₂ tirpalo, 15 min. centrifuguojamos 4 °C temperatūroje esant 1280 \times g. Nupylus supernatantą, ląstelės suspenduojamos 25 ml atšaldyto 0,1 M CaCl₂ tirpalo. Suspensija 20 min. inkubuojama ledo vonioje ir 10 min. centrifuguojama 4 °C temperatūroje esant 1280 \times g. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos laikymo tirpale, išskirstomos į mėgintuvėlius, užšaldomos skystame azote ir saugomos -70 °C temperatūroje. Jos nepraranda kompetentiškumo iki 6 mėn.

2.2.1.7. Plazmidinės DNR įterpimas į kompetentines *E. coli* ląsteles (transformacija)

Atliekant transformaciją, norima padauginti plazmidinę DNR ar ligavimo mišinys sumaišomas su 100 μ l kompetentinių *E. coli* ląstelių vienam mėginiui. Mišinys 0,5–1 val. inkubuojamas ledo vonioje, po to sukeliamas ląstelių temperatūrinis šokas – mėginys 2 min. perkeliamas į 42 °C temperatūrą ir vėl atšaldomas. Reakcijos mišinys užpilamas 1 ml LB terpės, 1 val. inkubuojamas 37 °C temperatūroje ir 1 min. centrifuguojamas esant 1280 \times g. Sterilioje aplinkoje supernatantas nupilamas, paliekant apie 100 μ l, ir ląstelės suspenduojamos. Suspenduotos ląstelės užsėjamos ant kietos agarizuotos LB terpės su reikiamu kiekiu

antibiotiko (antibiotiko koncentracija 100 µg/ml) Petri lėkštelėje, 16 val. inkubuojamos 37 °C temperatūroje oro termostate.

2.2.1.8. Transformacijos bakterijų kolonijose tikrinimas

E. coli kolonija užsėjama į 5 ml LB terpės su reikiamu kiekiu antibiotiko (antibiotiko koncentracija 100 µg/ml) ir 16 val. auginamos kratytuve 37 °C temperatūroje. Paimama 0,6 ml ląstelių kultūros ir lygiu tūriu sumaišoma su fenolio, chloroformo, izopentilo alkoholio mišiniu, 2 min. purtoma purtyklėje didžiausiu greičiu, po to 5 min. centrifuguojama esant 16 000 × g. Vandeningis sluoksnis surenkamas ir lygiu tūriu sumaišomas su izopropilo alkoholiu. Mišinys 5 min. centrifuguojamas esant 16000 × g. Supernatantas nupilamas, nuosėdos du kartus praplaunamos 70 % etanolio ir suspenduojamos 50 µl TER buferinio tirpalo. Matuojama išskirtos plazmidinės DNR koncentracija, ir reikiamo fragmento įterpimas į plazmidinę DNR tikrinamas PGR metodu.

2.2.1.9. Plazmidinės DNR išskyrimas

E. coli kolonija, turinti plazmidinę DNR su įterptu fragmentu, užsėjama į 100 ml LB terpės su reikiamu kiekiu antibiotiko (antibiotiko koncentracija 100 µg/ml) ir 16 val. auginama kratytuve 37 °C temperatūroje. Po auginimo *E. coli* ląstelės atšaldomos ledo vonioje ir 20 min. centrifuguojamos 0 °C temperatūroje esant 3500 × g. Terpė nupilama, ląstelės suspenduojamos penkis kartus mažesnio tūrio nei pradinis tūris TE buferiniame tirpale. Į ląstelių suspensiją pridedama 2 tūriai NaOH-SDS tirpalo, ir mišinys 5 min. inkubuojamas kambario temperatūroje. Po to pridedama 0,5 tūrio atšaldyto 3 M natrio acetato tirpalo, 10 min. inkubuojama ledo vonioje ir 15 min. centrifuguojama 0 °C temperatūroje esant 3500 × g. Plazmidinė DNR iš supernatanto išsodinama pridėjus 0,7–0,8 tūrio izopropilo alkoholio ir 15 min. centrifuguojama kambario temperatūroje esant 3500 × g. Gautos nuosėdos suspenduojamos du kartus mažesnio tūrio nei pradinis tūris TE buferiniame tirpale, ir vėl visa procedūra pakartojama, kol gaunamos nuosėdos. Gautos nuosėdos tirpinamos penkis kartus mažesnio tūrio nei pradinis tūris TE buferiniame tirpale. Mėginys sumaišomas lygiu tūriu su 10 M LiCl tirpalo, 5 min. inkubuojamas kambario temperatūroje ir 20 min. centrifuguojamas 0 °C temperatūroje esant 20 000 × g. Supernatantas surenkamas, pridedama 0,7–0,8 tūrio izopropilo alkoholio, 30 min. centrifuguojama kambario temperatūroje esant 20 000 × g. Nuosėdos suspenduojamos 0,5 ml TE buferinio tirpalo ir 1 val. inkubuojama 37 °C temperatūroje su 10 µg/µl ribonukleazės A/T1 mišiniu. Plazmidinė DNR gryninama.

2.2.1.10. Nukleorūgščių gryninimas

Mėginys lygiu tūriu sumaišomas su fenolio, chloroformo, izopentilo alkoholio mišiniu, 2 min. purtomas purtyklėje didžiausiu greičiu ir 5 min. centrifuguojamas 4 °C temperatūroje esant 16000 × g. Vandeningis sluoksnis surenkamas ir lygiu tūriu maišomas su chloroformo ir izopentilo alkoholio mišiniu, 2 min. intensyviai purtomas purtyklėje ir 5 min. centrifuguojamas 4 °C temperatūroje esant 16000 × g. Vandeningis sluoksnis surenkamas, į jį pridedama 2,5 tūrio 95 % etilo alkoholio ir 3 M natrio acetato tirpalo iki galutinės 0,3 M tirpalo koncentracijos, apie 16 val.

inkubuojamas $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Nuosėdos surenkamos 30 min. centrifuguojant $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje esant $16000 \times g$, praplaunamos 70 % etilo alkoholio tirpalu ir tirpinamos TE buferiniame tirpale arba steriliame vandenyje.

2.2.1.11. DNR konstruktai pre-iRNR splaisingo tyrimams

DNR konstruktai padauginti PGR metodu, naudojant 2.1 lentelėje pateiktas pradmenų poras su 3' galinėje sekoje esančiomis restrikcijos endonukleazių taikinių sekomis, per kurias įterpiami į pBluescript II KS (+) plazmidinę DNR.

MAO-B_g ir MAO-B_a DNR konstruktai gauti naudojant P1/P2 ir P3/P4 pradmenų poras atitinkamai su *SacI/HindIII* ir *HindIII/XhoI* restrikcijos endonukleazių taikinių sekomis. β-globino DNR konstruktas padarytas naudojant P5/P6 pradmenų porą su *SacI/PstI* ir *PstI/XhoI* restrikcijos endonukleazių taikiniais. Į β-globino konstruktą įterpiant laukinio tipo (MAO-B_g) ir mutaciją turinčią (MAO-B_a) seką, panaudojus P7/P8 pradmenų poras su *PstI/XmiI(AccI)* restrikcijos endonukleazių taikinių sekomis, gauti β-globino-MAO-B_g ir β-globino-MAO-B_a DNR konstruktai.

HIF-3α DNR konstruktui padaryti naudotos P9/P10 ir P11/P12 pradmenų poros su restrikcijos endonukleazių *XbaI/HindIII* taikinių sekomis, IPAS konstruktui – P13/P14 ir P15/P16 pradmenų poros su restrikcijos endonukleazių *HindIII/XhoI* taikiniais, o β-globino atveju – P17/P18 pradmenų poros su restrikcijos endonukleazių *SacI/PstI* ir *PstI/XhoI* taikiniais.

Plazmidines DNR, turinčias reikiamus fragmentus, panaudojus *in vitro* transkripcijos reakcijoje, buvo gautos pre-iRNR. Su jomis toliau buvo atliekami pre-iRNR splaisingo reakcijos tyrimai *in vitro* HeLa ląstelių branduolių ekstraktuose.

2.2.1.12. Radioaktyviaja žyme žymėtos pre-iRNR sintezė (transkripcija) *in vitro*

Transkripcijos reakcijos mišinio sudėtis: 1 × transkripcijos buferinis tirpalas, NTP mišinys (5 mM ATP, 5 mM UTP, 1 mM GTP ir 0,5 mM CTP arba 5 mM ATP, 1 mM UTP, 1 mM GTP ir 0,5 mM CTP, jei pre-iRNR žymėta ir radioaktyviaja žyme, ir biotin-16-UTP), 0,5 μg DNR, 0,5 mM *cap* nukleotidas ($m^7G^5pppG^5$), 20 vnt. RNazino, 10 mM ditiotreitolio, 0,075 mCi (2,8 MBq) [α -P³²]-CTP, 30 vnt. T7 RNR polimerazės, H₂O iki 25 μl. Reakcija vykdoma 2 val. 37 °C temperatūroje. Po to, pridėjus 1 vnt. DNazės ir 30 min. painkubavus 37 °C temperatūroje, mėginys gryninamas.

2.2.1.13. Radioaktyviaja žyme žymėtos pre-iRNR gryninimas 4 % *Maxam* poliakrilamidiniame gelyje

Po gryninimo gautas tirpalas 30 min. centrifuguojamas 4 °C temperatūroje esant $16000 \times g$. Iškritusios pre-iRNR nuosėdos suspenduojamos 20 μl RNR mėginių elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje dažo. Mėginys 5 min. denatūruojamas 100 °C temperatūroje ir frakcionuojamas vykdant vertikaliąją elektroforezę denatūruojančiame 4 % *Maxam* poliakrilamidiniame gelyje 1 × TBE buferiniame tirpale, esant 50 W nuolatinės srovės galingumui. Pasibaigus elektroforezei, vienas iš stiklų nuimamas, o prie kito stiklo prilipęs gelis uždengiamas plėvele. Pre-iRNR vizualizuojama naudojant autoradiografinę juostą.

Radioaktyviosios pre-iRNR antspaudas ant juostos leidžia tiksliai nustatyti jos padėtį ir išpjauti iš poliakrilamidinio gelio. Išpjovus pre-iRNR, vykdoma eliuacija: ant gelio užpilama RNR eliacijos buferinio tirpalo, apie 16 val. inkubuojama kambario temperatūroje nuolat vartant. Eliuatas surenkamas ir gryninama pre-iRNR. Žymėtojo nukleotido įjungimo efektyvumas nustatomas scintiliaciniu skaitikliu matuojant gautos pre-iRNR radioaktyvumą.

2.2.1.14. Pre-iRNR splaisingo reakcija *in vitro*

Reakcijos mišinio sudėtis: HeLa ląstelių branduolių ekstraktas, kuriame bendras baltymų kiekis 100 µg, 2,6 % (w/v) polivinilo alkoholio, 3,2 mM MgCl₂, 20 mM kreatinfosfato, 2 mM ATP, 20 vnt. RNazino, ~20 fmol (100 000 cpm) [α -P³²]-CTP žymėtos pre-iRNR, iki 25 µl buferinio D tirpalo. Reakcija vykdoma 30 °C temperatūroje 2 val. Po inkubacijos į reakcijos mišinį pridedama: 75 µl sterilaus H₂O, lygus tūris 2 × proteinazės K buferinio tirpalo, 0,2 µg/µl proteinazės K, 0,1 µg/µl tRNR. Mišinys 30 min. inkubuojamas 37 °C temperatūroje, o pasibaigus inkubacijai – gryninamas. Pre-iRNR splaisingo reakcijos produktai suspenduojami kartu su 5 µl RNR elektroforezės dažo, 5 min. denatūruojami 100 °C temperatūroje ir frakcionuojami 8 % *Sanger* poliakrilamidiniame gelyje. Pasibaigus elektroforezei stiklai atskiriami, gelis perkeliamas ant chromatografinio popieriaus, uždengiamas plėvele ir džiovinamas vakuuminiam gelių džiovintuve esant 60 °C temperatūrai. Pre-iRNR splaisingo produktai vizualizuojami naudojant autoradiografinę juostą.

2.2.2. Baltymų tyrimo metodai

2.2.2.1. Stabilusis baltymų prijungimas prie RNR naudojant ultravioletinius spindulius ir šių kompleksų atskyrimas pagal afiniškumą

Reakcijos mišinio sudėtis: HeLa ląstelių branduolių ekstraktas, kuriame bendras baltymų kiekis 90 µg (arba 5 µg SR baltymų), ~40 fmol (200 000 cpm) [α -P³²]-CTP ir biotin-16-UTP žymėtos pre-iRNR, iki 10 µl buferinio D tirpalo. Reakcijos mišinys 10 min. inkubuojamas ledo vonioje, po to 1 val. inkubuojamas švitinant ultravioletiniais spinduliais. Paruošiama streptavidinagarozė: 100 µl dalelių suspensijos vienam mėginiui praplaunama du kartus 5 min. centrifuguojant 4 °C temperatūroje esant 5000 × g ir resuspenduojama buferiniu D tirpalu. Paruošta streptavidinagarozė dedama į reakcijos mišinį ir 2 val. inkubuojama lėtai vartant 4 °C temperatūroje. Po inkubacijos mišinys tris kartus praplaunamas buferiniu D tirpalu, 5 min. centrifuguojama 4 °C temperatūroje esant 5000 × g. Nuosėdos resuspenduojamos buferiniame D tirpale ir pridedama 10 µg RNazės A/T1 mišinio, mėginys 30 min. inkubuojamas 37 °C temperatūroje. RNR ir baltymų kompleksai frakcionuojami vykdant baltymų elektroforezę 12 % poliakrilamidiniame gelyje, kai į paruošto poliakrilamidinio gelio takelį užnešamas tiriamas mėginys yra sumaišytas su RNR mėginių elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje dažu ir 5 min. denatūruotas 100 °C temperatūroje. Po elektroforezės baltymai 1 val. pernešami iš gelio ant membranos esant 100 V įtampai, ir atliekama baltymų analizė *Western blot* imunohibridizacijos metodu, arba gelis 1 val. džiovinamas vakuuminiam gelių

džiovinant 80 °C temperatūroje ir RNR ir baltymų kompleksai vizualizuojami naudojant autoradiografinę juostą.

2.2.2.2. Splaisosomos kompleksų atskyrimas agarozės gelyje

Reakcijos mišinys: HeLa ląstelių branduolių ekstraktas, kuriame bendras baltymų kiekis yra 100 µg (arba 100 µg HeLa branduolių ekstrakto kartu su 0,5 µg SR baltymų), 2,6 % (w/v) polivinilo alkoholis, 3,2 mM MgCl₂, 20 mM kreatinfosfato, ~20 fmol (100 000 cpm) [α -³²P]-CTP žymėtos pre-iRNR, 2 mM ATP, buferinio D tirpalo iki 25 µl. Po 25 min. inkubacijos 30 °C temperatūroje į mišinį pridedama 10 × heparino dažo ir atšaldoma ledo vonioje. Mėginys frakcionuojamas vykdant elektroforezę 1,5 % LMP agarozės gelyje 4 °C temperatūroje esant 70 V įtampai. Po elektroforezės gelis 15 min. inkubuojamas agarozinio gelio fiksavimo tirpale, 1 val. džiovinamas vakuuminiam gelių džiovinant 80 °C temperatūrai. RNR ir baltymų kompleksai vizualizuojami naudojant autoradiografinę juostą.

2.2.2.3. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

Baltymų elektroforezė atliekama denatūracijos sąlygomis poliakrilamidiniame gelyje baltymų elektroforezės buferiniame tirpale esant 120 V įtampai. Poliakrilamidinis gelis sudarytas iš koncentruojančios (4 % poliakrilamido) ir frakcionuojančios (12 % poliakrilamido) dalių. Mėginys sumaišomas su 2 × baltymų mėginių dažu, 5 min. denatūruojamas 100 °C temperatūroje ir pernešamas į poliakrilamidinį gelį. Po elektroforezės arba gelis apie 16 val. dažomas Kumasio brilantinio mėlio dažu, atplaunamas plovimo tirpalu ir džiovinamas 80 °C temperatūroje, arba *Western blot* imunohibridizacijos metodu atliekama baltymų analizė.

2.2.2.4. Baltymų analizė *Western blot* imunohibridizacijos metodu

Po elektroforezės baltymai pernešami iš poliakrilamidinio gelio ant nitroceliuliozinės membranos. Pernešimas vykdomas šaltame baltymų pernešimo buferiniame tirpale 1 val. leidžiant 2 mA srovę 1 cm² membranos ploto. Po baltymų pernešimo membrana 2 val. blokuojama blokavimo buferiniu tirpalu kambario temperatūroje, o po to 16 val. inkubuojama su pirminiais antikūnais 4 °C temperatūroje (pirminiai antikūnai skiedžiami pagal gamintojo rekomendacijas 1 × TBST buferiniame tirpale). Toliau membrana praplaunama du kartus po 10 min. 1 × TBST buferiniu tirpalu ir 2 val. inkubuojama su antriniais antikūnais kambario temperatūroje (antriniai antikūnai skiedžiami pagal gamintojo rekomendacijas 1 × TBST buferiniame tirpale). Po to membrana praplaunama du kartus po 10 min. 1 × TBST buferiniu tirpalu ir naudojant TMB reagentą vykdoma baltymų detekcija.

2.2.2.5. Dviejų dimensijų baltymų elektroforezė

Dviejų dimensijų elektroforezės metu buvo išskirstyti SR baltymai, gauti iš normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių. Mėginys paruoštas naudojant 50 µg SR baltymų, sumaišytų su 2D elektroforezės rehidratacijos mėginių dažu, užneštas ant IPG gelių juostelių (pH 3–10) ir įstumtas į kasetės kanalą. Po IPG

juostelės rehidratacijos kambario temperatūroje ~16 val. atliekamas izoelektrinis fokusavimas palaipsniui didinant įtampą (20 min. – 200 V, 10 min. – 350 V, 4 val. – 500 V, 2 val. – 2000 V). Toliau atliekamas IPG juostelių pusiausvyrinimas: 15 min. kambario temperatūroje inkubuojama su 1 × 2D elektroforezės mėginio dažu, į kurį pridėta DTT tirpalo iki galutinės 75 mM koncentracijos, jį pašalinus pridedama 1 × 2D elektroforezės mėginio dažo su jodoacetamidu iki galutinės 125 mM koncentracijos, 15 min. inkubuojama kambario temperatūroje. Atlikus IPG juostelių pusiausvyrinimą vykdoma antros krypties baltymų elektroforezė 12 % poliakrilamidiniame gelyje 1 × 2D elektroforezės buferiniame tirpale ir baltymų analizė *Western blot* imunohibridizacijos metodu naudojant anti-SR antikūnus.

2.2.2.6. Chromatino imunoprecipitacija (ChIP)

HeLa ląstelės 10 min. fiksuojamos 1 % formaldehido tirpale kambario temperatūroje, po to surenkamos šaltame 1 × PBS buferiniame tirpale, praplaunamos I buferiniu tirpalu ir II buferiniu tirpalu. Ląstelės suardomos naudojant lizės buferinį tirpalą (*Roche*) ir veikiant ultragarsu, centrifuguojama 4 °C temperatūroje esant 6000 × g. Supernatantas sumaišomas su skiedimo buferiniu tirpalu santykiu 1:10, 16 val. inkubuojama vartant 4 °C temperatūroje. Paruošiamos baltymo-G dalelės: praplaunamos I ir II buferiniais tirpalais. Ląstelių lizatai, triušio anti-IgG antikūnai ir baltymo-G dalelės (50 %) sumaišomos, 2 val. inkubuojamos vartant 4 °C temperatūroje. Supernatantas 16 val. inkubuojamas vartant su anti-HIF-1 antikūnu 4 °C temperatūroje. Antikūnai-DNR-baltymo-G dalelės praplaunamos TSE I, TSE II, TSE III buferiniais tirpalais, TE buferiniu tirpalu ir tris kartus eliuuojamos eliuacijos buferiniame tirpale. Eliuatas 16 val. inkubuojamas 65 °C temperatūroje. DNR fragmentai gryninami naudojant *GeneJet PCR Purification Kit* rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. Vykdoma realaus laiko PGR (angl. *quantitative real-time PCR*) reakcija su specifiniais *CLK1* geno promotoriaus sekos P17/P18 pradmenimis (2.1 lentelė, CLK1-HRE), naudojant *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix* rinkinį, remiantis gamintojo rekomendacijomis.

2.2.3. Eukariotinių ląstelių kultivavimas ir tyrimo metodai

2.2.3.1. HeLa ląstelių linijos kultivavimas *in vitro*

HeLa ląstelės auginamos DMEM mitybinėje terpėje (sterilioje aplinkoje) pridėjus 10 % FBS, 2 mM glutamino ir 100 U penicilino ir 0,1 mg/ml streptomicino mišinio. Normaliomis sąlygomis ląstelių kultūra auginama reikiamos talpos auginimo induose CO₂ inkubatoriuje, esant 21 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C temperatūrai ir 95 % drėgmei, kol adhezinėmis HeLa ląstelėmis pasidengia apie 80–90 % auginimo indo paviršiaus ploto. Dalijant ląsteles pašalinama terpė, ląstelės praplaunamos kambario temperatūros 1 × PBS buferiniu tirpalu, pridedama tripsino tirpalo ir 5 min. inkubuojama 37 °C temperatūroje. Ląstelėms atsikabinus nuo auginimo indo pagrindo, jos padalijamos santykiu 1:2–1:5 į naujus indus, pridedama mitybinės terpės ir inkubuojama CO₂ inkubatoriuje iki kito dalijimo.

Kultivuojant HeLa ląsteles hipoksinėmis sąlygomis, iš pradžių jos auginamos normaliomis sąlygomis (21 % O₂), o kai pasiekia 80–90 % auginimo indo paviršiaus plotą, 16 val. įdedamos į hipoksijos kamerą, kurioje yra 1 % O₂.

Dirbama steriliomis sąlygomis vertikalaus srauto laminare, naudojamos tik sterilios darbo priemonės.

2.2.3.2. Ląstelių šaldymas ir atšildymas

Nuo ląstelių kultūros pašalinama terpė, ląstelės praplaunamos kambario temperatūros 1 × PBS buferiniu tirpalu, pridedama tripsino tirpalo ir 5 min. inkubuojama 37 °C temperatūroje. Nuo auginimo indo pagrindo atsikabinusios ląstelės surenkamos 5 min. centrifuguojant 1000 × g greičiu. Supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos šaldymo terpėje (ląstelių koncentracija viename mililitre turi būti 10⁶–10⁷), išdalijamos į šaldymo ampules ir dedamos į specialią dėželę, kuri patalpinta į –70 °C temperatūros šaldiklį atšąla 1 °C/min. greičiu. Ilgai saugoti ląstelės perkeliamos į skystą azotą.

Ląsteles atšildant, šaldymo ampulė 1 min. įdedama į 37 °C temperatūros vandens vonią, atšildoma, ir kaip galima greičiau ląstelės užsėjamos į reikiamos talpos sterilų auginimo indą su paruošta mitybine terpe. Auginama CO₂ inkubatoriuje esant 5 % CO₂, 37 °C temperatūrai ir 95 % drėgmei.

2.2.3.3. Ląstelių branduolių ekstraktų paruošimas

Branduolių ekstraktai buvo ruošiami iš HeLa ląstelių, augintų normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis. Ląstelės, pasiekusios 80–90 % konfluentiškumą, surenkamos 5 min. centrifuguojant 4 °C temperatūroje esant 1000 × g. Supernatantas nupilamas, ląstelės praplaunamos šaltu 1 × PBS buferiniu tirpalu, 5 min. centrifuguojama 4 °C temperatūroje esant 1000 × g. Supernatantas nupilamas, pamatuojamas nuosėdų tūris, ir ant jų pridedamas lygus tūris buferinio tirpalo A, 15 min. inkubuojama ledo vonioje. Naudojant specialų homogenizatorių ar švirksną su adata, suardoma ląstelių išorinė membrana. Ląstelių lizė tikrinama mikroskopu su tripano mėlio dažu (lizės lygis turi siekti 80–90 %). Ląstelės 20 sek. centrifuguojamos 4 °C temperatūroje esant 12 000 × g, supernatantas nupilamas, o ant nuosėdų pridedama 2/3 tūrio buferinio tirpalo C, palyginti su pradiniu pamatuotu nuosėdų tūriu, 30 min. inkubuojama silpnai purtant 4 °C temperatūroje. 15 min. centrifuguojama maksimaliu greičiu 4 °C temperatūroje. Supernatantas surenkamas ir ~16 val. 4 °C temperatūroje atliekama dializė (naudojant MWCO 12–14 kDa dializės maišelį) tris kartus keičiant dializės buferinį tirpalą (dializės buferinio tirpalo ir dializuojamo tirpalo tūrių santykis yra 1:100). Branduolių ekstraktas surenkamas 15 min. centrifuguojant maksimaliu greičiu 4 °C temperatūroje, užšaldomas skystame azote ir laikomas –70 °C temperatūros šaldiklyje.

2.2.3.4. SR baltymų skyrimas

SR baltymai buvo išskirti iš HeLa ląstelių, augintų normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis. Ląstelės, pasiekusios 80–90 % konfluentiškumą, surenkamos 5 min. centrifuguojant 4 °C temperatūroje esant 1000 × g. Supernatantas nupilamas, ląstelės praplaunamos šaltu 1 × PBS buferiniu tirpalu, 5

min. centrifuguojama 4 °C temperatūroje esant 1000 × g. Supernatantas nupilamas, nuosėdos pasveriamos. Suskaičiuavus, kiek ląstelių yra sausoje masėje (1 g yra 2,5·10⁸ ląstelių), ant ląstelių pridedama izoliacinio buferinio tirpalo (350 ml izoliacinio buferinio tirpalo 1·10¹⁰ ląstelių). Ląstelės suardomos veikiant ultragarsu 10 kartų po 20 sek., esant 50 W galiai ir 4 °C temperatūrai, ir 20 min. centrifuguojamos 4 °C temperatūroje esant 8000 × g. Supernatantas surenkamas, pamatuojamas jo tūris, ir pridedama amonio sulfato iki 65 % prisotinimo (1 ml ekstrakto reikia 0,398 g amonio sulfato). Po 2 val. maišymosi 4 °C temperatūroje ekstraktas 20 min. centrifuguojamas toje pačioje temperatūroje esant 8000 × g. Supernatantas surenkamas, pamatuojamas tūris, ir pridedama amonio sulfato iki 90 % prisotinimo (1 ml ekstrakto reikia 0,168 g amonio sulfato). Ekstraktas apie 12 val. maišomas 4 °C temperatūroje, po to surenkamas ir 1 val. ultracentrifuguojamas 4 °C temperatūroje esant 85000 × g. Supernatantas pašalinamas, nuosėdos praplaunamos su 90 % amonio sulfato įsotintu izoliaciniu buferiniu tirpalu. Nuosėdos resuspenduojamos dializės buferiniame tirpale (35 kartus mažesnio tūrio nei pradinis izoliacinio buferinio tirpalo tūris). Apie 16 val. buferiniame tirpale 4 °C temperatūroje atliekama dializė (naudojant MWCO 12–14 kDa dializės maišelį). Dializuojama tris kartus keičiant 100 kartų didesniu dializės buferinio tirpalo tūriu, palyginti su dializuojamo tirpalo tūriu. Po 15 min. centrifugavimo 4 °C temperatūroje 13000 × g greičiu supernatantas surenkamas, pamatuojamas tūris, ir pridedama magnio chlorido tirpalo iki galutinės 20 mM koncentracijos. 1 val. inkubuojama ledo vonioje, 30 min. centrifuguojama 4 °C temperatūroje esant 13000 × g. Supernatantas pašalinamas, nuosėdos praplaunamos su 20 mM magnio chlorido turinčiu dializės buferiniu tirpalu (200 μl buferinio tirpalo 1 ml supernatanto) ir resuspenduojamos 5 % glicerolio buferiniame D tirpale (20 μl/ml supernatanto). Baltymų tirpalas išdalijamas į keletą mėgintuvėlių, užšaldomas skystame azote ir saugomas –70 °C šaldiklyje.

2.2.3.5. Kraujo mėginių paruošimas

Iš gautų sveikų ir Parkinsono liga sergančių asmenų kraujo mėginių buvo išskirti trombocitai ir kraujo plazma. Pamatavus gauto kraujo tūrį, 15 min. centrifuguojama kambario temperatūroje esant 1000 × g. Nucentrifugavus surenkama kraujo plazma. Ant nuosėdų nuimtam kiekiui lygiu tūriu užpilama RPMI 1640 mitybinės terpės, sumaišoma, ir šis mišinys iš lėto pilamas į ½ tūrio, palyginti su pradiniu kraujo tūriu, ficolio reagentą. Po 25 min. centrifugavimo kambario temperatūroje esant 2000 × g gaunamos trys fazės; iš jų surenkama vidurinė fazė – trombocitai. Mėginys užšaldomas ir saugomas –20 °C temperatūroje.

2.2.3.6. CLK1 siRNR transfekcija. Ląstelių veikimas CLK kinazių inhibitoriumi

HeLa ląstelės yra auginamos iki ~50 % auginimo indo paviršiaus ploto. Paruošiamas transfekcijos reagentas ir reikiamas kiekis siRNR (50 nM) – praskiedžiami DMEM mitybine terpe be antibiotikų ir FBS. Abu mišiniai sumaišomi, 5 min. inkubuojami kambario temperatūroje ir sulašinami ant mitybinėje

terpėje augančių ląstelių, švelniai sumaišoma. 18 val. auginama CO₂ inkubatoriuje, po to 24 val. inkubuojama normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis.

CLK kinazių inhibitorius TG003, kuris ištirpintas DMSO, dedamas į mitybinėje terpėje augančias HeLa ląsteles iki 10 μM galutinės koncentracijos. Ląstelės 24 val. auginamos normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis.

2.2.3.7. RNR skyrimas iš eukariotinių ląstelių. kDNR sintezė

RNR išskirta iš HeLa ląstelių, augintų normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis, naudojant *Quick-RNA Miniprep Kit* rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. kDNR sintetinama naudojant *RevertAid™ RT Kit* rinkinį ir laikantis gamintojo rekomendacijų. Po to atliekama kDNR amplifikacija PGR metodu, naudojant specifines CLK1 ir P19/P20, SRPK1 ir P21/P22, SRPK2 ir P23/P24 bei 18S ir P25/P26 pradmenų poras. FL CAIX, AS CAIX, Cyr61 atvejais naudoti specifiniai atitinkamai P29/P30, P31/P32 ir P33/P34 pradmenys (2.1 lentelė). Gauti produktai analizuojami atliekant elektroforezę.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

3.1. Trumpas mokslinio darbo apibūdinimas

Pre-iRNR splaisingas yra svarbus procesas genų raiškos reguliacijai žinduolių ląstelėse. Įvykę pre-iRNR splaisingo pokyčiai lemia pakitusių iRNR izoformų susidarymą. Nuo jų susintetinami baltymai, pasižymintys skirtingomis savybėmis. Pakitusių baltymų sintezė ląstelėse lemia įvairių ligų vystymąsi žmogaus organizme.

Disertacinio darbo tyrimai parodė, kad net vieno nukleotido pasikeitimas geno nekoduojančioje sekoje nulemia baltymo raiškos lygio pakitimą. Tokie pokyčiai ląstelėse yra siejami su neurodegeneracinių ligų atsiradimu ir vystymusi.

Alternatyvusis pre-iRNR splaisingas yra itin svarbus eukariotų genų raiškai. Šis procesas padeda ląstelei prisitaikyti prie pakitusių aplinkos sąlygų. Deguonies trūkumas (hipoksija) inicijuoja įvairių žmogaus organizmo sutrikimų, pvz., smegenų, širdies išeminės ir onkologinių ligų, atsiradimą ir vystymąsi. Hipoksinėmis sąlygomis ląstelėse vyksta ne tik genų raiškos pakitimai, bet ir alternatyviojo pre-iRNR splaisingo pokyčiai susidarant iRNR izoformoms, koduojančioms baltymus, kurių reikia ląstelėms išgyventi.

Darbas buvo atliekamas Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje.

3.2. Vieno nukleotido polimorfizmo, esančio *MAO-B* geno nekoduojančioje sekoje, įtaka pre-iRNR splaisingui

Pre-iRNR splaisingo pokyčiai ląstelėje aptinkami sergant neurologinėmis ir raumenų degeneracinėmis ligomis (Faustino, Cooper, 2003; La Cognata *et al*, 2015). Literatūroje rašoma, kad vienas labiausiai paplitusių neurodegeneracinių sutrikimų yra Parkinsono liga, kuria sergant nustatomas padidėjęs MAO-B fermento aktyvumas. *MAO-B* geno polimorfizmo tyrimai parodė, kad daugelis polimorfizmų *MAO-B* gene aptinkami tam tikrose žmonių populiacijose ir tik vienas polimorfizmas, esantis šio geno 13-o introno sekoje, randamas visose žmonių populiacijose. Šis polimorfizmas, kai G nukleotidas pakeičiamas į A, randamas nekoduojančioje sekoje, todėl literatūroje esama prieštaringų nuomonių: vieni tvirtina, kad šis pokytis neturi įtakos MAO-B baltymo raiškai (Costa-Mallen *et al*, 2004), o kiti teigia, kad G/A dimorfizmas nekoduojančioje sekoje yra svarbus ir koreliuoja su Parkinsono ligos vystymusi žmogaus organizme (Balciuniene *et al*, 2002).

Šio darbo tikslas buvo ištirti G/A polimorfizmo, esančio *MAO-B* geno 13-o introno sekoje, įtaką pre-iRNR splaisingui, nustatyti dalyvaujančius splaisingo veiksnius ir MAO-B baltymo raiškos lygio pokyčius Parkinsono liga sergančių ir sveikų asmenų kraujo trombocitų frakcijoje.

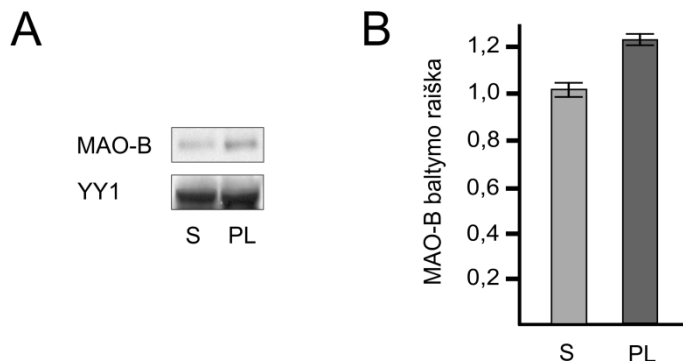
Literatūroje aprašoma, kad kraujo trombocitų frakcija gali būti pasitelkiama neurobiologiniuose tyrimuose, nes tiek trombocitai, tiek neuronai pasižymi panašiais patologiniais procesais sergant daugeliu neuropsichiatrinių ligų (Nikolac Perkovic *et al*, 2016b). Kiti jų panašumai: 1) didelis bioamenerginė neuromediatorių (pvz., serotonino, dopamino) kiekis, jų atpalaidavimas, pernaša ir metabolizmas; 2) randama MAO-B raiška (Asor, Ben-Shachar, 2012). Todėl trombocitų frakcija, kurią

lengva gauti, gali būti puikiai panaudojama neuronų funkcijų ir neuromediatorių sutrikimų smegenyse tyrimams. Nors atliekama daug mokslinių tyrimų pasitelkus trombocitus, iki šiol nėra nustatytas patikimas žymuo Parkinsono ligai diagnozuoti, ypač ankstyvojoje jos vystymosi stadijoje.

3.2.1. MAO-B geno 13-ame introne esančio vieno nukleotido polimorfizmo įtakos pre-iRNR splaisingui tyrimai

Nustatyta, kad kraujo trombocitų frakcijoje randama tik MAO-B raiška (Shih *et al.*, 1990), todėl kyla klausimas, ar ji gali būti naudojama kaip žymuo diagnozuojant Parkinsono ligą. Dėl šios priežasties pirmiausia buvo siekiama nustatyti MAO-B baltymo raišką kraujo mėginių, gautų iš Parkinsono liga (PL) sergančių ir sveikų (S) asmenų, trombocitų frakcijoje. Iš sveikų ir PL sergančių asmenų ($n = 8$) kraujo buvo išskirta trombocitų frakcija ir *Western blot* imunohibridizacijos metodu nustatyta MAO-B raiška. Tyrimas parodė, kad MAO-B baltymo raiška PL sergančių žmonių trombocitų frakcijoje yra didesnė nei sveikų (3.1 pav., A ir B). Išskyrus DNR iš sveikų ir PL sergančių asmenų trombocitų frakcijos ir palyginus MAO-B geno 13-o introno srities pirminę DNR struktūrą, nustatyta, kad žmogui sergant Parkinsono liga dominuoja „A“ alelis, o kai žmogus sveikas – „G“ alelis.

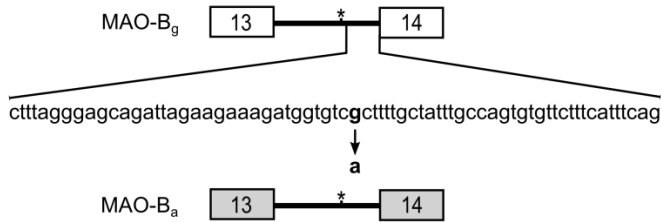
MAO-B geno 13-o introno sekos analizė parodė, kad G/A dimorfizmo vieta yra 36 bp nutolusi nuo 13-o introno ir 14-o egzono 3' taikinio srities, maždaug viduryje tarp šakojimosi taško ir 13-o introno 3' taikinio sekos.



3.1 pav. MAO-B baltymo raiška. A – MAO-B baltymo raiškos sveikų (S) ir Parkinsono liga (PL) sergančių asmenų trombocitų frakcijoje palyginimas; YY1 – mėginio užnešimo kontrolinis mėginys; B – MAO-B baltymo raiškos PL ir S asmenų trombocitų frakcijoje ($n = 8$) įvertinimas naudojant kompiuterinę *MultiGauge* programą ($p < 0,01$)

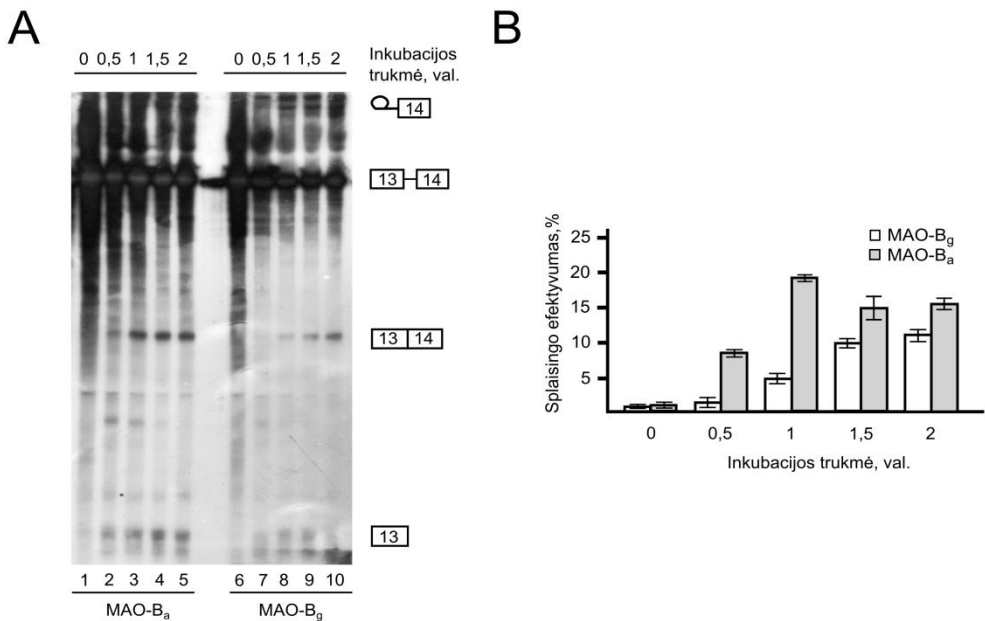
Norint nustatyti, ar vieno nukleotido polimorfizmas, esantis žmogaus MAO-B geno 13-o introno sekoje, gali daryti įtaką pre-iRNR splaisingui ir MAO-B raiškai, buvo padaryti du DNR konstruktai, turintys splaisingui svarbias 5' taikinio, šakojimosi taško, polipirimidinę ir 3' taikinio sekas. DNR konstruktai turi bendrą 13-o egzono 5' taikinio seką, laukinio („G“ alelis) arba taškinę mutaciją turinčio („A“ alelis) MAO-B geno 13-o introno 3' taikinio sekos dalį ir bendrą 14-o egzono 3' taikinio seką (3.2 pav.). Laukinio tipo (MAO-B_g) ir taškinę mutaciją (MAO-B_a)

turinčias plazmidines DNR panaudojus transkripcijos reakcijoje *in vitro* buvo gautos MAO-B_a ir MAO-B_g pre-iRNR. Jos toliau buvo naudojamos pre-iRNR splaisingo tyrimams *in vitro* HeLa ląstelių branduolių ekstraktuose.



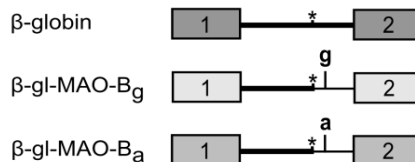
3.2 pav. MAO-B_g ir MAO-B_a pre-iRNR konstrukty schema. Išplėtimas rodo nukleotidų seką, kurioje aptinkamas g nukleotido pasikeitimas į a; šakojimosi taškas pažymėtas (*)

Gauti pre-iRNR splaisingo rezultatai parodė, kad mutaciją turinti 13-o introno seka (MAO-B_a pre-iRNR) yra pašalinama efektyviau nei laukinio tipo introninė seka (MAO-B_g pre-iRNR). Jau po 1 val. inkubacijos yra detektuojamas maždaug tris kartus efektyvesnis MAO-B_a iRNR formavimasis, palyginti su MAO-B_g (3.3 pav., A ir B). Tai rodo, kad introninė seka, turinti „A“ alelį, iš pre-iRNR yra pašalinama kur kas efektyviau, palyginti su „G“ alelį turinčia seka.



3.3 pav. Laukinio ir taškinę mutaciją turinčio MAO-B pre-iRNR splaisingas *in vitro*. A – MAO-B_a ir MAO-B_g iRNR susidarymas priklausomai nuo reakcijos laiko (0–2 val.); B – MAO-B_a ir MAO-B_g splaisingo produktų susidarymo efektyvumo įvertinimas. Skaičiuojama buvo kompiuterine MultiGauge programa naudojant trijų atskirų eksperimentų duomenis ($p < 0,05$)

Siekiant išsiaiškinti, ar vieno nukleotido pasikeitimas introninėje sekoje, padidinantis nekoduojančios sekos pašalinimo efektyvumą, yra specifinis tik MAO-B pre-iRNR, ar būdingas visoms pre-iRNR, buvo padaryti du chimeriniai DNR konstruktai. Tam tikslui buvo pasirinktas triušio β -globino genas, kuris yra plačiai naudojamas pre-iRNR splaisingo tyrimuose dėl kelių priežasčių: 1) šio geno 1-ame introne esanti šakojimosi taško seka yra identiška konservatyviajai šakojimosi taško sekai (CUGAC); 2) prieš 3' taikinio seką yra ilga polipirimidinė seka, su kuria efektyviai sąveikauja splaisingo veiksniai. Taigi buvo sukurti DNR konstruktai, kur dalis triušio β -globino geno 1-o introno 3' taikinio sekos pakeista laukinio arba mutaciją turinčio MAO-B geno 13-o introno 3' taikinio sekomis. Plazmidines DNR, turinčias reikiamus fragmentus, panaudojus transkripcijos reakcijoje *in vitro* buvo gautos β -globino-MAO-B_g ir β -globino-MAO-B_a pre-iRNR. Jos toliau buvo naudojamos pre-iRNR splaisingo tyrimams *in vitro* branduolių ekstraktuose, paruoštuose iš HeLa ląstelių (3.4 pav.).



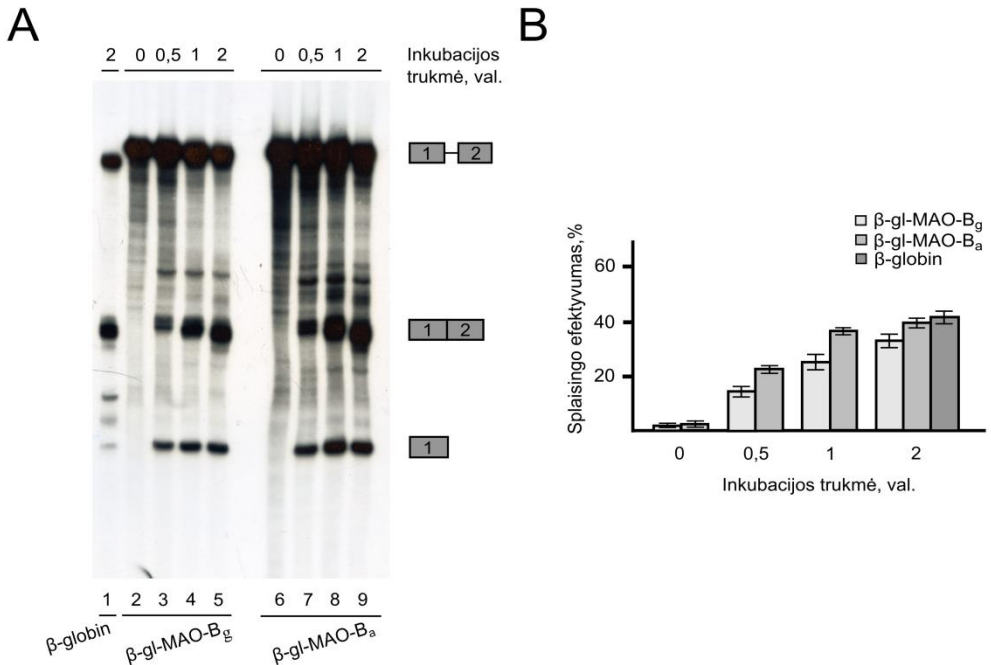
3.4 pav. β -globino, chimerinės β -globino-MAO-B_g ir β -globino-MAO-B_a pre-iRNR konstrukto schemos. Pažymėti **g** ir **a** nukleotidai, esantys atitinkamai β -globino-MAO-B_g ir β -globino-MAO-B_a konstrukto introninėje sekoje. Šakojimosi taškas pažymėtas (*)

Splaisingo tyrimai rodo, kad iš chimerinių pre-iRNR „A“ alelį turinti introninė seka (β -globino-MAO-B_a pre-iRNR) yra pašalinama kur kas efektyviau, palyginti su „G“ alelį turinčia intronine seka (β -globino-MAO-B_g pre-iRNR) (1,5 k.). Tai leidžia patvirtinti, kad šio polimorfizmo įtaka nekoduojančios sekos pašalinimo efektyvumo padidėjimui nėra specifinė tik MAO-B pre-iRNR ir gali būti būdinga ir kitoms pre-iRNR (3.5 pav., A ir B).

Iš literatūros yra žinoma, kad G/A dimorfizmas MAO-B geno 13-ame introne yra aptinkamas netoli šakojimosi taško sekos (Balciuniene *et al*, 2002). Tačiau, G nukleotidui pasikeitus į A, šakojimosi taškas gali pasislinkti (De Klein *et al*, 1998). Todėl norint nustatyti, ar šis polimorfizmas lemia šakojimosi taško pasislinkimą, buvo atlikta bioinformatinė MAO-B geno 13-o introno sekos analizė. Ji parodė, kad MAO-B geno 13-ame introne esanti mutacija šakojimosi taško nepakeičia (3.6 pav., A ir B).

Nustačius, kad „A“ alelį turinti introninė seka iš pre-iRNR yra pašalinama daug efektyviau nei „G“ alelį turinti seka, ir patvirtinus, jog tai vyksta ne dėl šakojimosi taško vietos pasikeitimo, buvo iškelta prielaida, kad galbūt tam įtakos turi skirtingas splaisosomos komplekso formavimasis ant MAO-B_g ir MAO-B_a pre-iRNR. Agarozės gelyje nedematūruojančiomis sąlygomis atlikta splaisosomos kompleksų susidarymo ant šių RNR analizė parodė, kad, priklausomai nuo laiko, ankstyvasis splaisosomos kompleksas su MAO-B_a pre-iRNR formuojasi daug efektyviau, palyginti su MAO-B_g pre-iRNR (1,8 k.) (3.7 pav., A ir B). Tai parodo,

kad net vieno nukleotido pasikeitimas nekoduojančioje sekoje daro įtaką splaisosomos formavimosi efektyvumui.

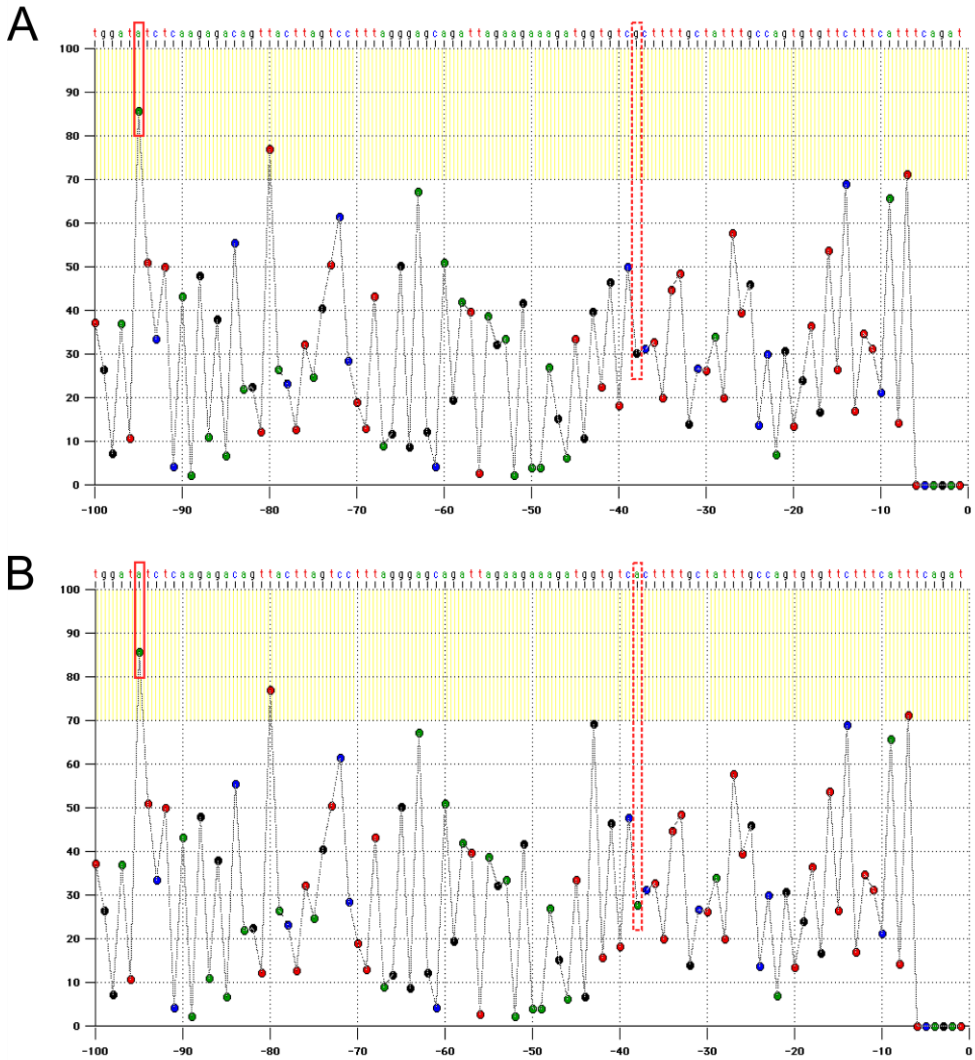


3.5 pav. β -globino, β -globino-MAO-B_g ir β -globino-MAO-B_a pre-iRNR splaisingas *in vitro*. *A* – β -globino (1 takelis), β -globino-MAO-B_g (2–5 takeliai) ir β -globino-MAO-B_a (6–9 takeliai) iRNR susidarymas priklausomai nuo reakcijos laiko. 1 takelis – β -globino splaisingo reakcijos trukmė 2 val.; 2 ir 6 takeliai – inkubacija 0 val.; 3 ir 7 takeliai – 0,5 val.; 4 ir 8 takeliai – 1 val.; 5 ir 9 takeliai – 2 val. *B* – splaisingo produktų formavimosi efektyvumo skaičiavimas. Skaičiuojama buvo kompiuterine *MultiGauge* programa naudojant trijų atskirų eksperimentų duomenis ($p < 0,05$)

Kadangi splaisosomos kompleksas su mutaciją turinčia pre-iRNR seka susidaro efektyviau, galima tikėtis, kad tai lemia skirtinga splaisingo veiksnių sąveika su RNR. Splaisingo veiksnių ir RNR sąveikai tirti buvo taikomas stabiliojo baltymų prijungimo prie RNR naudojant ultravioletinius spindulius (angl. *UV cross-linking*) metodas ir HeLa ląstelių branduolių ekstraktas. Gauti rezultatai parodė, kad branduolių ekstrakto esantys baltymai su RNR sąveikauja skirtingai: su MAO-B_a pre-iRNR sąveikauja daug efektyviau nei su MAO-B_g pre-iRNR (3.8 pav., A).

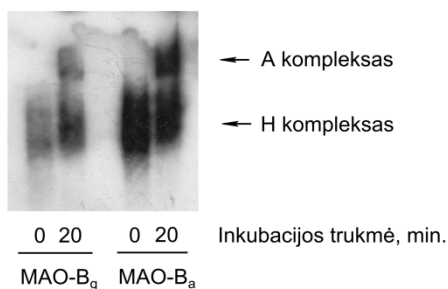
Norint nustatyti skirtingai su pre-iRNR sąveikaujančius baltymus buvo pritaikytas stabiliojo baltymų prijungimo prie RNR naudojant ultravioletinius spindulius metodas. RNR buvo pažymėta biotinu, o susidarę RNR ir baltymų kompleksai iš HeLa ląstelių branduolių ekstrakto ištraukti (angl. *fish out*) su streptavidinagaroze. Skirtingai su RNR sąveikaujantys baltymai buvo nustatomi *Western blot* imunohibridizacijos metodu, naudojant antikūnus, atpažįstančius įvairius splaisingo veiksnis. Tyrimai naudojant anti-SR antikūnus parodė, kad skirtingai su RNR sąveikauja SR šeimos baltymai. Mutaciją turinti MAO-B geno 13-

o introno seka sąveikauja su SR šeimos baltymais kur kas efektyviau nei laukinio tipo *MAO-B* geno 13-o introno seka (3.8 pav., *B*). Kadangi SR šeimos baltymai, formuojantis ankstyvajam splaisosomos kompleksui, geba pritraukti kitus splaisingo veiksnius, tai lemia greitesnę splaisosomos kompleksu susidarymą.

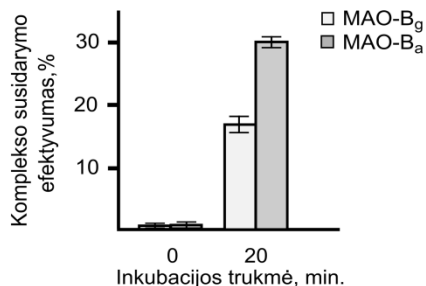


3.6 pav. MAO-B pre-iRNR šakojimosi taško bioinformatinė analizė. *A* – MAO-B_g pre-iRNR šakojimosi taško nustatymas; *B* – MAO-B_a pre-iRNR šakojimosi taško nustatymas. Skirtingų spalvų rutuliukai žymi atitinkamo nukleotido (raudonas – T, juodas – G, žalias – A, mėlynas – C) tikimybę. Rezultatas laikomas patikimu, kai $p > 0,7$. Šakojimosi taškas apibrėžtas ištisine, mutacijos vieta – punktyrine linija

A

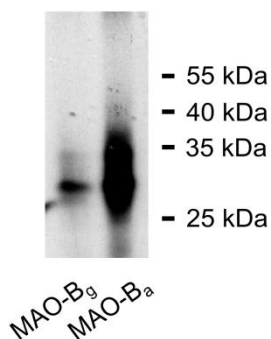


B

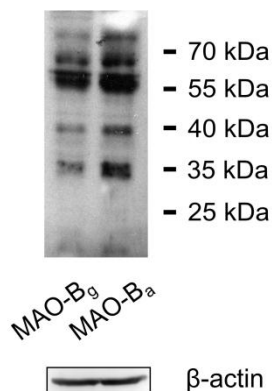


3.7 pav. MAO-B_g ir MAO-B_a ankstyvojo splaisosomos kompleksų susidarymas HeLa ląstelių branduolių ekstrakto. *A* – MAO-B_g ir MAO-B_a ankstyvojo splaisosomos kompleksų formavimasis priklausomai nuo inkubacijos trukmės (0 ir 20 min.); *B* – kompleksų formavimosi efektyvumo apskaičiavimas kompiuterine *MultiGauge* programa naudojant trijų atskirų eksperimentų duomenis ($p < 0,03$). *A* – ankstyvasis splaisosomos kompleksas, *H* – nespecifinis splaisosomos kompleksas

A



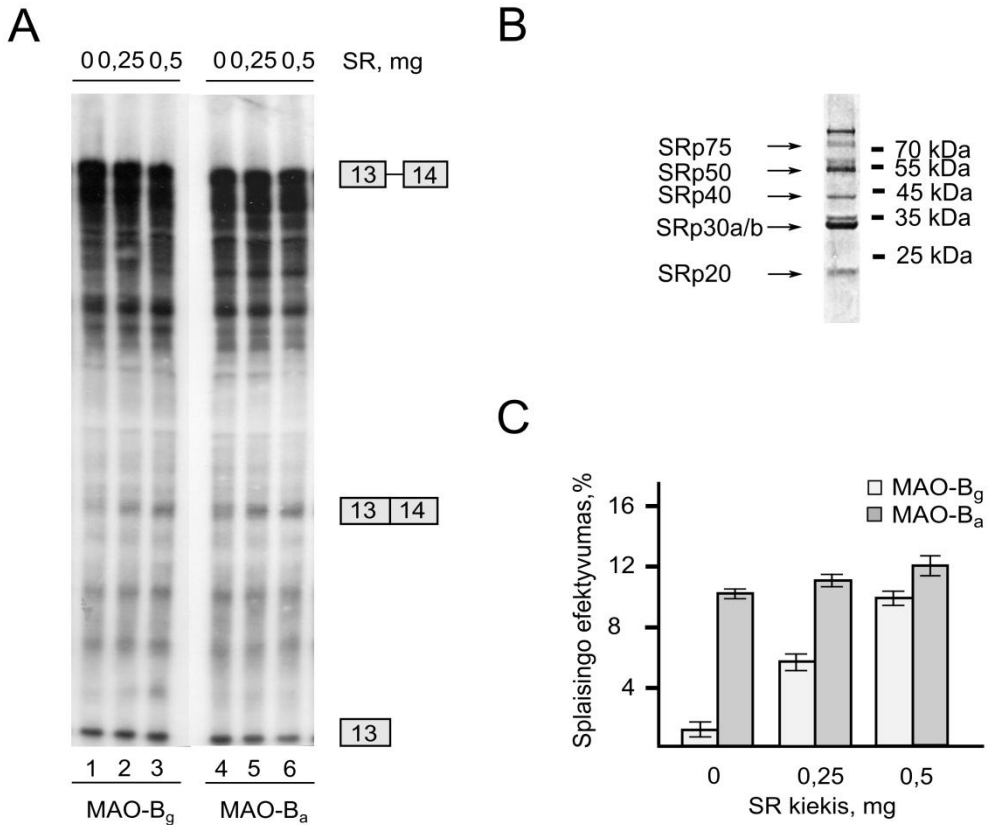
B



3.8 pav. Baltymų iš HeLa ląstelių branduolių ekstrakto sąveika su laukinio ir taškinę mutaciją turinčio MAO-B pre-iRNR. *A* – naudojant ultravioletinius spindulius prie [α -P³²]-CTP žymėtos MAO-B_g ir MAO-B_a pre-iRNR stabiliai prijungtų baltymų radiograma; *B* – baltymų, stabiliai prijungtų prie MAO-B_g ir MAO-B_a pre-iRNR ir ištrauktų iš HeLa ląstelių branduolių ekstrakto, vizualizacija *Western blot* imunohibridizacijos metodu panaudojus anti-SR antikūnus; β -actin – mėginio užnešimo kontrolinis mėginys

Norint įsitikinti, ar SR šeimos baltymų sąveikos su RNR pokyčiai daro įtaką 13-o introno pašalinimo efektyvumui, atliktos pre-iRNR splaisingo reakcijos *in vitro*; į jas papildomai buvo pridėdamas skirtingas kiekis SR šeimos baltymų, iš dalies išgrynintų iš HeLa ląstelių (3.9 pav., *B*). Analizuojant gautus rezultatus pastebėta, kad G nukleotidą turinčio 13-o introno pašalinimo iš pre-iRNR aktyvacijai reikalingi didesni SR šeimos baltymų kiekiai, palyginti su A nukleotidą turinčiu intronu (nuo 2 iki 1,2 k., priklausomai nuo SR baltymų kiekio) (3.9 pav., *A* ir *C*). Šie rezultatai parodo, kad SR baltymai stipriau sąveikaudami su mutaciją

turinčia intronine seka pagreitina splaisosomos formavimąsi su MAO-B_a pre-iRNR, todėl nekoduojanti seka iš pre-iRNR pašalinama greičiau.



3.9 pav. SR šeimos baltymų įtaka laukinio ir taškinę mutaciją turinčio MAO-B pre-iRNR splaisingui *in vitro*. A – MAO-B_g (1–3 takeliai) ir MAO-B_a (4–6 takeliai) pre-iRNR splaisingas pridėjus skirtingus (0,25 ir 0,5 μg) SR baltymų (atitinkamai 2, 3 ir 5, 6 takeliai) kiekius; B – SR šeimos baltymų, išskirtų iš HeLa ląstelių, elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje; C – MAO-B_g ir MAO-B_a iRNR formavimosi efektyvumo apskaičiavimas kompiuterine *MultiGauge* programa naudojant trijų atskirų eksperimentų duomenis ($p < 0,05$)

3.2.2. Rezultatų, gautų tiriant vieno nukleotido polimorfizmo įtaką pre-iRNR splaisingui, apibendrinimas

Apibendrinant tyrimų rezultatus galima teigti, kad G/A polimorfizmas MAO-B geno 13-o introno sekoje lemia šios nekoduojančios sekos pašalinimo efektyvumą. Kadangi kiekviena nekoduojanti seka iš pre-iRNR pašalinama skirtingu efektyvumu, vadinasi, introninės sekos pašalinimas iš pre-iRNR lemia individualios iRNR susidarymo greitį ląstelėje. Padidėjęs vieno introno pašalinimo greitis daro įtaką iRNR susidarymo greičiui, kartu lemdamas susidariusios iRNR kiekį ir baltymo raišką. Palyginus sveikų ir PL sergančių asmenų MAO-B geno 13-o introno srities pirminę DNR struktūrą, buvo nustatyta, kad PL sergančių asmenų DNR sekoje

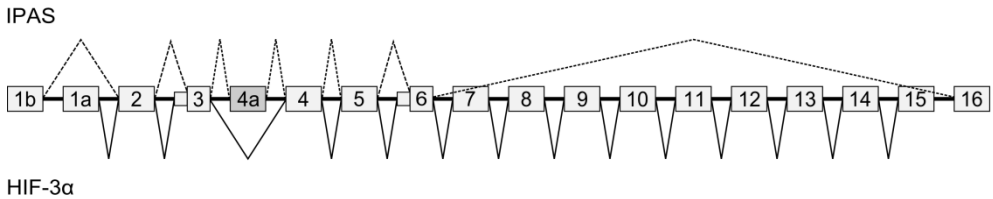
vyrauja „A“ alelis, o sveikų asmenų DNR sekoje – „G“ alelis. Randama padidėjusi „A“ alelių turinti MAO-B raiška, kurią galima paaiškinti pakitusiu 13-o introno sekos pašalinimo iš pre-iRNR efektyvumu. Gauti rezultatai leidžia patvirtinti, kad MAO-B baltymo raiškos lygio pokytis PL sergančių ir sveikų asmenų kraujyje gali būti naudojamas kaip Parkinsono ligos žymuo.

Atliktuose tyrimuose pirmą kartą parodyta pre-iRNR splaisingo sąsaja su neurodegeneracine Parkinsono liga ir šio proceso įtaka ligos vystymuisi. Literatūroje duomenų apie tai iki šiol nebuvo.

3.3. Nuo hipoksijos priklausomas alternatyvusis HIF-3 pre-iRNR splaisingas ir jo reguliacija eukariotinėse ląstelėse

Vienas iš šio darbo tikslų buvo nustatyti veiksnius, reguliuojančius nuo deguonies koncentracijos aplinkoje priklausomą alternatyvų pre-iRNR splaisingą, ir rasti būdus kontroliuoti nuo hipoksijos priklausomų alternatyvių pre-iRNR splaisingo taikinių pasirinkimą.

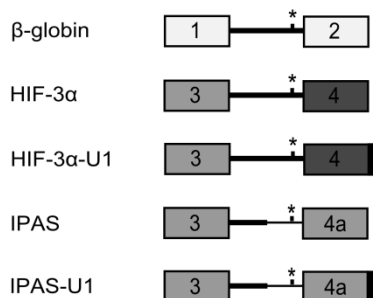
Iškeltam tikslui pasiekti kaip modelinė sistema buvo naudojama pelės HIF-3 pre-iRNR. Priklausomai nuo deguonies kiekio aplinkoje HIF-3α pre-iRNR alternatyviojo splaisingo būdu sudaro skirtingas iRNR: HIF-3α (normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis) ir IPAS (tik hipoksinėmis sąlygomis) (3.10 pav.) (Makino *et al*, 2002).



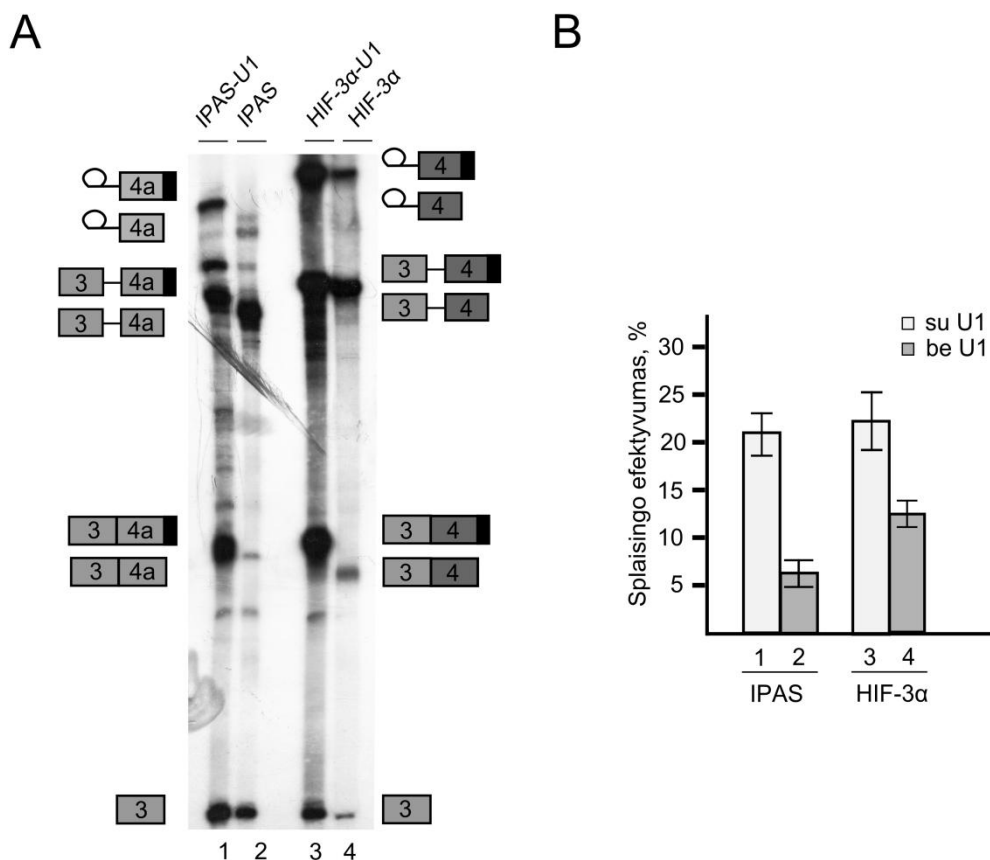
3.10 pav. Pelės HIF-3α pre-iRNR

3.3.1. Deguonies kiekio aplinkoje reguliuojamo alternatyviojo pre-iRNR splaisingo tyrimai

Alternatyviojo pre-iRNR splaisingo tyrimams atlikti buvo padaryti du DNR konstruktai (HIF-3α ir IPAS), turintys splaisingui svarbias 5' taikinio, šakojimosi taško, polipirimidininę ir 3' taikinio sekas. DNR konstruktai apima bendrą 3-io egzono 5' taikinio seką, dalį 3-io introno sekos ir dvi skirtingas 3' taikinio sekas: 4a egzono (IPAS) ir 4-o egzono (HIF-3α) (3.11 pav.). Taip pat buvo padaryti tokie patys DNR konstruktai, kurie turi papildomą splaisingo efektyvumą stimuliuojančią seką (5'-GGGGTGAGTAC-3') 4a egzono (IPAS-U1) ir 4-o egzono (HIF-3α-U1) 3' taikinio sekoje (3.11 pav.). Kaip pre-iRNR splaisingo kontrolinis mėginys buvo naudojamas gerai išanalizuotas triušio β-globino konstruktas, apimantis 1-o egzono, 1-o introno ir 2-o egzono sekas (3.11 pav.).



3.11 pav. HIF-3 α , IPAS ir β -globino pre-iRNR konstruktų schemas. Žvaigždute (*) pažymėtas šakojimosi taškas. Juodas keturkampis – papildoma splaisingo efektyvumą stimuliuojanti seka (HIF-3 α -U1 ir IPAS-U1)



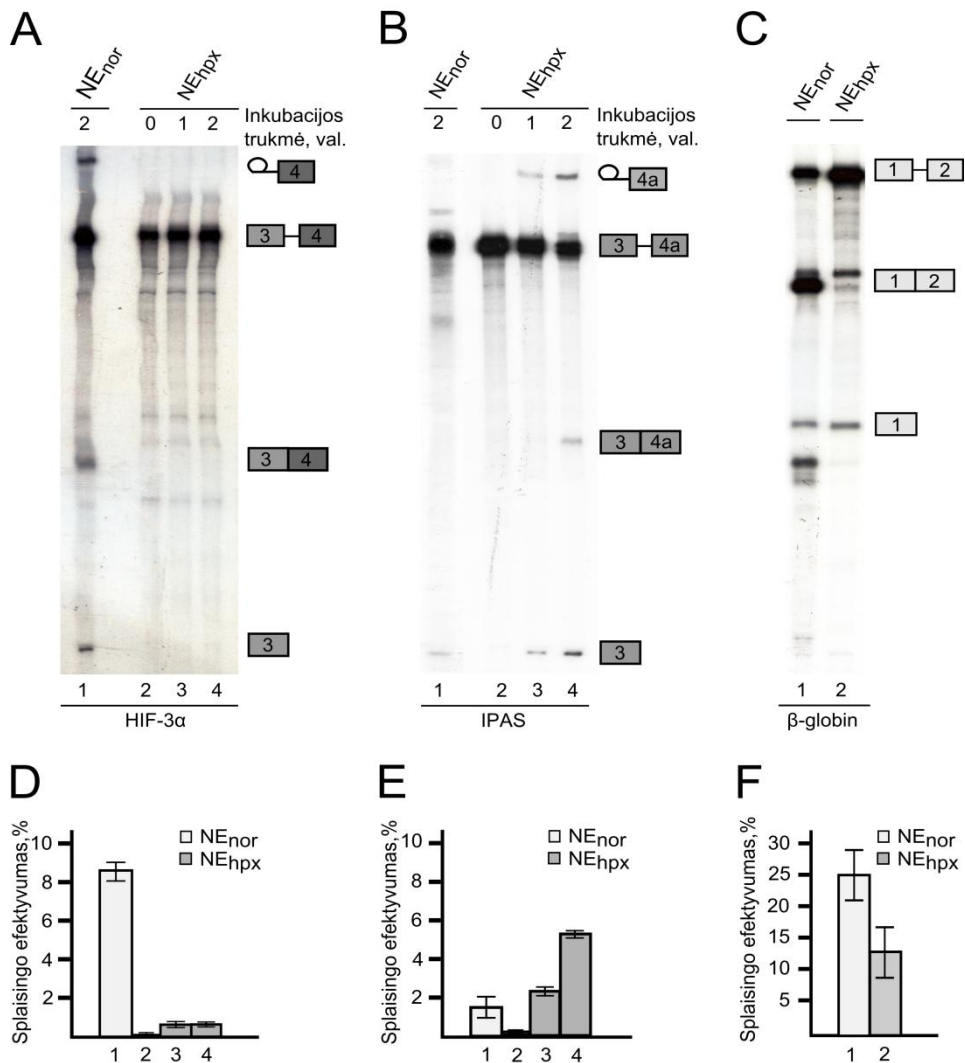
3.12 pav. HIF-3 α ir IPAS pre-iRNR splaisingas *in vitro* HeLa ląstelių, augintų normaliomis deguonies sąlygomis, branduolių ekstraktuose. *A* – HIF-3 α ir IPAS pre-iRNR, kurios turi (3 ir 1 takeliai) splaisingo efektyvumą stimuliuojančias sekas ir kurios jų neturi (4 ir 2 takeliai), splaisingas normaliomis deguonies sąlygomis paruoštuose branduolių ekstraktuose; *B* – HIF-3 α ir IPAS splaisingo reakcijos efektyvumo apskaičiavimas (naudojant trijų atskirų eksperimentų duomenis, $p < 0,05$) kompiuterine *MultiGauge* programa

HIF-3 α ir IPAS pre-iRNR splaisingo *in vitro* tyrimai branduolių ekstraktuose, paruoštuose iš normaliomis deguonies sąlygomis augintų HeLa ląstelių (NE_{nor}), parodė, kad IPAS iRNR susidaro labai neefektyviai (3.12 pav., A ir B, 2 takelis), palyginti su HIF-3 α iRNR (3.12 pav., A ir B, 4 takelis). Kadangi IPAS iRNR susidarymas buvo labai neefektyvus, todėl splaisingo reakcijoje buvo panaudoti pre-iRNR konstruktai, turintys splaisingo efektyvumą stimuliuojančias sekas: IPAS-U1 ir HIF-3 α -U1. Abiejų konstrukto splaisingas vyko per daug efektyviai (3.12 pav., A ir B, 1 ir 3 takeliai), todėl tapo sunku įvertinti reakcijos pokyčius. Dėl šios priežasties nuspręsta jų nebenaudoti tolesniuose tyrimuose. Nors ir nuspręsta nenaudoti IPAS-U1 ir HIF-3 α -U1 konstrukto, tačiau šie tyrimo NE_{nor} ekstraktuose rezultatai parodė, kad tik įterpus splaisingą stimuliuojančią seką IPAS iRNR susidarymas iš labai neefektyvaus buvo paverčiamas į labai efektyvų (5 k.). Šie duomenys netiesiogiai suteikė informacijos, kad IPAS iRNR efektyviam susidarymui reikalinga pakitusi splaisingo veiksnių sąveika su RNR. Tolesniuose pre-iRNR splaisingo tyrimuose buvo naudojami konstruktai be splaisingo efektyvumą stimuliuojančių sekų.

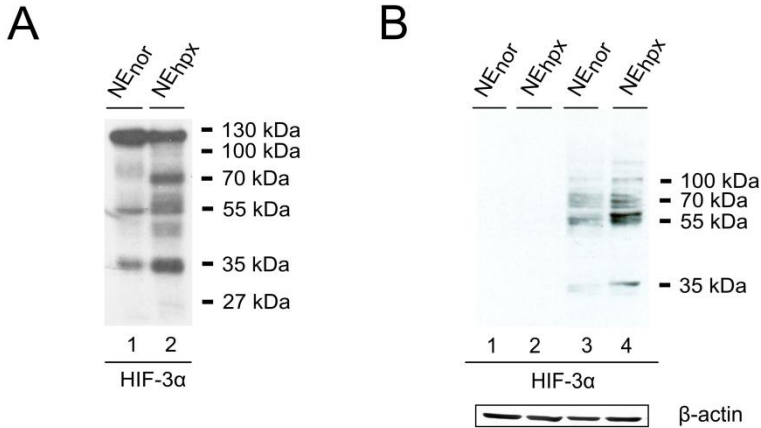
HIF-3 α ir IPAS pre-iRNR splaisingo tyrimas *in vitro* hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių branduolių ekstraktuose (NE_{hpx}) parodė, kad HIF-3 α iRNR susidarymas buvo vos pastebimas (3.13 pav., A ir D, 2–4 takeliai). O IPAS iRNR susidarymas buvo stebimas po 2 val. (25 k.) (3.13 pav., B ir E, 2–4 takeliai). Be to, gelyje matomas laisvas 3-ias egzonus ir kilpos formos introninė dalis, susijungusi su 4a egzonu, vadinasi, jau po 1 val. ima susidaryti splaisingo reakcijos pirmosios stadijos produktai (3.13 pav., B ir E, 3 takeliai). Kaip splaisingo tyrimo kontrolinis mėginys buvo naudojama β -globino pre-iRNR. Ji parodė, kad normaliomis sąlygomis augintų HeLa ląstelių branduolių ekstraktuose pre-iRNR splaisingas vyko dvigubai efektyviau, palyginti su ekstraktais, paruoštais iš hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių (3.13 pav., C ir F, 1 ir 2 takeliai). Vadinasi, hipoksinėmis sąlygomis augintose ląstelėse vyksta efektyvesnis silpnų splaisingo taikinių panaudojimas ir mažiau efektyvus stiprių splaisingo taikinių pasirinkimas.

Nustačius, kad skirtingų iRNR susidarymas hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių branduolių ekstraktuose vyksta nevienodu efektyvumu, toliau buvo siekiama išsiaiškinti, ar splaisingo efektyvumo pokyčius lemia skirtinga baltymų sąveika su RNR. Šiam tikslui pasiekti buvo naudojama HIF-3 α pre-iRNR ir taikomas stabiliojo baltymų prijungimo prie RNR naudojant UV spindulius metodas (angl. *UV cross-linking*). Rezultatai parodė, kad normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių branduolių ekstraktų baltymai su RNR sąveikauja skirtingai: baltymai iš NE_{hpx} su RNR sąveikauja kur kas efektyviau nei NE_{nor} baltymai (3.14 pav., A). Skirtingai su pre-iRNR sąveikaujantiems baltymams, esantiems NE_{nor} ir NE_{hpx} ekstraktuose, nustatyti taikytas stabiliojo baltymų prijungimo prie biotinu žymėtos RNR naudojant ultravioletinius spindulius metodus. Susidarę RNR-baltymų kompleksai iš NE_{nor} ir NE_{hpx} ekstraktų ištraukti su streptavidinagaroze. Skirtingai su RNR sąveikaujantys baltymai nustatyti *Western blot* imunohibridizacijos metodu, naudojant antikūnus, atpažįstančius įvairius splaisingo veiksnis. Naudojant anti-SR antikūnus atlikti tyrimai parodė, kad normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis paruoštų ląstelių branduolių

ekstraktuose skirtingai su RNR sąveikauja SR šeimos baltymai (3.14 pav., B, 3 ir 4 takeliai).



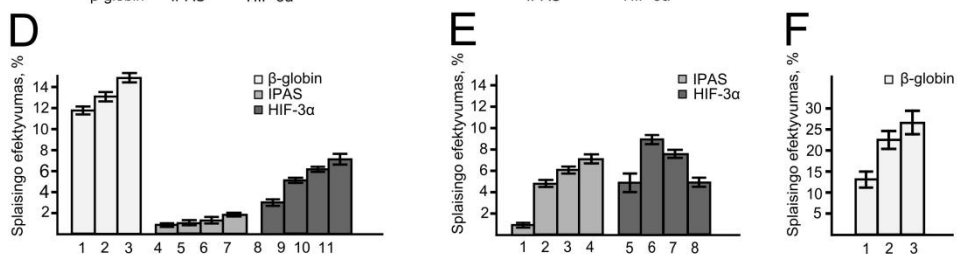
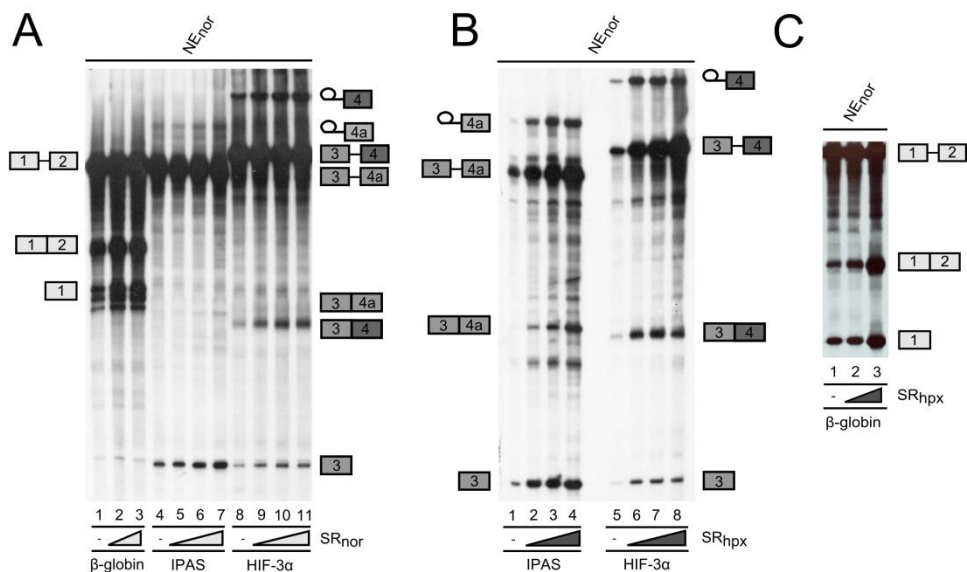
3.13 pav. HIF-3α ir IPAS pre-iRNR splaisingo reakcija *in vitro* branduolių ekstraktuose, paruoštuose iš hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių. *A* – HIF-3α iRNR susidarymas priklausomai nuo laiko: 1 takelis – kontrolinis mėginys (2 val., NE_{nor}); 2, 3, 4 takeliai – inkubacija NE_{hpx} ekstraktuose, atitinkamai 0, 1 ir 2 val. *B* – IPAS pre-iRNR splaisingo (1–3 takeliai) priklausomybė nuo inkubacijos laiko: 1 takelis – kontrolinis mėginys (2 val., NE_{nor}); 2, 3, 4 takeliai – inkubacija NE_{hpx} ekstraktuose, atitinkamai 0, 1 ir 2 val. *C* – β-globino pre-iRNR splaisingas: 1 takelis – kontrolinis mėginys (2 val., NE_{nor}); 2 takelis – 2 val., NE_{hpx}. *D* – HIF-3α, *E* – IPAS, *F* – β-globino iRNR susidarymo efektyvumo įvertinimas. Splaisingo reakcijos efektyvumas buvo skaičiuojamas kompiuterine *MultiGauge* programa naudojant trijų atskirų eksperimentų duomenis ($p < 0,05$)



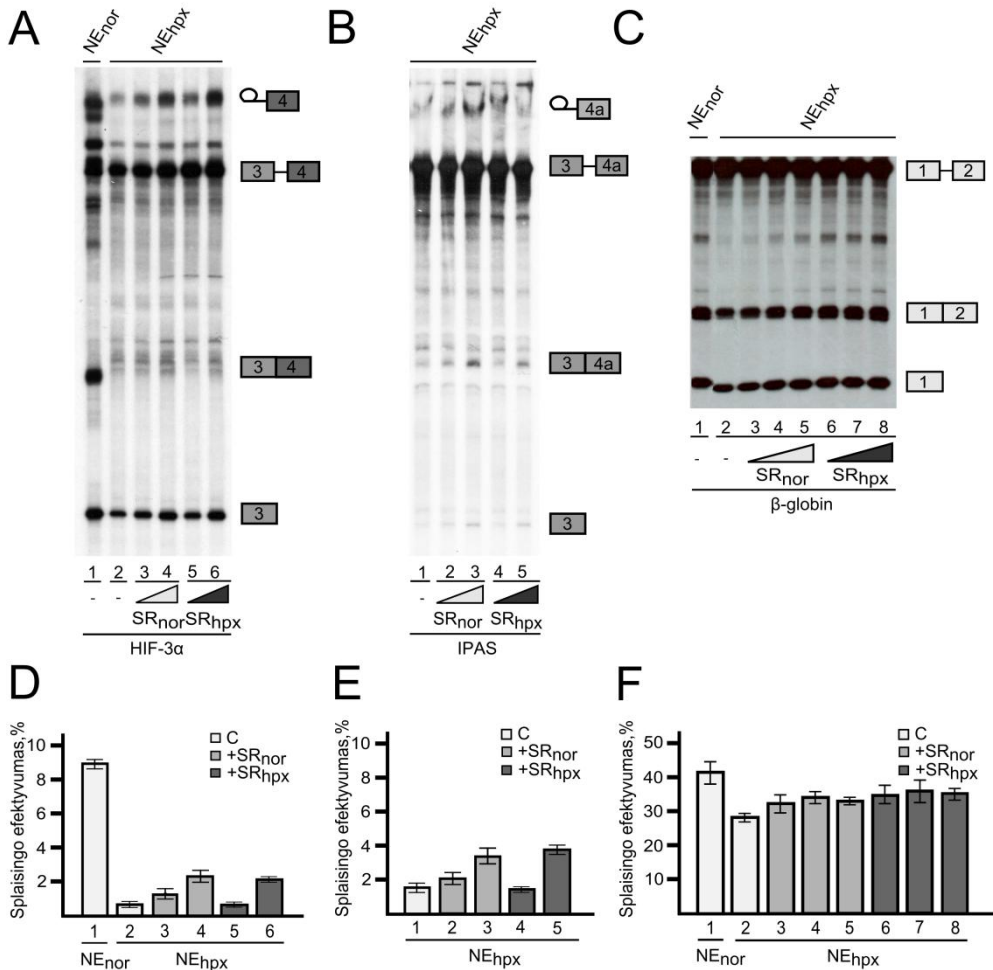
3.14 pav. Baltymų, esančių normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių branduolių ekstraktuose, sąveikos su HIF-3 α pre-iRNR. *A* – baltymų, stabiliai prijungtų prie [α -P³²]-CTP žymėtos HIF-3 α pre-iRNR naudojant UV, radiograma: 1 takelis – NE_{nor}; 2 takelis – NE_{hpx}. *B* – baltymų, stabiliai prijungtų prie biotinu žymėtos HIF-3 α pre-iRNR ir naudojant streptavidiną ištrauktų iš NE_{nor} ir NE_{hpx} ekstraktų, vizualizacija *Western blot* imunohibridizacijos metodu panaudojus anti-SR antikūnus: 1 takelis – kontrolinis mėginys (biotinu nežymėta RNR) NE_{nor}; 2 takelis – kontrolinis mėginys (biotinu nežymėta RNR) NE_{hpx}; 3 takelis – iš NE_{nor} ekstraktų ištraukti baltymai; 4 – iš NE_{hpx} ekstraktų ištraukti baltymai; β -actin – mėginio užnešimo kontrolinis mėginys

Priklausomai nuo deguonies kiekio aplinkoje, skirtingas sąveikas su RNR sudarantys SR šeimos baltymai buvo iš dalies išgryninti iš HeLa ląstelių (Wu, Green, 1997), augintų normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis (atitinkamai SR_{nor} ir SR_{hpx}) (3.18 pav., *A*). Šie išgryninti SR_{nor} ir SR_{hpx} baltymai buvo panaudoti tolesniuose nuo deguonies kiekio aplinkoje priklausomo pre-iRNR splaisingo tyrimuose *in vitro*, papildomai jų pridedant į pre-iRNR splaisingo reakcijas.

Papildomai pridėjus SR_{nor} baltymų į NE_{nor} ekstraktus, aktyvintas β -globino (1,25 k.) ir HIF-3 α (2,5 k.) pre-iRNR splaisingas (3.15 pav., atitinkamai *A* ir *D*, 1–3 ir 8–11 takeliai), tačiau tai nedarė jokios įtakos IPAS konstrukto splaisingui (3.15 pav., *A* ir *D*, 4–7 takeliai). Papildomai pridėjus SR_{hpx} baltymų į NE_{nor} ekstraktus, aktyvintas visų trijų konstrukto (2 k. β -globino, 1,7 k. HIF-3 α ir 7 k. IPAS) pre-iRNR splaisingas (3.15 pav., *B*, *E* ir *C*, *F*). Šis tyrimas parodė, kad iš hipoksinėmis sąlygomis augintų ląstelių išgryninti SR šeimos baltymai pasižymi skirtingomis splaisingo aktyvinimo savybėmis.

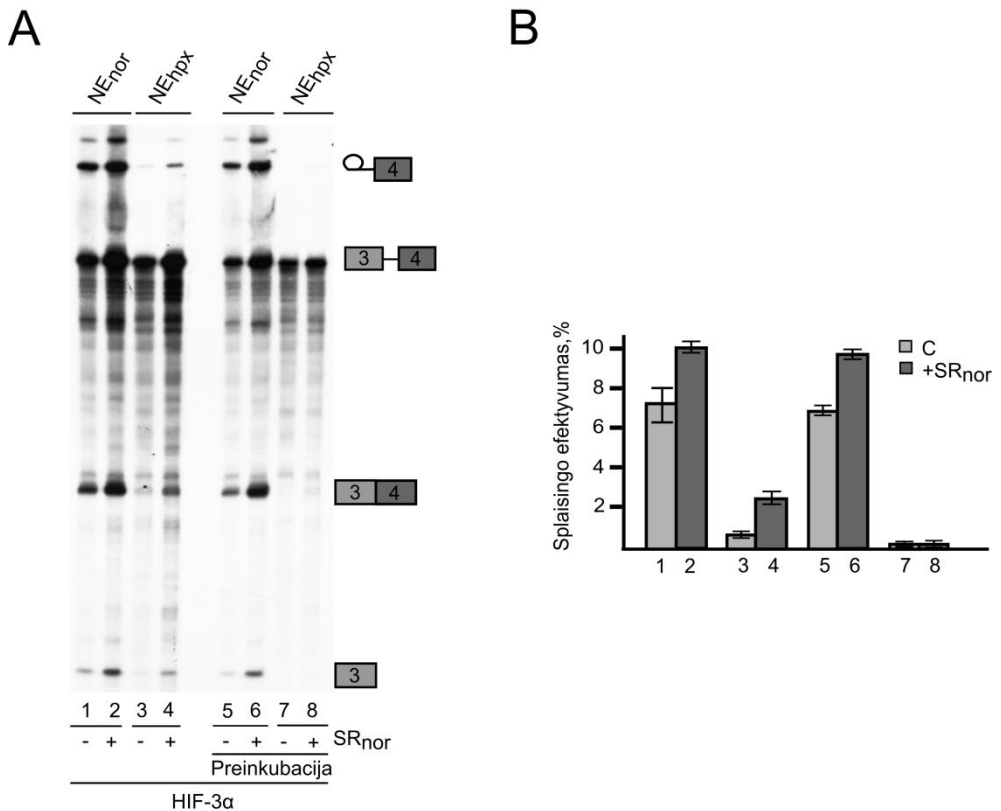


3.15 pav. SR_{nor} ir SR_{hpx} šeimos baltymų įtaka HIF-3α, IPAS ir β-globino pre-iRNR splaisingui *in vitro* branduolių ekstraktuose, paruoštuose iš normaliomis deguonies sąlygomis augintų HeLa ląstelių. *A* – β-globino, IPAS ir HIF-3α pre-iRNR splaisingas NE_{nor} (atitinkamai 1, 4 ir 8 takeliai) ir pridėjus skirtingą kiekį (0,25–0,75 μg) SR_{nor} baltymų (atitinkamai 2, 3 (β-globino), 5–7 (IPAS) ir 9–11 (HIF-3α) takeliai). *B* – IPAS ir HIF-3α pre-iRNR splaisingas NE_{nor} (1 ir 3 takeliai) ir pridėjus skirtingą kiekį (0,25– 0,75 μg) SR_{hpx} baltymų (atitinkamai 2–4 (IPAS) ir 6–8 (HIF-3α) takeliai). *C* – β-globino pre-iRNR splaisingas NE_{nor} (1 takelis) ir pridėjus skirtingą kiekį (0,25–0, 5 μg) SR_{hpx} baltymų (2 ir 3 takeliai). *D* – β-globino (1–4 takeliai), IPAS (4–7 takeliai) ir HIF-3α (8–11 takeliai) iRNR susidarymo efektyvumo skaičiavimas reakcijoje esant skirtingam SR_{nor} baltymų kiekiui. *E* – IPAS ir HIF-3α (atitinkamai 1–4 ir 5–8 takeliai) iRNR susidarymo efektyvumo skaičiavimas reakcijoje esant skirtingam SR_{hpx} baltymų kiekiui. *F* – β-globino iRNR susidarymo efektyvumo skaičiavimas (1–3 takeliai) esant skirtingam SR_{hpx} baltymų kiekiui. Splaisingo reakcijos efektyvumas buvo skaičiuojamas kompiuterine *MultiGauge* programa naudojant trijų atskirų eksperimentų duomenis ($p < 0,05$)



3.16 pav. SR_{nor} ir SR_{hpx} šeimos baltymų įtaka HIF-3α, IPAS ir β-globino pre-iRNR splaisingui *in vitro* branduolių ekstraktuose, paruoštuose iš hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių. *A* – HIF-3α pre-iRNR splaisingas pridėjus skirtingą kiekį SR_{nor} bei SR_{hpx} baltymų: 1 takelis – kontrolinis mėginys (NE_{nor}), 2 takelis – kontrolinis mėginys (NE_{hpx}), 3 ir 4 takeliai – pridėta atitinkamai 0,25 ir 0,5 μg SR_{nor}; 5 ir 6 takeliai – pridėta atitinkamai 0,25 ir 0,5 μg SR_{hpx}. *B* – IPAS pre-iRNR splaisingas pridėjus skirtingą kiekį SR_{nor} bei SR_{hpx} baltymų: 1 takelis – kontrolinis mėginys (NE_{hpx}), 2 ir 3 takeliai – pridėta atitinkamai 0,25 ir 0,5 μg SR_{nor}; 4 ir 5 takeliai – pridėta atitinkamai 0,25 ir 0,5 μg SR_{hpx}. *C* – β-globino pre-iRNR splaisingas pridėjus skirtingą kiekį SR_{nor} bei SR_{hpx} baltymų: 1 takelis – kontrolinis mėginys (NE_{nor}), 2 takelis – kontrolinis mėginys (NE_{hpx}), 3–5 takeliai – pridėta atitinkamai 0,25, 0,5 ir 0,75 μg SR_{nor}; 6–8 takeliai – pridėta atitinkamai 0,25, 0,5 ir 0,75 μg SR_{hpx}. *D* – HIF-3α, (*E*) IPAS ir (*F*) β-globino iRNR susidarymo efektyvumo įvertinimas esant skirtingam SR_{nor} bei SR_{hpx} šeimos baltymų kiekiui. Splaisingo reakcijos efektyvumas skaičiuotas kompiuterine *MultiGauge* programa naudojant trijų atskirų eksperimentų duomenis ($p < 0,05$)

Tolesniuose eksperimentuose buvo panaudotas branduolių ekstraktas, paruoštas iš hipoksinėmis sąlygomis kultivuotų HeLa ląstelių. Papildomai pridėjus SR_{nor} ar SR_{hpx} baltymų į NE_{hpx} ekstraktus, HIF-3 α (1,1 k.) (3.16 pav., A ir D) ir IPAS (2 k.) splaisingas (3.16 pav., B ir E) aktyvintas nedaug ir tai iš esmės neturėjo įtakos β -globino konstrukto splaisingo efektyvumui (3.16 pav., C ir F). Apibendrinant SR šeimos baltymų daromą įtaką pre-iRNR splaisingui, galima teigti, kad iš hipoksinių ląstelių išskirti SR baltymai (SR_{hpx}) pasižymi skirtingu aktyvumu, palyginti su SR baltymais, išskirtais iš normaliomis deguonies sąlygomis augintų ląstelių (SR_{nor}).



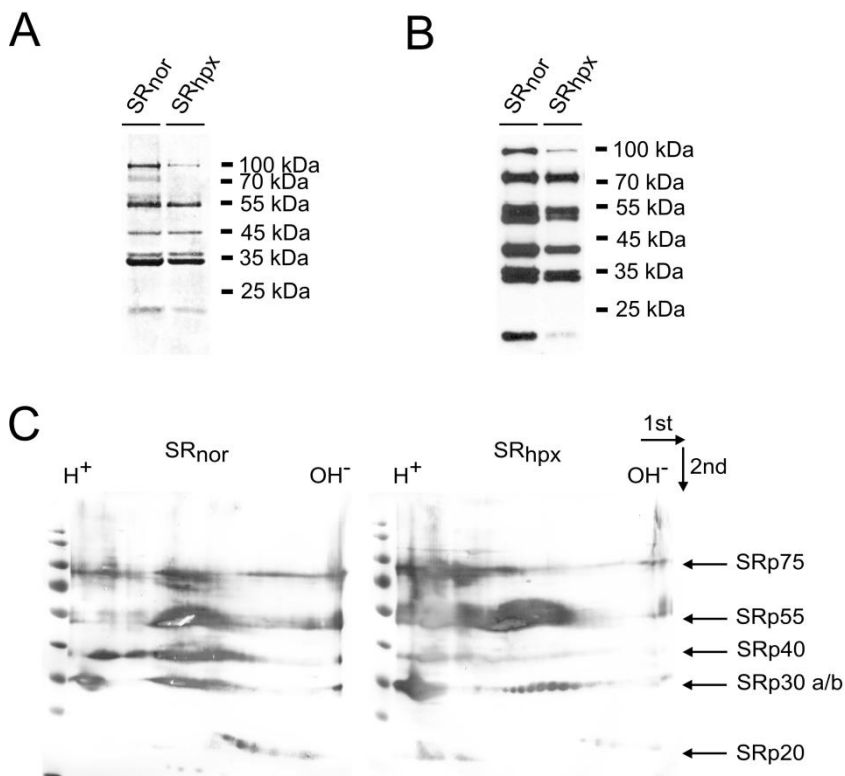
3.17 pav. SR_{nor} šeimos baltymų preinkubacijos poveikis HIF-3 α pre-iRNR splaisingui normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis paruoštuose branduolių ekstraktuose. A – HIF-3 α pre-iRNR splaisingas NE_{nor} (1, 2, 5, 6 takeliai) ir NE_{hpx} (3, 4, 7, 8 takeliai) ekstraktuose. Reakcijos, į kurias įdėta 0,5 μ g SR_{nor} baltymų (2, 4, 6, 8 takeliai), vykdytos tiesiogiai (1–4 takeliai) ir 20 min. atliekant SR_{nor} baltymų preinkubaciją 30 °C temperatūroje NE_{nor} ir NE_{hpx} ekstraktuose, po to pridėdant RNR (5–8 takeliai). B – iRNR susidarymo efektyvumo skaičiavimas (naudojant trijų atskirų eksperimentų duomenis, $p < 0,05$) kompiuterine *MultiGauge* programa

Žinoma, jog SR šeimos baltymų RS motyvas yra fosforilnamas (Howard, Sanford, 2015) ir nuo šio motyvo fosforilinimo lygio priklauso SR baltymų aktyvumai. Kyla klausimas: ar SR_{nor} ir SR_{hpx} baltymų skirtingą gebėjimą aktyvinti

splaisingą lemia nevienodas šių baltymų fosforilinimas? Norint tai išsiaiškinti, buvo atlikti eksperimentai: į HIF-3 α pre-iRNR splaisingo reakcijas NE_{nor} ir NE_{hpx} ekstraktuose buvo skirtingai pridėtas papildomas kiekis SR_{nor} baltymų: vienu atveju visi reakcijos komponentai buvo sudėti iš karto ir leista vykti splaisingo reakcijai (3.17 pav., A ir B, 1–4 takeliai), o kitu atveju SR_{nor} baltymai su NE_{nor} ir NE_{hpx} ekstraktais pradžioje buvo 20 min. inkubuojami 30 °C temperatūroje, po to įdėta pre-iRNR ir leista vykti splaisingo reakcijai *in vitro*. Preinkubacija buvo atlikta manant, kad jeigu šie baltymai hipoksinėmis ir normaliomis deguonies sąlygomis paruoštuose ekstraktuose yra modifikuoti skirtingai, tai ekstraktuose esantys specifiniai fermentai modifikuos SR baltymus ir jie pradės veikti skirtingai (3.17 pav., A ir B, 5–8 takeliai). Gauti rezultatai parodė, kad SR_{nor} baltymai, į reakcijos mišinį įdėti tiesiogiai ar įvykdžius preinkubaciją, geba aktyvinti HIF-3 α pre-iRNR splaisingą NE_{nor} ekstraktuose (1,4 k.) (3.17 pav., A ir B, 1, 2 ir 5, 6 takeliai). Tiesiogiai pridėjus SR_{nor} baltymų į NE_{hpx} ekstraktus HIF-3 α pre-iRNR splaisingas buvo aktyvintas apie tris kartus (3.17 pav., A ir B, 3 ir 4 takeliai), o po preinkubacijos NE_{hpx} ekstrakte SR_{nor} baltymai prarado savo gebėjimą aktyvinti HIF-3 α pre-iRNR splaisingą (3.17 pav., A ir B, 7 ir 8 takeliai). Apibendrinant rezultatus, galima daryti išvadą, kad SR_{nor} baltymų preinkubacija hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių ekstrakte splaisingą aktyvuojančius baltymus paverčia į splaisingą slopinančius baltymus. Ši SR šeimos baltymų gebėjimo aktyvinti pre-iRNR splaisingą praradimą galima paaiškinti pakitusiu šių baltymų fosforilinimo lygiu.

Siekiant įsitikinti iškeltos prielaidos pagrįstumu, buvo atlikta SR baltymų analizė *Western blot* imunohibridizacijos metodu naudojant mAb104 antikūną. Šis antikūnas sąveikauja su SR baltymų RS motyvu ir šios sąveikos stiprumas priklauso nuo RS motyvo modifikacijos lygio (Shepard, Hertel, 2009). Palyginus vienodus SR_{nor} ir SR_{hpx} baltymų kiekius (3.18 pav., A), paaiškėjo, kad šis antikūnas SR_{hpx} baltymus atpažįsta daug silpniau nei SR_{nor} baltymus (3.18 pav., B); tai rodo skirtingą šių baltymų modifikacijos lygį. Šiai prielaidai patvirtinti SR_{nor} ir SR_{hpx} baltymai buvo išfrakcionuoti taikant dviejų dimensijų baltymų elektroforezės metodą. Duomenų analizė *Western blot* imunohibridizacijos metodu naudojant nuo modifikacijos lygio nepriklausomą anti-SR antikūną parodė, kad SR_{hpx} baltymai yra pasislinkę į rūgštinę pusę. Tai įrodo, kad SR_{hpx} baltymų fosforilinimo lygis yra daug didesnis nei SR_{nor} baltymų. Kaip jau literatūros apžvalgoje minėta, SR baltymų fosforilinimo lygis yra svarbus veiksnys, lemiantis šių baltymų aktyvumą (Graveley, 2000). Galima teigti, kad nevienodi SR_{nor} ir SR_{hpx} šeimos baltymų modifikacijos lygiai lemia skirtingus jų aktyvumus (3.18 pav., C).

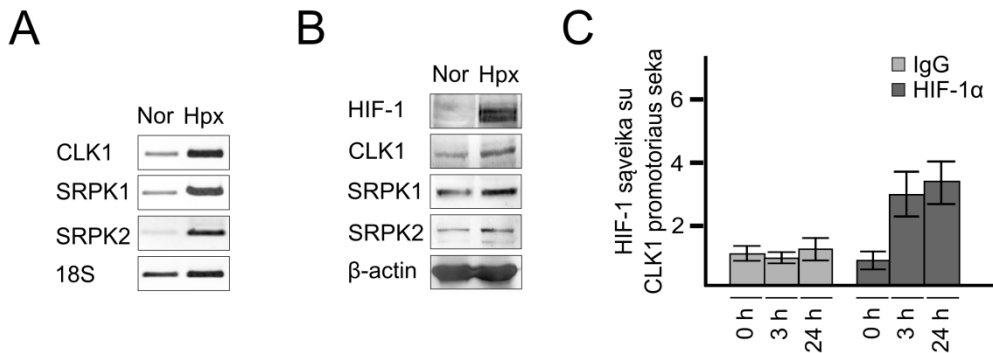
Literatūroje paskelbta, kad SR šeimos baltymų RS motyve esančios serino aminorūgščių liekanos yra fosforilinamos naudojant specifines SR šeimos baltymų kinazes (CLK1, SRPK1 ir SRPK2) (Ghosh, Adams, 2011). Tolesniuose eksperimentuose buvo palyginta šių specifinių SR šeimos baltymų kinazių raiška normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis augintose HeLa ląstelėse RNR ir baltymo lygmenyse.



3.18 pav. SR šeimos baltymų, išskirtų iš normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių, modifikacijos skirtumai. *A* – SR_{nor} ir SR_{hpx} baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje; *B* – SR_{nor} ir SR_{hpx} baltymų analizė *Western blot* imunohibridizacijos metodu naudojant mAb104 antikūną; *C* – SR_{nor} ir SR_{hpx} baltymų dviejų dimensijų elektroforezės analizė *Western blot* imunohibridizacijos metodu naudojant anti-SR antikūną

Palyginus CLK1, SRPK1 ir SRPK2 iRNR raišką normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis kultivuotose ląstelėse pastebėta, kad hipoksinėse ląstelėse ypač padidėjusi visų trijų kinazių raiška (3.19 pav., *A*). Tiriant CLK1, SRPK1 ir SRPK2 baltymų raišką hipoksinėmis sąlygomis augintose ląstelėse, taip pat nustatyta padidėjusi jų raiška, palyginti su normaliomis deguonies sąlygomis augusiose ląstelėse. Hipoksinėse ląstelėse rasta gerokai padidėjusi CLK1 ir SRPK1 baltymo raiška, o SRPK2 baltymo raiška buvo padidėjusi tik truputį (3.19 pav., *B*). Paminėtina, kad CLK1 baltymo raiška buvo tiriama branduolių ekstraktuose, paruoštuose iš normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis kultivuotų HeLa ląstelių, nes ši kinazė randama tik branduolyje. SRPK1 ir SRPK2 kinazių yra ląstelių citoplazmoje ir branduolyje, todėl jų baltymų raiškos tyrimai buvo atliekami normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių lizatuose (Zhou, Fu, 2013).

Nustačius, kad hipoksinėse ląstelėse yra padidėjusi CLK1, SRPK1 ir SRPK2 kinazių raiška, iškilo klausimas, ar HIF-1 transkripcijos veiksnys daro įtaką specifinių SR baltymų kinazių raiškos padidėjimui. Siekiant tai išsiaiškinti, buvo atlikta CLK1, SRPK1 ir SRPK2 kinazių genų promotoriaus sekos bioinformatinė analizė. Nustatyta, kad *CLK1* geno promotoriaus dalyje yra penkios galimos hipoksijos indukuojamo veiksnio (HIF-1) sąveikos su DNR vietos (5'-d(RCGTG)-3', kur R yra A arba G), o *SRPK1* ir *SRPK2* genuose HIF-1 veiksnio sąveikos su promotoriaus seka vietų nenustatyta. Tai leidžia daryti prielaidą, kad padidėjusią *CLK1* geno raišką hipoksinėse ląstelėse gali lemti HIF-1 veiksnys. Šiai prielaidai patvirtinti buvo atlikta chromatinio imunoprecipitacija naudojant anti-HIF-1 antikūną, po to vykdyta realaus laiko PGR (qPGR) reakcija. Tyrimo duomenys parodė, kad HIF-1 tris kartus stipriau sąveikauja su CLK1 promotoriaus seka hipoksinėmis sąlygomis augusiose ląstelėse, palyginti su normaliomis deguonies sąlygomis augusiomis ląstelėmis (3.19 pav., C). Remiantis tyrimu, galima teigti, kad CLK1 raiškos padidėjimą ląstelėse, kultivuotose hipoksinėmis sąlygomis, lemia hipoksijos indukuojamas transkripcijos veiksnys HIF-1.

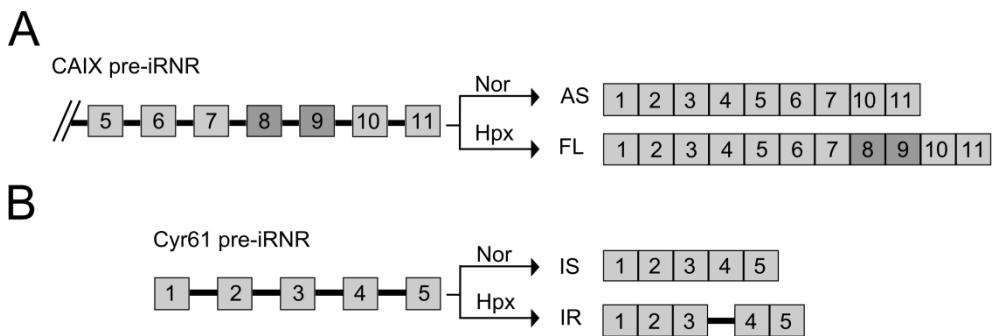


3.19 pav. Specifinių SR šeimos baltymų kinazių raiška normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis augintose ląstelėse. *A* – CLK1, SRPK1 ir SRPK2 iRNR raiška normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis augintose ląstelėse; *B* – CLK1, SRPK1 ir SRPK2 baltymų raiška normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis augintose ląstelėse; *C* – HIF-1 veiksnio įtakos CLK1 geno transkripcijos aktyvinimui matavimas taikant chromatinio imunoprecipitacijos metodą. Potencialios HIF-1 sąveikos su CLK1 promotoriaus seka padaugintos qPGR reakcijoje. Skaičiuota kompiuterine *MultiGauge* programa naudojant trijų atskirų eksperimentų duomenis ($p < 0,05$)

Įvertinus atliktus eksperimentus, buvo nustatyta, kad hipoksijos atveju ląstelėse kinta SR šeimos baltymų funkcinis aktyvumas, kurį lemia padidėjęs RS motyvo fosforilinimo lygis, priklausomas nuo padidėjusios SR šeimos baltymų kinazių (CLK1 ir SRPK1, SRPK2) raiškos.

Siekiant patikrinti CLK1 raiškos įtaką nuo hipoksijos priklausomam pre-iRNR splaisingui, buvo pasirinktos literatūroje aprašytos endogeninės karboanhidrazės IX (CAIX) ir daug cisteino turinčio angiogenezės aktyviklio 61 (Cyr61) pre-iRNR, kurių alternatyvusis splaisingas kinta priklausomai nuo hipoksijos. CAIX baltymas yra atsakingas už ląstelės pH kontrolę ir adheziją. Iš CAIX pre-iRNR alternatyviojo

splaisingo būdu sudaromos dvi iRNR izoformos: ilgoji CAIX iRNR izoforma (FL CAIX), gauta sujungiant visus 11 egzonų, ir trumpoji CAIX iRNR izoforma (AS CAIX), neturinti 8 ir 9 egzonų, koduojančių baltymo transmembraninį motyvą. Normaliomis deguonies sąlygomis ląstelėje randami nedideli kiekiai AS CAIX iRNR, o FL CAIX susidaro hipoksinėmis sąlygomis ir yra siejama su navikų atsiradimu ir vystymusi (3.20 pav., A) (Barathova *et al*, 2008). Cyr61 baltymas yra svarbus ląstelių adhezijos, migracijos, proliferacijos ir apoptozės procesams. Literatūroje aprašyta, kad sumažėjusi Cyr61 baltymo raiška randama kai kuriuose navikuose, pvz., prostatos ir gimdos leiomiomose, o padidėjusi Cyr61 baltymo raiška slopina navikinių ląstelių vystymąsi (Perbal, 2009). Nuo hipoksijos priklausomo pre-iRNR alternatyviojo splaisingo metu susidaro dvi Cyr61 iRNR izoformos: viena izoforma yra gaunama sujungiant visus penkis pre-iRNR sudarančius egzonus (IS), kitoje izoformoje tarp 3-io ir 4-o egzonų esanti introninė seka ne iškerpama, o įterpiama į subrendusią iRNR (IR) (3.20 pav., B). Hipoksinėse ląstelėse pradeda formuotis Cyr61 IR iRNR izoforma, bet ar nuo šios izoformos sintetinamas baltymas, duomenų nėra. Aišku viena – kad alternatyvusis pre-iRNR splaisingas yra svarbus reguliuojant Cyr61 baltymo raišką ląstelėje.

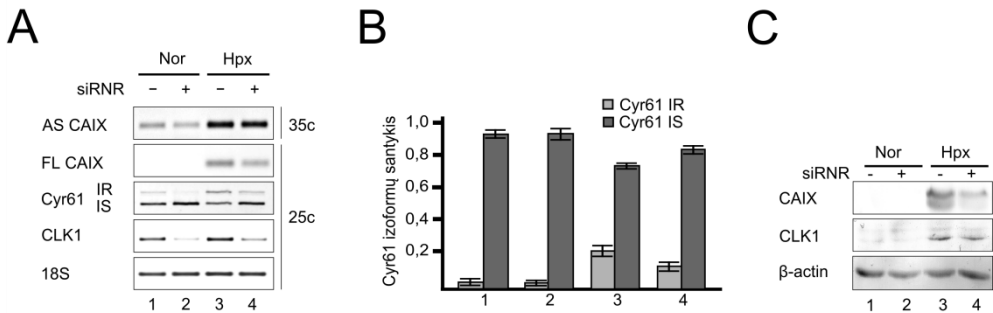


3.20 pav. Nuo hipoksijos priklausomo alternatyviojo CAIX (A) ir Cyr61 (B) pre-iRNR splaisingo scheminis vaizdas

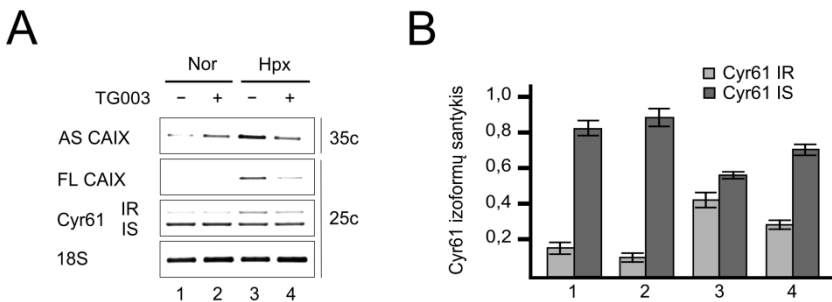
Norint sužinoti, kaip nuo CKL1 kiekio ląstelėje priklauso hipoksijos reguliuojamas alternatyvusis CAIX ir Cyr61 pre-iRNR splaisingas, buvo atlikti eksperimentai *in vivo*, normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis augintas HeLa ląsteles veikiant specifine CLK1 siRNR (3.21 pav., A). Normaliomis deguonies sąlygomis augintas ląsteles paveikus CLK1 siRNR, pastebėtas nedidelis AS CAIX iRNR izoformos sumažėjimas (3.21 pav., A, 2 takelis). O hipoksinėse HeLa ląstelėse sumažintas CLK1 kiekis turi mažai įtakos AS CAIX izoformos susidarymui, bet slopina FL CAIX izoformos susidarymą (3.21 pav., A, 4 takelis). Analizuojant FL CAIX baltymo raišką (3.21 pav., C) nustatyta, kad sumažintas CLK1 kiekis ląstelėse lemia sumažėjusį CAIX baltymo kiekį (3.21 pav., C, 4 takelis).

Sumažintos CLK1 raiškos įtakos Cyr61 pre-iRNR splaisingui tyrimas parodė, kad normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis augintose ląstelėse gerokai pasikeičia Cyr61 iRNR izoformų santykis (3.21 pav., A ir B, 1 ir 3 takeliai):

hipoksinėmis sąlygomis augintose ląstelėse susidaro daugiau Cyr61 IR iRNR izoformos (5 k.). Naudojant siRNR sumažinus CLK1 raišką gauta, kad normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis augintose ląstelėse šiek tiek padidėja Cyr61 IS iRNR izoformos susidarymas (1,2 k.) ir slopinamas Cyr61 IR iRNR izoformos formavimasis (1,7 k.) (3.21 pav., A ir B, 2 ir 4 takeliai). Taigi gauti rezultatai rodo, kad CLK1 raiškos sumažinimas keičia CAIX ir Cyr61 alternatyvųjų pre-iRNR splaisingą ląstelėje: slopina hipoksinėmis sąlygomis susidarancių iRNR (FL CAIX ir Cyr61 IR) izoformų formavimąsi.



3.21 pav. Sumažintos CLK1 raiškos ląstelėje įtaka nuo hipoksijos priklausomam alternatyviajam CAIX ir Cyr61 pre-iRNR splaisingui. A – CLK1 siRNR poveikis CAIX ir Cyr61 pre-iRNR splaisingui; B – Cyr61 IR ir IS iRNR izoformų santykių skaičiavimo (naudojant trijų atskirų eksperimentų duomenis, $p < 0,05$) kompiuterine *MultiGauge* programa diagrama; C – sumažinto CLK1 baltymo kiekio įtaka CAIX baltymo raiškai normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis augintose ląstelėse; (–) – kontroline siRNR transfektuotos ląstelės (1 ir 3 takeliai); (+) – CLK siRNR transfektuotos ląstelės (2 ir 4 takeliai); 35c ir 25c – PGR ciklų skaičius; 18S ir β -actin – užnešimo kontrolinis mėginys



3.22 pav. CLK1 aktyvumo sumažinimo specifiniais inhibitoriais įtaka nuo hipoksijos priklausomam alternatyviajam CAIX ir Cyr61 pre-iRNR splaisingui. A – specifinio CLK1 kinazės inhibitoriaus TG003 įtaka nuo hipoksijos priklausomam alternatyviajam CAIX ir Cyr61 pre-iRNR splaisingui; (–) – TG003 neveiktos ląstelės (1 ir 3 takeliai); (+) –TG003 paveiktos ląstelės (2 ir 4 takeliai); 35c ir 25c – PGR ciklų skaičius; B – Cyr61 IR ir IS iRNR izoformų santykių skaičiavimo diagrama (naudojant trijų atskirų eksperimentų duomenis, $p < 0,05$); 18S – užnešimo kontrolinis mėginys

Siekiant patvirtinti CLK1 kinazės svarbą nuo hipoksijos priklausomo alternatyviojo splaisingo reguliacijai, buvo atlikti eksperimentai *in vivo*, panaudojant specifinį CLK1 kinazės inhibitorių TG003 (Muraki *et al*, 2004). Specifiniu inhibitoriumi slopinant CLK1 raišką HeLa ląstelėse, augintose normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis, buvo gauti tokie patys alternatyviojo CAIX ir Cyr61 pre-iRNR splaisingo rezultatai (Cyr61 IS – 1,2 k., Cyr61 IR – 1,5 k.) (3.22 pav., A ir B, 2 ir 4 takeliai), kaip paveikus ląsteles CLK1 siRNR (3.21 pav., A ir B, 2 ir 4 takeliai). O tai dar kartą leidžia patvirtinti didelę specifinių SR šeimos baltymų kinazių reikšmę nuo hipoksijos priklausomo alternatyviojo pre-iRNR splaisingo reguliavimui.

3.3.2. Rezultatų, gautų tiriant nuo hipoksijos priklausomą alternatyvųjų HIF-3 pre-iRNR splaisingą, apibendrinimas

Apibendrinant nuo hipoksijos priklausomo alternatyviojo HIF-3 ir IPAS pre-iRNR splaisingo tyrimų rezultatus, buvo nustatyta, kad vienas pagrindinių alternatyvųjų splaisingą reguliuojančių veiksnių yra SR baltymų šeima. Sumažėjus deguonies kiekiui aplinkoje, ląstelėje prasideda pokyčiai, kurių būtinai reikia išgyventi pakitusiomis sąlygomis. Vienas iš šių pokyčių – specifinių SR baltymų kinazių raiškos padidėjimas, kuris lemia SR šeimos baltymų modifikacijos lygio ir jų aktyvumo kitimą. Dėl šios priežasties ląstelėse pradedami naudoti alternatyvūs splaisingo taikiniai, kurie normaliomis sąlygomis nėra pasirenkami. Nuo tokių pakitusių iRNR izoformų susintetinti baltymai padeda ląstelėms išgyventi sumažėjus deguonies kiekiui aplinkoje.

Šiame skyriuje atlikti tyrimai dar kartą parodo alternatyviojo pre-iRNR splaisingo svarbą ir įtaką žmogaus ligų vystymosi procese. Pirmą kartą nustatyti veiksniai, reguliuojantys nuo hipoksijos priklausomą pre-iRNR splaisingą, kuriuos kontroliuojant galima slopinti hipoksinėse ląstelėse pakitusių iRNR susidarymą.

BENDROSIOS IŠVADOS

1. Parkinsono ligos atveju padidėjęs MAO-B baltymo raiškos lygis (palyginti su raiška sveikame žmoguje) yra tinkamas naudoti diagnozuojant Parkinsono ligą žmogaus organizme.

2. „A“ alelį turinti nekoduojanti seka padidina introninės sekos pašalinamo efektyvumą.

3. G/A nukleotido polimorfizmas nėra specifinis tik *MAO-B* geno 13-o introno pašalinimo efektyvumui.

4. *MAO-B* geno 13-o introno sekoje esantis G/A polimorfizmas lemia SR šeimos baltymų sąveikos su pre-iRNR pokyčius: A nukleotidą turinti introninė seka pagreitina splaisosomos komplekso susidarymą, o tai padidina nekoduojančios sekos pašalinimo efektyvumą.

5. SR šeimos baltymai, išgryninti iš hipoksinėmis sąlygomis augintų HeLa ląstelių, pasižymi didesniu gebėjimu aktyvinti pre-iRNR splaisingą nei SR šeimos baltymai, išskirti iš normaliomis deguonies sąlygomis kultivuotų HeLa ląstelių.

6. SR šeimos baltymų, išskirtų iš hipoksinėmis sąlygomis augintų ląstelių, fosforilinimo lygis yra didesnis už SR šeimos baltymų, išskirtų iš normaliomis deguonies sąlygomis augintų ląstelių, fosforilinimo lygį.

7. Padidėjusį SR šeimos baltymų fosforilinimo lygį hipoksinėse ląstelėse lemia padidėjusi specifinių SR baltymų kinazių (CLK1 ir SRPK1, SRPK2) iRNR ir baltymo raiška.

8. CLK1 kinazės padidėjusią iRNR ir baltymo raišką hipoksinėse ląstelėse lemia hipoksijos indukuojamas transkripcijos veiksnys HIF-1.

9. CLK1 kinazės raiškos sumažinimas pakeičia karboanhidrazės IX ir daug cisteino turinčio angiogenezės aktyviklio 61 alternatyvų pre-iRNR splaisingą ląstelėje: slopinamas hipoksinėmis sąlygomis susidariusių iRNR izoformų formavimasis ir skatinamas normaliomis deguonies sąlygomis besiformuojančių iRNR izoformų susidarymas.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. AITOLA, M. H. and M. T. PELTO-HUIKKO. Expression of Arnt and Arnt2 mRNA in developing murine tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2003, 51, 41-54.
2. AKERMAN, M., O. I. FREGOSO, S. DAS, C. RUSE, M. A. JENSEN, D. J. PAPPIN, M. Q. ZHANG, A. R. KRAINER. Differential connectivity of splicing activators and repressors to the human spliceosome. *Genome Biology*. 2015, 16, 119.
3. ANDO, H., A. NATSUME, K. IWAMI, F. OHKA, T. KUCHIMARU, S. KIZAKA-KONDOH, K. ITO, K. SAITO, S. SUGITA, T. HOSHINO, T. WAKABAYASHI. A hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha splicing variant, HIF-3alpha4 impairs angiogenesis in hypervascular malignant meningiomas with epigenetically silenced HIF-3alpha4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013, 433, 139-144.
4. ANDREOU, D., E. SODERMAN, T. AXELSSON, G. C. SEDVALL, L. TERENIUS, I. AGARTZ, E. G. JONSSON. Polymorphisms in genes implicated in dopamine, serotonin and noradrenalin metabolism suggest association with cerebrospinal fluid monoamine metabolite concentrations in psychosis. *Behav Brain Funct*. 2014, 10, 26.
5. ANKO, M. L. Regulation of gene expression programmes by serine-arginine rich splicing factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2014, 32, 11-21.
6. ARCONDEGUY, T., E. LACAZETTE, S. MILLEVOI, H. PRATS, C. TOURIOL. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Research*. 2013, 41, 7997-8010.
7. ASOR, E. and D. BEN-SHACHAR. Platelets: A possible glance into brain biological processes in schizophrenia. *World J Psychiatry*. 2012, 2, 124-133.
8. BALCIUNIENE, J., L. EMILSSON, L. ORELAND, U. PETTERSSON, E. JAZIN. Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. *Human Genetics*. 2002, 110, 1-7.
9. BALCIUNIENE, J., A. C. SYVANEN, H. L. MCLEOD, U. PETTERSSON, E. E. JAZIN. The geographic distribution of monoamine oxidase haplotypes supports a bottleneck during the dispersion of modern humans from Africa. *Journal of Molecular Evolution*. 2001, 52, 157-163.
10. BARATHOVA, M., M. TAKACOVA, T. HOLOTNAKOVA, A. GIBADULINOVA, A. OHRADANOVA, M. ZATOVICOVA, A. HULIKOVA, J. KOPACEK, S. PARKKILA, C. T. SUPURAN, S. PASTOREKOVA, J. PASTOREK. Alternative splicing variant of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX expressed independently of hypoxia and tumour phenotype. *British Journal of Cancer*. 2008, 98, 129-136.
11. BIALECKA, M., G. KLODOWSKA-DUDA, K. HONCZARENKO, B. GAWRONSKA-SZKLARZ, G. OPALA, K. SAFRANOW, M. DROZDIK. Polymorphisms of catechol-O-methyltransferase (COMT), monoamine oxidase B (MAOB), N-acetyltransferase 2 (NAT2) and cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene in patients with early onset of Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2007, 13, 224-229.
12. BIDDLESTONE, J., D. BANDARRA, S. ROCHA. The role of hypoxia in inflammatory disease (review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2015, 35, 859-869.

13. BINDA, C., A. MATTEVI, D. E. EDMONDSON. Structural properties of human monoamine oxidases A and B. *International Review of Neurobiology*. 2011, 100, 1-11.
14. BISOGNI, V., M. F. PENGO, G. MAIOLINO, G. P. ROSSI. The sympathetic nervous system and catecholamines metabolism in obstructive sleep apnoea. *Journal of Thoracic Disease*. 2016, 8, 243-254.
15. BONUCCELLI, U., P. PICCINI, P. DEL DOTTO, G. M. PACIFICI, G. U. CORSINI, A. MURATORIO. Platelet monoamine oxidase B activity in parkinsonian patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 1990, 53, 854-855.
16. BORTOLATO, M., K. CHEN, J. C. SHIH. Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008, 60, 1527-1533.
17. BORTOLATO, M. and J. C. SHIH. Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: preclinical and clinical evidence. *International Review of Neurobiology*. 2011, 100, 13-42.
18. BUSCH, A. and K. J. HERTEL. Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012, 3, 1-12.
19. CAUDLE, W. M., J. R. RICHARDSON, M. Z. WANG, T. N. TAYLOR, T. S. GUILLOT, A. L. MCCORMACK, R. E. COLEBROOKE, D. A. DI MONTE, P. C. EMSON, G. W. MILLER. Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*. 2007, 27, 8138-8148.
20. CHEN, N. and M. E. REITH. Structure and function of the dopamine transporter. *European Journal of Pharmacology*. 2000, 405, 329-339.
21. CHEN, W. and M. J. MOORE. The spliceosome: disorder and dynamics defined. *Current Opinion in Structural Biology*. 2014, 24, 141-149.
22. CHOWDHURY, R., A. HARDY, C. J. SCHOFIELD. The human oxygen sensing machinery and its manipulation. *Chemical Society Reviews*. 2008, 37, 1308-1319.
23. CHUN, Y. S., E. CHOI, T. Y. KIM, M. S. KIM, J. W. PARK. A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1alpha gene. *Biochemical Journal*. 2002, 362, 71-79.
24. CIEPLY, B. and R. P. CARSTENS. Functional roles of alternative splicing factors in human disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2015, 6, 311-326.
25. COLOGNE, K. G., G. S. HWANG, A. J. SENAGORE. Cost of practice in a tertiary/quaternary referral center: is it sustainable? *Techniques in Coloproctology*. 2014, 18, 1035-1039.
26. COOPER, T. A., L. WAN, G. DREYFUSS. RNA and disease. *Cell*. 2009, 136, 777-793.
27. CORREIA, S. C. and P. I. MOREIRA. Hypoxia-inducible factor 1: a new hope to counteract neurodegeneration? *Journal of Neurochemistry*. 2010, 112, 1-12.
28. COSTA-MALLEN, P., Z. AFSHARINEJAD, S. N. KELADA, L. G. COSTA, G. M. FRANKLIN, P. D. SWANSON, W. T. LONGSTRETH, Jr., H. M. VIERNES, F. M. FARIN, T. SMITH-WELLER, H. CHECKOWAY. DNA sequence analysis of monoamine oxidase B gene coding and promoter regions in Parkinson's disease cases and unrelated controls. *Movement Disorders*. 2004, 19, 76-83.
29. DA SILVA, M. R., G. A. MOREIRA, R. A. GONCALVES DA SILVA, E. DE ALMEIDA ALVES BARBOSA, R. PAIS SIQUEIRA, R. R. TEIXERA, M. R. ALMEIDA,

A. SILVA JUNIOR, J. L. FIETTO, G. C. BRESSAN. Splicing Regulators and Their Roles in Cancer Biology and Therapy. *Biomed Res Int.* 2015, 2015, 150514.

30. DALES, J. P., N. BEAUFILS, M. SILVY, C. PICARD, V. PAULY, V. PRADEL, C. FORMISANO-TREZINY, P. BONNIER, S. GIUSIANO, C. CHARPIN, J. GABERT. Hypoxia inducible factor 1alpha gene (HIF-1alpha) splice variants: potential prognostic biomarkers in breast cancer. *BMC Medicine.* 2010, 8, 44.

31. DAUER, W. and S. PRZEDBORSKI. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003, 39, 889-909.

32. DE KLEIN, A., P. H. RIEGMAN, E. K. BIJLSMA, A. HELDOORN, M. MUIJTJENS, M. A. DEN BAKKER, C. J. AVEZAAT, E. C. ZWARTHOFF. A G->A transition creates a branch point sequence and activation of a cryptic exon, resulting in the hereditary disorder neurofibromatosis 2. *Human Molecular Genetics.* 1998, 7, 393-398.

33. DORSZEWSKA, J., M. PRENDECKI, A. OCZKOWSKA, A. ROZYCKA, M. LIANERI, W. KOZUBSKI. Polymorphism of the COMT, MAO, DAT, NET and 5-HTT Genes, and Biogenic Amines in Parkinson's Disease. *Current Genomics.* 2013, 14, 518-533.

34. DOUGHERTY, E. J. and R. S. POLLENZ. Analysis of Ah receptor-ARNT and Ah receptor-ARNT2 complexes in vitro and in cell culture. *Toxicological Sciences.* 2008, 103, 191-206.

35. DOUGLAS, A. G. and M. J. WOOD. RNA splicing: disease and therapy. *Brief Funct Genomics.* 2011, 10, 151-164.

36. EDMOND, V., E. MOYSAN, S. KHOCHBIN, P. MATTHIAS, C. BRAMBILLA, E. BRAMBILLA, S. GAZZERI, B. EYMIN. Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. *EMBO Journal.* 2011, 30, 510-523.

37. EDMONDSON, D. E., C. BINDA, A. MATTEVI. The FAD binding sites of human monoamine oxidases A and B. *Neurotoxicology.* 2004, 25, 63-72.

38. EDMONDSON, D. E., C. BINDA, A. MATTEVI. Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2007, 464, 269-276.

39. EDMONDSON, D. E., C. BINDA, J. WANG, A. K. UPADHYAY, A. MATTEVI. Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. *Biochemistry.* 2009, 48, 4220-4230.

40. EISENHOFER, G., I. J. KOPIN, D. S. GOLDSTEIN. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological Reviews.* 2004, 56, 331-349.

41. FAHN, S. and D. SULZER. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *NeuroRx.* 2004, 1, 139-154.

42. FAUSTINO, N. A. and T. A. COOPER. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes & Development.* 2003, 17, 419-437.

43. FEDOR, M. J. Alternative splicing minireview series: combinatorial control facilitates splicing regulation of gene expression and enhances genome diversity. *Journal of Biological Chemistry.* 2008, 283, 1209-1210.

44. FERNANDEZ, H. H. and J. J. CHEN. Monoamine oxidase-B inhibition in the treatment of Parkinson's disease. *Pharmacotherapy.* 2007, 27, 174S-185S.

45. FREDERICKS, A. M., K. J. CYGAN, B. A. BROWN, W. G. FAIRBROTHER. RNA-Binding Proteins: Splicing Factors and Disease. *Biomolecules.* 2015, 5, 893-909.

46. FU, X. D. and M. ARES, Jr. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nature Reviews: Genetics*. 2014, 15, 689-701.
47. GAWESKA, H. and P. F. FITZPATRICK. Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family. *Biomol Concepts*. 2011, 2, 365-377.
48. GEUENS, T., D. BOUHY, V. TIMMERMAN. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Human Genetics*. 2016,
49. GHOSH, G. and J. A. ADAMS. Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. *FEBS Journal*. 2011, 278, 587-597.
50. GRABOWSKI, P. J. and D. L. BLACK. Alternative RNA splicing in the nervous system. *Progress in Neurobiology*. 2001, 65, 289-308.
51. GRAVELEY, B. R. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*. 2000, 6, 1197-1211.
52. HANG, X., P. LI, Z. LI, W. QU, Y. YU, H. LI, Z. SHEN, H. ZHENG, Y. GAO, Y. WU, M. DENG, Z. SUN, C. ZHANG. Transcription and splicing regulation in human umbilical vein endothelial cells under hypoxic stress conditions by exon array. *BMC Genomics*. 2009, 10, 126.
53. HEIKKILA, M., A. PASANEN, K. I. KIVIRIKKO, J. MYLLYHARJU. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha variants in the hypoxia response. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011, 68, 3885-3901.
54. HIROTA, K. and G. L. SEMENZA. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, 338, 610-616.
55. HO, S. L., A. L. KAPADI, D. B. RAMSDEN, A. C. WILLIAMS. An allelic association study of monoamine oxidase B in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*. 1995, 37, 403-405.
56. HOWARD, J. M. and J. R. SANFORD. The RNAissance family: SR proteins as multifaceted regulators of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2015, 6, 93-110.
57. IP, J. Y., D. SCHMIDT, Q. PAN, A. K. RAMANI, A. G. FRASER, D. T. ODOM, B. J. BLENCOWE. Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome Research*. 2011, 21, 390-401.
58. IZQUIERDO, J. M., N. MAJOS, S. BONNAL, C. MARTINEZ, R. CASTELO, R. GUIGO, D. BILBAO, J. VALCARCEL. Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Molecular Cell*. 2005, 19, 475-484.
59. YAMASHITA, T., O. OHNEDA, M. NAGANO, M. IEMITSU, Y. MAKINO, H. TANAKA, T. MIYAUCHI, K. GOTO, K. OHNEDA, Y. FUJII-KURIYAMA, L. POELLINGER, M. YAMAMOTO. Abnormal heart development and lung remodeling in mice lacking the hypoxia-inducible factor-related basic helix-loop-helix PAS protein NEPAS. *Molecular and Cellular Biology*. 2008, 28, 1285-1297.
60. YOUDIM, M. B. and Y. S. BAKHLE. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *British Journal of Pharmacology*. 2006, 147 Suppl 1, S287-296.
61. JEONG, J. W., M. K. BAE, M. Y. AHN, S. H. KIM, T. K. SOHN, M. H. BAE, M. A. YOO, E. J. SONG, K. J. LEE, K. W. KIM. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 2002, 111, 709-720.

62. KAELIN, W. G., Jr. and P. J. RATCLIFFE. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell*. 2008, 30, 393-402.
63. KALUDERCIC, N., J. MIALET-PEREZ, N. PAOLOCCI, A. PARINI, F. DI LISA. Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014, 73, 34-42.
64. KANG, S. J., W. K. SCOTT, Y. J. LI, M. A. HAUSER, J. M. VAN DER WALT, K. FUJIWARA, G. M. MAYHEW, S. G. WEST, J. M. VANCE, E. R. MARTIN. Family-based case-control study of MAOA and MAOB polymorphisms in Parkinson disease. *Movement Disorders*. 2006, 21, 2175-2180.
65. KARIJOLICH, J. and Y. T. YU. Spliceosomal snRNA modifications and their function. *RNA Biology*. 2010, 7, 192-204.
66. KAUR, B., F. W. KHWAJA, E. A. SEVERSON, S. L. MATHENY, D. J. BRAT, E. G. VAN MEIR. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-Oncology*. 2005, 7, 134-153.
67. KE, Q. and M. COSTA. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular Pharmacology*. 2006, 70, 1469-1480.
68. KHAN, D. H., S. JAHAN, J. R. DAVIE. Pre-mRNA splicing: role of epigenetics and implications in disease. *Adv Biol Regul*. 2012, 52, 377-388.
69. KOH, M. Y. and G. POWIS. Passing the baton: the HIF switch. *Trends in Biochemical Sciences*. 2012, 37, 364-372.
70. KORNBLIHTT, A. R., I. E. SCHOR, M. ALLO, G. DUJARDIN, E. PETRILLO, M. J. MUNOZ. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 2013, 14, 153-165.
71. LA COGNATA, V., V. D'AGATA, F. CAVALCANTI, S. CAVALLARO. Splicing: is there an alternative contribution to Parkinson's disease? *Neurogenetics*. 2015, 16, 245-263.
72. LAHIRI, S., A. ROY, S. M. BABY, T. HOSHI, G. L. SEMENZA, N. R. PRABHAKAR. Oxygen sensing in the body. *Progress in Biophysics and Molecular biology*. 2006, 91, 249-286.
73. LAUNONEN, V. Mutations in the human LKB1/STK11 gene. *Human Mutation*. 2005, 26, 291-297.
74. LE, K. Q., B. S. PRABHAKAR, W. J. HONG, L. C. LI. Alternative splicing as a biomarker and potential target for drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2015, 36, 1212-1218.
75. LEE, Y. and D. C. RIO. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*. 2015, 84, 291-323.
76. LEE, J. W., S. H. BAE, J. W. JEONG, S. H. KIM, K. W. KIM. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Experimental and Molecular Medicine*. 2004, 36, 1-12.
77. LIM, A., N. T. KUMARA, A. L. TAN, A. H. MIRZA, R. L. CHANDRAKANTHI, M. I. PETRA, L. C. MING, G. K. SENADEERA, P. EKANAYAKE. Potential natural sensitizers extracted from the skin of *Canarium odontophyllum* fruits for dye-sensitized solar cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015, 138, 596-602.

78. LIU, S. and C. CHENG. Alternative RNA splicing and cancer. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2013, 4, 547-566.
79. LONG, J. C. and J. F. CACERES. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochemical Journal*. 2009, 417, 15-27.
80. LOPEZ-BARNEO, J., R. PARDAL, P. ORTEGA-SAENZ. Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annual Review of Physiology*. 2001, 63, 259-287.
81. MAHON, P. C., K. HIROTA, G. L. SEMENZA. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes & Development*. 2001, 15, 2675-2686.
82. MAYNARD, M. A., A. J. EVANS, T. HOSOMI, S. HARA, M. A. JEWETT, M. OHH. Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB Journal*. 2005, 19, 1396-1406.
83. MAYNARD, M. A., H. QI, J. CHUNG, E. H. LEE, Y. KONDO, S. HARA, R. C. CONAWAY, J. W. CONAWAY, M. OHH. Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278, 11032-11040.
84. MAKINO, Y., A. KANOPKA, W. J. WILSON, H. TANAKA, L. POELLINGER. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277, 32405-32408.
85. MAKINO, Y., R. UENISHI, K. OKAMOTO, T. ISOE, O. HOSONO, H. TANAKA, A. KANOPKA, L. POELLINGER, M. HANEDA, C. MORIMOTO. Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1): a negative feedback regulatory circuit in HIF-1-mediated signaling in hypoxic cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, 282, 14073-14082.
86. MANLEY, J. L. and A. R. KRAINER. A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). *Genes & Development*. 2010, 24, 1073-1074.
87. MASOUD, G. N. and W. LI. HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015, 5, 378-389.
88. MCMANUS, C. J. and B. R. GRAVELEY. RNA structure and the mechanisms of alternative splicing. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2011, 21, 373-379.
89. MEISER, J., D. WEINDL, K. HILLER. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal*. 2013, 11, 34.
90. MOEHLE, E. A., H. BRABERG, N. J. KROGAN, C. GUTHRIE. Adventures in time and space: splicing efficiency and RNA polymerase II elongation rate. *RNA Biology*. 2014, 11, 313-319.
91. MUNOZ, P., S. HUENCHUGUALA, I. PARIS, J. SEGURA-AGUILAR. Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinson's Disease*. 2012, 2012, 920953.
92. MURAKI, M., B. OHKAWARA, T. HOSOYA, H. ONOGI, J. KOIZUMI, T. KOIZUMI, K. SUMI, J. YOMODA, M. V. MURRAY, H. KIMURA, K. FURUICHI, H. SHIBUYA, A. R. KRAINER, M. SUZUKI, M. HAGIWARA. Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279, 24246-24254.
93. NAGATSU, T. Progress in monoamine oxidase (MAO) research in relation to genetic engineering. *Neurotoxicology*. 2004, 25, 11-20.

94. NAGATSU, T. and M. SAWADA. Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase B and its inhibitors to Parkinson's disease: possible implications of glial cells. *Journal of Neural Transmission Supplementum*. 2006, 53-65.
95. NARO, C. and C. SETTE. Phosphorylation-mediated regulation of alternative splicing in cancer. *International Journal of Cell Biology*. 2013, 2013, 151839.
96. NIKOLAC PERKOVIC, M., D. SVOB STRAC, G. NEDIC ERJAVEC, S. UZUN, J. PODOBNIK, O. KOZUMPLIK, S. VLATKOVIC, N. PIVAC. Monoamine oxidase and agitation in psychiatric patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2016a,
97. NIKOLAC PERKOVIC, M., D. SVOB STRAC, G. NEDIC ERJAVEC, S. UZUN, J. PODOBNIK, O. KOZUMPLIK, S. VLATKOVIC, N. PIVAC. Monoamine oxidase and agitation in psychiatric patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016b, 69, 131-146.
98. NILSEN, T. W. and B. R. GRAVELEY. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*. 2010, 463, 457-463.
99. NOWAK, D. G., J. WOOLARD, E. M. AMIN, O. KONOPATSKAYA, M. A. SALEEM, A. J. CHURCHILL, M. R. LADOMERY, S. J. HARPER, D. O. BATES. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *Journal of Cell Science*. 2008, 121, 3487-3495.
100. OLTEAN, S., M. GAMMONS, R. HULSE, M. HAMDOLLAH-ZADEH, A. MAVROU, L. DONALDSON, A. H. SALMON, S. J. HARPER, M. R. LADOMERY, D. O. BATES. SRPK1 inhibition in vivo: modulation of VEGF splicing and potential treatment for multiple diseases. *Biochemical Society Transactions*. 2012, 40, 831-835.
101. PAL, S., R. GUPTA, R. V. DAVULURI. Alternative transcription and alternative splicing in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012, 136, 283-294.
102. PALMER, B. F. and D. J. CLEGG. Oxygen sensing and metabolic homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014, 397, 51-58.
103. PASANEN, A., M. HEIKKILA, K. RAUTAVUOMA, M. HIRSILA, K. I. KIVIRIKKO, J. MYLLYHARJU. Hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α is subject to extensive alternative splicing in human tissues and cancer cells and is regulated by HIF-1 but not HIF-2. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2010, 42, 1189-1200.
104. PEDROTTI, S. and T. A. COOPER. In Brief: (mis)splicing in disease. *Journal of Pathology*. 2014, 233, 1-3.
105. PERBAL, B. Alternative splicing of CCN mRNAs it has been upon us. *J Cell Commun Signal*. 2009, 3, 153-157.
106. PRABHAKAR, N. R. and G. L. SEMENZA. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiological Reviews*. 2012, 92, 967-1003.
107. QIAN, W. and F. LIU. Regulation of alternative splicing of tau exon 10. *Neuroscience Bulletin*. 2014, 30, 367-377.
108. RAMSAY, R. R. Molecular aspects of monoamine oxidase B. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2016, 69, 81-89.
109. RANKIN, E. B. and A. J. GIACCIA. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death and Differentiation*. 2008, 15, 678-685.

110. RAPPSILBER, J., U. RYDER, A. I. LAMOND, M. MANN. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Research*. 2002, 12, 1231-1245.
111. RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *Journal of Physiology*. 2013, 591, 2027-2042.
112. RITCHIE, D. B., M. J. SCHELLENBERG, A. M. MACMILLAN. Spliceosome structure: piece by piece. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2009, 1789, 624-633.
113. ROCHA, S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007, 32, 389-397.
114. ROGOZIN, I. B., L. CARMEL, M. CSUROS, E. V. KOONIN. Origin and evolution of spliceosomal introns. *Biology Direct*. 2012, 7, 11.
115. RUAN, K., G. SONG, G. OUYANG. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009, 107, 1053-1062.
116. RUAS, J. L. and L. POELLINGER. Hypoxia-dependent activation of HIF into a transcriptional regulator. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2005, 16, 514-522.
117. SALDANHA, R., G. MOHR, M. BELFORT, A. M. LAMBOWITZ. Group I and group II introns. *FASEB Journal*. 1993, 7, 15-24.
118. SEMENZA, G. L. Perspectives on oxygen sensing. *Cell*. 1999, 98, 281-284.
119. SEMENZA, G. L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*. 2002, 8, S62-67.
120. SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews: Cancer*. 2003, 3, 721-732.
121. SEMENZA, G. L. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Seminars in Cancer Biology*. 2009a, 19, 12-16.
122. SEMENZA, G. L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)*. 2009b, 24, 97-106.
123. SEMENZA, G. L. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annual Review of Pathology*. 2014, 9, 47-71.
124. SENA, J. A., L. WANG, L. E. HEASLEY, C. J. HU. Hypoxia regulates alternative splicing of HIF and non-HIF target genes. *Molecular Cancer Research*. 2014, 12, 1233-1243.
125. SHAO, R., F. P. ZHANG, F. TIAN, P. ANDERS FRIBERG, X. WANG, H. SJOLAND, H. BILLIG. Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1alpha in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS Letters*. 2004, 569, 293-300.
126. SHARP, P. A. and C. B. BURGE. Classification of introns: U2-type or U12-type. *Cell*. 1997, 91, 875-879.
127. SHAW, M. A., N. BRUNETTI-PIERRI, L. KADASI, V. KOVACOVA, L. VAN MALDERGEM, D. DE BRASI, M. SALERNO, J. GECZ. Identification of three novel SEDL mutations, including mutation in the rare, non-canonical splice site of exon 4. *Clinical Genetics*. 2003, 64, 235-242.
128. SHEN, Y. J., W. PAN, R. XU, X. PAN, L. C. WANG, Z. WANG, F. CAO, J. W. TAN, J. S. WU, F. WU, Y. J. LIU. [Construction of combined site-directed random mutation

- libraries of recombinant human lymphotoxin]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2004, 20, 43-48.
129. SHEPARD, P. J. and K. J. HERTEL. The SR protein family. *Genome Biology*. 2009, 10, 242.
130. SHIH, J. C., K. CHEN, M. J. RIDD. Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annual Review of Neuroscience*. 1999, 22, 197-217.
131. SHIH, J. C., J. GRIMSBY, K. CHEN. The expression of human MAO-A and B genes. *Journal of Neural Transmission Supplementum*. 1990, 32, 41-47.
132. SHIH, J. C. and R. F. THOMPSON. Monoamine oxidase in neuropsychiatry and behavior. *American Journal of Human Genetics*. 1999, 65, 593-598.
133. SINGH, R. K. and T. A. COOPER. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*. 2012, 18, 472-482.
134. SINHA, R., E. ALLEMAND, Z. ZHANG, R. KARNI, M. P. MYERS, A. R. KRAINER. Arginine methylation controls the subcellular localization and functions of the oncoprotein splicing factor SF2/ASF. *Molecular and Cellular Biology*. 2010, 30, 2762-2774.
135. SREBROW, A. and A. R. KORNBLIHTT. The connection between splicing and cancer. *Journal of Cell Science*. 2006, 119, 2635-2641.
136. TAYLOR, C. T. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochemical Journal*. 2008, 409, 19-26.
137. THAPAR, R. Structural basis for regulation of RNA-binding proteins by phosphorylation. *ACS Chemical Biology*. 2015, 10, 652-666.
138. TURUNEN, J. J., E. H. NIEMELA, B. VERMA, M. J. FRILANDER. The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2013, 4, 61-76.
139. VAUGHAN, R. A. and J. D. FOSTER. Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2013, 34, 489-496.
140. WAHL, M. C., C. L. WILL, R. LUHRMANN. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 2009, 136, 701-718.
141. WANG, G. L., B. H. JIANG, E. A. RUE, G. L. SEMENZA. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995, 92, 5510-5514.
142. WANG, G. L. and G. L. SEMENZA. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, 270, 1230-1237.
143. WANG, Z. and C. B. BURGE. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*. 2008, 14, 802-813.
144. WANG, Z., M. E. ROLISH, G. YEO, V. TUNG, M. MAWSON, C. B. BURGE. Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell*. 2004, 119, 831-845.
145. WEIGAND, J. E., J. N. BOECKEL, P. GELLERT, S. DIMMELER. Hypoxia-induced alternative splicing in endothelial cells. *PLoS One*. 2012, 7, e42697.
146. WENGER, R. H. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *Journal of Experimental Biology*. 2000, 203, 1253-1263.

147. WENGER, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB Journal*. 2002, 16, 1151-1162.
148. WILL, C. L. and R. LUHRMANN. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011, 3
149. WIMALASENA, K. Vesicular monoamine transporters: structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry. *Medicinal Research Reviews*. 2011, 31, 483-519.
150. WOJTOWICZ, W. M., J. J. FLANAGAN, S. S. MILLARD, S. L. ZIPURSKY, J. C. CLEMENS. Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell*. 2004, 118, 619-633.
151. WU, S. and M. R. GREEN. Identification of a human protein that recognizes the 3' splice site during the second step of pre-mRNA splicing. *EMBO Journal*. 1997, 16, 4421-4432.
152. ZHANG, Y., T. MADL, I. BAGDIUL, T. KERN, H. S. KANG, P. ZOU, N. MAUSBACHER, S. A. SIEBER, A. KRAMER, M. SATTLER. Structure, phosphorylation and U2AF65 binding of the N-terminal domain of splicing factor 1 during 3'-splice site recognition. *Nucleic Acids Research*. 2013, 41, 1343-1354.
153. ZHANG, J. and J. L. MANLEY. Misregulation of pre-mRNA alternative splicing in cancer. *Cancer Discovery*. 2013, 3, 1228-1237.
154. ZHANG, Z., J. YAN, Y. CHANG, S. SHIDU YAN, H. SHI. Hypoxia inducible factor-1 as a target for neurodegenerative diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 2011, 18, 4335-4343.
155. ZHOU, Z. and X. D. FU. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma*. 2013, 122, 191-207.
156. ZIMNA, A. and M. KURPISZ. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int*. 2015, 2015, 549412.

PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Išspausdinti moksliniai straipsniai disertacijos tema, įtraukti į ISI Web of Science sąrašą:

1. **Eglė Jakubauskienė**, Valda Janavičiūtė, Inga Pečiulienė, Peter Söderkvist, Arvydas Kanopka. G/A polymorphism in intronic sequence affects the processing of MAO-B gene in patients with Parkinson disease. *FEBS Letters*. 2012, 586(20): 3698–3704. [IF: 3,2]

2. **Eglė Jakubauskienė**, Laurynas Vilys, Yuichi Makino, Lorenz Poellinger, Arvydas Kanopka. Cellular hypoxia changes alternative pre-mRNA splicing by regulating SR protein phosphorylation levels. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015, 290(29):18079–18089. [IF: 4,6]

Disertacijos tema atliktų tyrimų rezultatai pristatyti Lietuvos ir tarptautinėse mokslinėse konferencijose:

1. **Eglė Jakubauskienė**, Arvydas Kanopka. Dimorfizmo, monoaminooksidazės B gene, siejamame su Parkinsono liga, įtaka pre-iRNR splaisingui. *Mokslas – sveikatai*, LSMU, Kaunas, Lietuva, 2012. Žodinis pranešimas. Pranešimas pripažintas geriausiu sekcijoje ir laimėtas „*Thermo Fisher Scientific*“ firmos įsteigtas prizas.

2. **Eglė Jakubauskienė**, Laurynas Vilys, Yuichi Makino, Lorenz Poellinger, Arvydas Kanopka. SR proteins regulate from cellular environment dependent splicing. *Dealing with hypoxia: Regulatory aspects in cells, tissues and organisms*, Oulu, Suomija, 2013. Stendinis pranešimas.

3. **Eglė Jakubauskienė**, Laurynas Vilys, Yuichi Makino, Lorenz Poellinger, Arvydas Kanopka. SR proteins regulate from cellular environment dependent splicing. *The 18TH Annual Meeting of the RNA society*, Davosas, Šveicarija, 2013. Stendinis pranešimas.

4. **Eglė Jakubauskienė**, Stasė Butkytė, Auksė Ščerbakovaitė, Giedrius Vilkaitis, Arvydas Kanopka. The expression of splicing factors in digestive system tumours and cell lines. *FEBS-EMBO*, Paryžius, Prancūzija, 2014. Stendinis pranešimas.

5. **Eglė Jakubauskienė**, Laurynas Vilys, Yuichi Makino, Lorenz Poellinger, Arvydas Kanopka. HIF-1 is indirectly involved in hypoxia dependent splicing regulation. *VitaScientia*, Vilnius, Lietuva, 2016. Stendinis pranešimas.

PADĖKA

Dėkoju moksliniam konsultantui ir kartu vadovui dr. A. Kanopkai už pasitikėjimą ir suteiktą galimybę vykdyti mokslinius tyrimus, už pagalbą ir vertingus patarimus atliekant eksperimentus ir rengiant disertaciją, partneriui a. a. prof. L. Poellingeriui – už suteiktas daugkartines stažuotes Karolinskos institute (Švedijoje).

Taip pat esu dėkinga VU Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriaus bendradarbiams už draugišką darbo aplinką, I. Pečiulienei – už visapusiškus pokalbius ir moralinį palaikymą, L. Viliui – už atliktus chromatino imunoprecipitacijos ir realaus laiko PGR tyrimus, E. Čipliui – už pagalbą atliekant dviejų dimensijų baltymų elektroforezės analizę.

Ypač dėkoju savo tėveliams už nuolatinį skatinimą tobulėti, seseriai – už supratimą ir palaikymą. Ačiū vyrui, sūnui ir draugams už tai, kad yra šalia.

Finansinė parama darbams vykdyti buvo gauta iš ES 7-osios BP programos projekto „Hipoksinės aplinkos įtaka metastatinių vėžinių auglių vystymuisi“ (angl. „*Metastatic tumours facilitated by hypoxic tumour micro-environments*“) (2009–2014 m.) ir nacionalinės mokslo programos „Lėtinės neinfekcinės ligos“ tyrimo „Mutacijos monoaminooksidazės B gene, siejamame su Parkinsono liga, įtaka pre-iRNR splaisingui“ (2010–2011 m.).