

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Kristine Kreitsman

**CGGBP1 seondumissaidid inimese genoomis ja mõju
rakutsüklile**

Magistritöö

Juhendaja prof. Ants Kurg, Ph.D

TARTU 2014

SISUKORD

LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Inimese <i>CGGBP1</i> kromosomaalne lokalisatsioon ning struktuur	6
1.2 Rakutsükkel	7
1.2.1 Rakutsükli regulatsioon	8
1.2.2 <i>CGGBP1</i> lokalisatsioon rakus erinevates rakutsükli faasides	10
1.2.3 <i>CGGBP1</i> roll telomeeride kaitses	11
1.3 <i>CGGBP1</i> roll erinevate haiguste korral.....	11
1.3.1 <i>CGGBP1</i> seos fragiilse X-i sündroomiga.....	11
1.3.2 <i>CGGBP1</i> roll vähi korral	14
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	16
2.1 Eesmärgid	16
2.2 Materjal ja meetodika.....	16
2.2.1 Rakuliinid.....	16
2.2.2 Rakkude transfekterimine siRNA-ga.....	16
2.2.3 RNA eraldamine.....	17
2.2.4 Nukleaasi töötlus	17
2.2.5 cDNA süntees.....	17
2.2.6 PCR cDNA kontrolliks	18
2.2.7 Geelelektroforees.....	18
2.2.8 Kasutatud praimerid	18
2.2.9 Kvantitatiivne reaal-aja PCR (qPCR).....	19
2.2.10 Western blot	19
2.2.11 Rakkude blokeerimine erinevates rakutsükli faasides.....	20
2.2.12 Rakutsüklianalüüs ja läbivoolutsütomeetria	20
2.2.13 Kromatiini immuunosadestamine (ChIP)	21

2.3. Tulemused.....	24
2.3.1 CGGBP1 seondumissaidid.....	24
2.3.2 CGGBP1 ekspressiooni alla reguleerimine	27
2.3.3 CGGBP1 mõju rakutsükli geenide ekspressioonile	28
2.3.4 CGGBP1 seondumine erinevates rakutsükli faasides	29
2.3.5 CGGBP1 üleekspressioon T-REx rakuliinides	30
2.3.6 CGGBP1 seondumine geenidele CGGBP1 üleekspressiooni korral.....	31
2.4 Arutelu	33
KOKKUVÕTE	35
<i>SUMMARY</i>	36
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	37
LISAD	40
LISA 1. Kasutatud praimerid.....	40
Lisa 2. FACS pildid rakutsükli arestis	41
LIHTLITSENTS	43

LÜHENDID

AURKB – *Aurora Kinase B*

Cdk – tsükliin-sõltuv kinaas (*Cyclin-dependent kinase*)

CDKN1A – *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*

CGGBP1 – *CGG triplet repeat binding protein 1*

ChIP – kromatiini immuunosadestamine (*chromatin immunoprecipitation*)

EDTA – etüleen-diamiin-tetra atsetaat

EGTA - etüleenglükooltetraetaanhape

FMR1 – *fragil X mental retardation 1*

GAS1 – *growth arrest-specific 1*

HEK293 – inimese embrüonaalsed neerurakud (*Human Embryonal Kidney*)

HMGN1 – *high mobility group nucleosome binding domain 1*

NFIX – *nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)*

POT1 – *protection of telomeres 1*

siRNA – lühike interferentsi RNA (*short/small interfering RNA*)

Tet – tetratsükliin

UTR – mittetransleeriv ala (*untranslated region*)

SISSEJUHATUS

CGGBP1 on kõrgelt konserveerunud 167 aminohappesest koosnev valk, mille täpne struktuur ja funktsioon tänaseni teadmata. Seni on leitud, et CGGBP1 seondub 5'-(CGG)_n-3' kordusjärjestustele ning esmalt avastati CGGBP1 seandumine *FMR1* geeni promootoralale. Nimetatud valgul on leitud võime reguleerida *FMR1* promootori aktiivsust pannes aluse hüpoteesile, et ta võiks osaleda fragiilse X-i sündroomi kujunemisel, mis on kõige sagedasem X-liitelise intellektipuude põhjus. Samuti on tuvastatud CGGBP1 roll rakutsükli ning abtsissioonis, vähirakkudes G0/G1 rakutsükli blokeerimises ning hiljuti avastati antud valgu tähtsus telomeere kaitsva signaalina. Ometi on CGGBP1 täpsete funktsioonide kohta võrdlemisi vähe informatsiooni ning antud valgu toimemehhanismid on veel suuresti teadmata. On leitud, et CGGBP1 võib seonduda nii 5'-(CGG)_n-3' rikastele aladele kui ka CGG kordusjärjestusest sõltumata. Kuna CGGBP1-l on leitud võime reguleerida *FMR1* promootori aktiivsust, võib nimetatud valgu näol tegemist olla transkriptsioonifaktoriga, mis reguleerib inimeste vaimse võimekuse kujunemist.

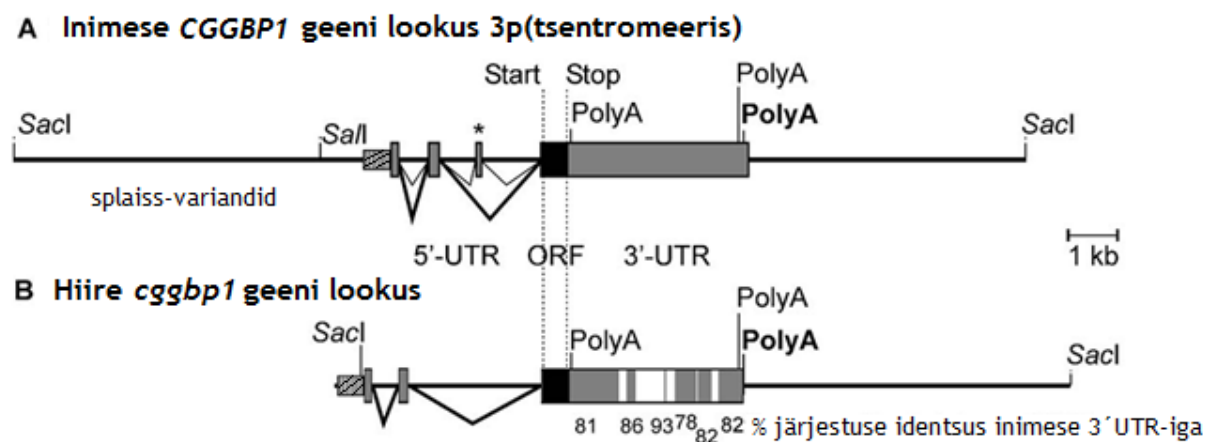
Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli anda kirjandusel põhinev ülevaade CGGBP1 lokalisatsioonist rakus ja seni teadaolevatest rollidest rakutsükli ning erinevate haiguste korral. Eksperimentaalse osa eesmärgiks oli võrrelda inimese genoomis *in silico* ja ChIP-seq andmete põhjal tuvastatud CGGBP1 seandumissaite. Samuti uurida CGGBP1 mõju rakutsükliga seotud geenide ekspressioonile CGGBP1 *knock down*'i korral ja muutusi CGGBP1 seandumises CGG alasid sisaldavate geenide promootoraladele erinevates rakutsüklifaasides.

Märksõnad: CGGBP1, rakutsükkel, Fragiilse X-i sündroom.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Inimese *CGGBP1* kromosomaalne lokalisatsioon ning struktuur

Fluorestsents *in situ* hübridisatsiooni meetodi abil on tuvastatud, et *CGGBP1* geen asub inimesel 3. kromosoomi lühikeses õlas, tsentromeeri läheduses. *CGGBP1* nukleotiidne järjestus koosneb 19839 aluspaarist. Antud geeni nii transleeritavate kui mittetransleeritavate alade nukleotiidne järjestus on kõrgelt konserveerunud inimese ja hiire vahel. Mõlemal liigil on *CGGBP1* avatud lugemisraamid intronite vabad ning enamik nukleotiidseid muutusi hiire *cggbp1* kodeerivas alas on vaikivad mutatsioonid. 167 aminohappesit erinevad hiire valgusjärjestuses vaid 3 võrreldes inimese järjestusega. Lisaks hiirele on kõrge konserveerumus tuvastatud ka lehmas, rotis ja sea aminohappelise järjestusega. Inimese *CGGBP1* geenis olev umbes 450 aluspaari pikkune 5'UTR (*untranslated region*, mittetransleeriv ala) sisaldab kolme eksonit. Kusjuures kolmas ekson on alternatiivselt splaissitud (joonis 1). (Naumann et al., 2004)



Joonis 1. Inimese ja hiire *CGGBP1* geeni struktuur. Avatud lugemisraamid (ORF) on märgitud mustalt ning on mõlemal geenil intronivabad. Eksonid on märgitud suurte kastidena. Tärniga on tähistatud alternatiivselt splaissitud ekson inimese geenil. Hall ala viitab vähemalt 78% järjestuse identsusele transleerimata alades inimese ja hiire järjestuses. Ekspressiooni analüüsid ja järjestuse võrdlus paljude EST kloonidega viitab kolme alternatiivse poliadenülatiooni signaali kasutusele (PolyA). Viirutatud ala piiritleb promotori regioone. (Naumann et al., 2004 järgi)

Inimese 5'UTR-is on leitud viis potentsiaalset startkoodonit. Ükski täiendav startkoodon ei vastanud aga rahuldavalt Kozak'i reeglile. Kui translatsioon algab ühel täiendavatest

startkoodonitest, siis ei toimunud translatsiooni ega splaissingut *CGGBP1* ORF raamis. Oletatavatele ORF-idele järgnesid kas stoppkoodonid, mis andsid 3-25 aminohappelise peptiidi või olid väljaspool raami koos *CGGBP1* initsiatsiooni koodoniga. (Naumann et al., 2004)

CGGBP1 geeni promootorala alguses olev 5'-(CGG)₅-3' kordus on konserveerunud ning veidi laienenud hiire ja roti järjestuses. Naumann ja kolleegid uurisid promootori metülatiooni taset inimese rakkudes. Leiti, et *CGGBP1* promootoril ja I eksonil olid täielikult metüleerimata 101 CpG dinukleotiidi 141-st. Lisaks uuriti *CGGBP1* ekspressiooni taset inimese erinevates kudedes. Ilmnes, et *CGGBP1* tase oli kõrge täiskasvanud organismi skeletilihastes, tüümuses ja pankreases. Tuvastati kaks erinevat mRNA-d, mis on arvatavasti alternatiivselt poliadenüleeritud. Leitud 4,5-kb mRNA tase oli kõrgem väikeajus ning 1,2-kb mRNA testises ja platsentas. Ajus oli üldiselt 1,2-kb mRNA tase madal. Pankreases, südames, skeletilihastes ja neerupealise säsis olid mõlemad mRNA-d tugevalt transkribeeritud. Inimese loote mRNA analüüsil selgus, et *CGGBP1* transkriptsioon oli kõrge ajus ja neerus ning madalam maksas ja kopsus. (Naumann et al., 2004)

On alust arvata, *CGGBP1* geeni transkriptsionaalne aktiivsus mängib olulist rolli transkriptsiooni reguleerimisel. *CGGBP1* seondub ka lühikestele ja katkestatud kordustele, seega on võimalik, et ka teised geenid, mis on seotud 5'-(CGG)-3' kordusega on mõjutatud *CGGBP1* poolt. *CGGBP1* efekt promootori aktiivsusele võib olla moduleeritud 5'-(CGG)-3' korduse pikkuse poolt. On näidatud, et kompleks, mis moodustub *CGGBP1* ja 5'-(CGG)₅-3' vahel on märgatavalt nõrgem kui kompleksis 5'-(CGG)₁₂-3'-ga. (Naumann, 2004)

1.2 Rakutsükkel

Rakutsükli põhiline ülesanne on DNA kahekordistamine kromosoomides ning kahe geneetiliselt identse tütaraku tekke tagamine. Rakutsükli võib jagada nelja faasi: M, G1, S ja G2. Geneetilise materjali duplitseerumine toimub S ehk DNA sünteesi faasis. Pärast S faasi leiab aset kromosoomide segregatsioon ja raku jagunemine M ehk mitoosi faasis. Mitoosi käigus jaotuvad kromosoomid tütarakkude tuumadesse, moodustades kaks võrdset identse kromosoomistikuga rakutuuma (Schafer, 1998). Mitoosile järgneb tsütokinees, kus toimub raku jagunemine kaheks, lõpetades seega rakutsükli. Mitoosi võib jagada alafaasideks: profaas, prometafaas, metafafaas, anafaas ja telofaas. Profaasis toimub DNA molekulide järkjärguline lahti harutamine ning kondenseerumine tütarchromatiidideks. Prometafaasis toimub tuumaümbrise lagunemine ning kromosoomide kinnitumine kinetohooride kaudu kääviniidile. Metafaasis joonduvad kromosoomid ekvaatorile ning käävi mikrotuubulid seovad

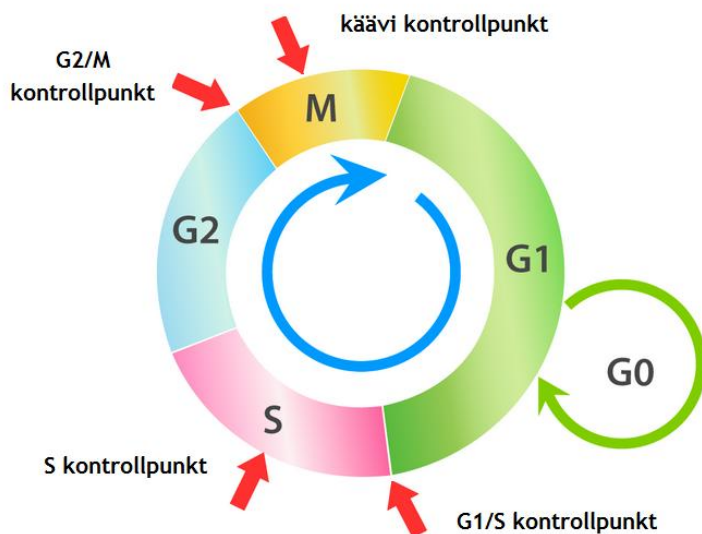
tütarkromatiidid vastaspoolustega. Anafaasis eralduvad tütarkromatiidid üksteisest pooluste suunas, kinetohoori mikrotuubulid lühenevad ning poolused liiguvad vastassuundades. Järgneb telofaas, kus tütarkromatiidid jõuavad poolustele, decondenseeruvad ning nende ümber moodustub 2 eraldi tuumaümbrist. Seejärel toimub tsütokinees, mille tagajärjel rakk jaguneb kaheks identseks tütarraakuks. (Alberts et al., 2008)

Laimalt võib rakutsükli veel jagada kaheks osaks: mitoosiks ja interfaasiks. Nagu ülal mainitud, toimub mitoosi ajal tütarkromosoomide lahkumine ning sellele järgneb raku jagunemine ehk tsütokinees. Enamuse ajast on rakud aga interfaasis, mille vältel on kromosoomid decondenseerunud ning tuumas laiali jaotunud nii, et tuum näib morfoloogiliselt ühlasena. Molekulaarsel tasemel on interfaas aeg, mille jooksul leiavad aset raku kasvamine ja DNA replikatsioon, et raku ette valmistada jagunemiseks. Interfaasi võib jagada kolmeks faasiks: G1, S ja G2. G1 (*gap1*) faas vastab mitoosi ja DNA replikatsiooni initsiatsiooni vahelisele ajale. Selles faasis on rakud metaboolselt aktiivsed ja jätkavad kasvamist, kuid ei toimu DNA replitseerumist. G1-le järgneb S faas. DNA sünteesi lõpule järgneb omakorda G2 (*gap2*) faas, mille jooksul jätkub raku kasv ja sünteesitakse valgud mitoosi ettevalmistuseks. (Cooper ja Hausman, 2009)

1.2.1 Rakutsükli regulatsioon

Rakutsükkel on mõjutatud keskkonnast tulevate ekstratsellulaarsete signaalidega nagu kasvufaktorid ning mitogeenid, aga ka sisemiste signaalide poolt, mis monitoorivad ja koordineerivad rakutsükli erinevates etappides toimuvaid protsesse. (Obaya ja Sedivy, 2001) Et rakutsükli oleks kontroll erinevate protsesside toimumise üle, leidub mitmeid rakutsükli kontrollpunkte. Nende kontrollpunktide ülesandeks on peatada rakutsükkel ning tagada aeg, et kahjustatud DNA-d saaks parandatud enne rakutsükli jätkumist. (Houtgraaf et al., 2006) Rakutsükli kontrollpunktid on defineeritud faaside kaudu, kus toimub DNA kahjustuste parandamine. Imetajarakkudes leiduvad G1/S, S ja G2/M kontrollpunktid (vt joonis 2). G1/S kontrollpunkt on vajalik DNA reparatsiooni toimumiseks enne rakkude sisenemist S faasi, et vältida kahjustunud DNA replitseerimist. S faasi kontrollpunkt aktiveeritakse, kui kahjustus leiab aset S faasis või on parandamata kahjustus pääsenud läbi G1/S kontrollpunkti ning blokeerib seeläbi replikatsiooni. G2/M kontrollpunkt väldib mitoosi initsiatsiooni, kui rakud sisaldavad ebakorrektselt replitseeritud DNA-d või paardumata alasid. Rakk püsib G2 faasis seni, kuni genoom on täielikult replitseeritud ning kahjustused parandatud. (Sancar et al., 2004) Veel üheks kontrollpunktiks on käävi (*spindle assembly*) kontrollpunkt, mis leiab aset

M faasis. Antud punktis seiratakse kromosoomide joondumist mitoosikäivil, kindlustades võrdse arvu kromosoomide jagamist tütarakkude vahel. (Musacchio ja Salmon, 2007)



Joonis 2. Rakutsükli regulatsioon. Joonisel on toodud rakutsükli kontrollpunktid. G1 faasi lõpus leiab aset G1/S kontrollpunkt. Antud punktis kontrollitakse, kas rakk on piisavalt suur ning sünteesi faasiks vajalikud valgud on olemas. Kui need tingimused pole täidetud, siseneb rakk G0 faasi seniks kuni on valmis jagunema. S faasi kontrollpunktis kontrollitakse, kas DNA on korrektselt replitseeritud ning vajadusel parandatakse vead. G2/M kontrollpunktis veendutakse, et genoom on täielikult replitseeritud ning kahjustused parandatud. Mitoosi käävi kontrollpunkt leiab aset M faasis ning seal kontrollitakse, kas mitoos on täielik. Kontrollpunkti läbimisele järgneb raku jagunemine. (<http://cimg1.ck12.org/datastreams/f-d%3Ad203ba77bc1de277476fa98792a24986752ee5269586040ca4f01479%2BIMAGE%2BIMAGE.1, järgi>)

Võtmekomponentideks rakutsükli kontrollis on tsükliinsõltuvad kinaasid (Cdk-d), mis kuuluvad proteiinkinaaside perekonda. Tsükliinsõltuvate kinaaside aktiivsuse muutused viivad tsükliiniliste muutusteni intratsellulaarsete valkude fosforüülimisel, mis initsieerib või reguleerib rakutsükli peamisi sündmusi. Cdk-de kinaassne aktiivsus nõuab seondumist tsükliiniga. Igat rakutsükli faasi iseloomustab erinevat tüüpi tsükliini ekspressioon. Cdk-de aktiivsus sõltub tsükliinidest- kui Cdk ei moodusta tihedat kompleksi tsükliiniga, siis on Cdk inaktiivses vormis. (Obaya ja Sedivy, 2001)

Selgroogsetel esineb nelja klassi tsükliine, mis seonduvad Cdk-le erinevates rakutsükli faasides (tabel 1). Iga erinev tsükliin-Cdk kompleks fosforüülib erinevaid substraate valke. G1 faasis seonduvad Cdk4 ja Cdk6 D tüüpi tsükliinidega. Cdk4 ja Cdk6 kompleksid tsükliin D-ga fosforüülivad retinoblastooma (Rb) perekonna valke. Antud kompleksid on vajalikud G1 faasi üleminekuks S faasi. S faasi lõpus A tüüpi tsükliinid seonduvad Cdk1-ga. Cdk2-tsükliinA ja

Cdk1-tsükliinA komplekside puhul pole teada, kas nende rollid on mingil määral erinevad S faasi üleminekul G2 faasi. G2 faasis seondub Cdk1 A tüüpi tsükliiniga, antud interaktsioon on vajalik mitoosi käivitamiseks. Cdk1-tsükliinB mängib olulist rolli profaasis tsentrosoomide lahknemises. Nimelt Cdk-tsükliinB kompleks fosforüülib tsentrosoom-seotud mootorvalgu Eg5 (*kinesin family member 11*), mis viib tsentrosoomide lahknemiseni. E tüüpi tsükliiniga seondub Cdk2 ning moodustunud kompleks on vajalik DNA repikatsiooni initsiatsiooniks. (Malumbres ja Barbacid, 2005)

Tabel 1. Peamised tsükliinid ja Cdk-d selgroogsetel. (Sanches ja Dynlacht järgi)

Tsükliin	Cdk partner	Rakutsükli faas
Tsükliin D	Cdk4, Cdk6	G1/S
Tsükliin E	Cdk2	S
Tsükliin A	Cdk2, Cdk1	S ja M
Tsükliin B	Cdk1	G2/M

1.2.2 CGGBP1 lokalisatsioon rakus erinevates rakutsükli faasides

HeLa rakkudes, mis on oma olemuselt emakakaela vähi rakud, on CGGBP1 tuntud kui kromatiin-seotud tuuma valk. Kui vähi korral on teada, et CGGBP1 omab rolli rakkude aresti G0/G1 faasis (Singh et al., 2011), siis Singh ja Westermarck uurisid CGGBP1 ekspressiooni ka inimese eesnaha fibroblastides (1064Sk rakud). Nad näitasid, et CGGBP1 osaleb mitoosis ning selle kulminatsioonis läbi abstsissiooni. Enamuses interfaasi rakkudes esines CGGBP1 tuumas, nõrgalt nähtav ka tsütoplasmas. Mõnes rakus oli tsütoplasmaatiline CGGBP1 ekspresseeritud ka perinukleaarsetes graanulites. Tuuma värvimise katses selgus, et CGGBP1 esineb homogeenselt tuumas ilma rakk-raku heterogeensuseta. Antud tulemus viitab, et interfaasi ajal omab CGGBP1 pan-nukleaarset (üle-tuumset) ekspressiooni. Metafaasis olevate rakkude korral esines CGGBP1 kromatiinil, tugevama lokalisatsiooniga metafaasi rõnga sisemuses ja perifeerias. Anafaasis, leidis enamus CGGBP1 käävi kesktsoonis ja kromatiin-seotud CGGBP1 osakaal oli vähenenud. Telofaasis lokaliseerus CGGBP1 vahekeha (*midbody*) sarnastes struktuurides, samas kui kromatiin-seotud CGGBP1 tase oli kõrgem kui anafaasis. Kuna selline ekspressiooni muster on teada ka vahekeha markeril AURKB (*Aurora Kinase B*), siis tehti üheagne värvimine CGGBP1 ja AURKB jaoks. Leiti märkimisväärne kattuvus nende kahe valgu ekspressiooni vahel. Interfaasi tuumades oli samuti AURKB nukleaarne ning vähesel määral nähti värvumist ka tsütoplasmas. Perinukleaarsetes graanulites CGGBP1 ja AURKB ekspressioonid ei kattunud. Samas

metafaasist kuni telofaasini näitasid need kaks valku märkimisväärselt sarnast ekspressiooni mustrit, kaasa arvatud vahekehas. AURKB ja CGGBP1 sarnane ruumiline ja ajaline ekspressioonimuster viitab, et need kaks valku võivad koopereeruda abstsissiooni kontrollpunkti läbiviimisel. Lähtuvalt pan-nukleaarsest CGGBP1 ekspressioonist, võib arvata, et kuigi CGGBP1 seondub CGG rikastele aladele, on CGGBP1 kormatiinile seotud ka sõltumatult CGG korduste olemasolust. Pole tõenäoline, et selline laiaulatuslik seondumine toimub vaid läbi otsese DNA seondumise, võib arvata, et CGGBP1 esineb ka suurtes nukleo-proteiinkompleksides. (Singh ja Westermarck, 2011)

1.2.3 CGGBP1 roll telomeeride kaitses

Nagu eelnevast ilmneb, on CGGBP1 kirjeldatud kui transkriptsiooni regulaator ning on näidatud CGGBP1 võimet seonduda nii lühikestele CGG järjestustele ja ka CGG kordusteta regioonidele. Lisaks on näidatud CGGBP1 lokalisatsiooni mitoosikäavis ja vahekehas ning tõestatud tema vajalikkus abstsissiooniks normaalsetes fibroblastides. Need leiud viitavad CGGBP1 laialdastele funktsioonidele. Kuna on teada, et telomeerid sisaldavad CGG kordusjärjestusi, siis otsustasid Singh ning kolleegid uurida, kas CGGBP1 mängib rolli ka telomeeride funktsioonis normaalsetes fibroblastides. Nad leidsid, et inimese fibroblasti rakkudes on telomeeride otsad kaitstud CGG tripletile seonduva valgu CGGBP1 fosforüülimisega 164 positsioonis oleva seriini kaudu. Näidati, et seriin 164 on peamine tähtsa funktsiooniga fosforüülimise sait CGGBP1-l. Samas, vastava fosforüülimisdefektse S164 CGGBP1 mutantse valgu üleekspressioon põhjustas telomeeride talitlushäire, kiirendas telomeeride lühenemist ja võimendas telomeeride fusiooni. Saadud tulemused viitavad, et CGGBP1 fosforüülimine positsioonis S164 on telomeeri kaitsev signaal, mis võib mõjutada telomeeride otstes asuva ja telomeeri stabiliseeriva T-loop struktuuri erinevatest valkudest koosneva shelterin kompleksi telomeeri kaitse funktsiooni. Shelterin kompleksi valk POT1 (*protection of telomeres 1*) ja p-S164 ning CGGBP1 võivad seonduda telomeersele DNA-le kui kompleks, samas kui fosforüülimata S164 vähendab CGGBP1-POT1 kompleksi võimet seonduda ja kaitsta üheaheelalist telomeerset DNAd. (Singh et al., 2014)

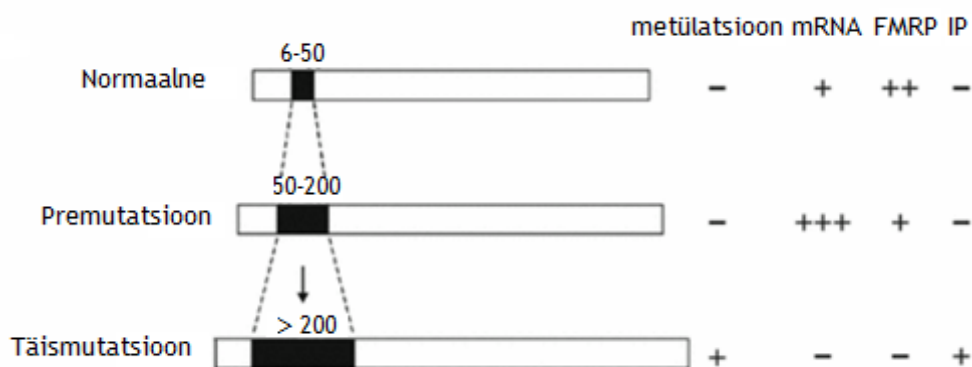
1.3 CGGBP1 roll erinevate haiguste korral

1.3.1 CGGBP1 seos fragiilse X-i sündroomiga

Fragiilse X-i sündroom on X-liiteline dominantne haigus ning on ühtlasi üheks peamiseks päriliku intellektipuude põhjuseks. Kognitiivne, käitumuslik ja füüsiline fenotüüp varieeruvad

sugude vahel, põhjustades meestel tõsisemat haiguse kulgu. Haigust põhjustav mutatsioon on trinukleotiidse CGG korduse pikenedamine *FMRI* (*fragil X mental retardation 1*) geeni 5'UTR regioonis, mis asub positsioonis Xp27.3. (Crawford et al., 2001)

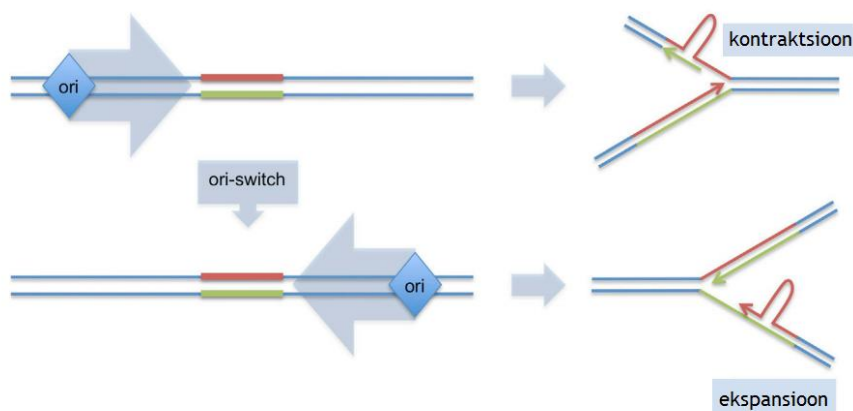
Üldiselt võib lähtuvalt CGG trinukleotiidide korduse arvust *FMRI* geeni promootoril jagada kolmeks: normaalsed, premutatsiooni ning täismutatsiooniga invidiidid. Vastavalt esineb CGG kordusi normaalsetel invidiididel alla 55, premutatsiooni korral vahemikus 55-200 ning täismutatsiooni korral üle 200 (joonis 3). (Basell ja Warren, 2008)



Joonis 3. CGG kordused *FMRI* geenis. *FMRI* geeni alleelide skeem normaalse, premutatsiooniga ning täismutatsiooniga alleelide korral. +-ga on märgitud metülatsiooni, mRNA, valgu ja intellektipuude (IP) esinemine vastavate CGG korduste korral. (Oostra ja Stoyanova, 2004 järgi)

Seni pole veel tuvastatud kindlat mehhanismi, mis seletaks CGG trinukleotiidide korduste pikenedamist. Täiskasvanud rakkudes on CGG korduste arv üsna stabiilne, varieerudes vähesel määral erinevate kudede vahel. Seega võiks arvata, et CGG trinukleotiidide arvu kasv toimub juba sugurakkudes. Kuna identsed monosügootsed kaksikud on arenenud ühest ja samast munarakust ning spermist, võiks eeldada, et nende CGG kordusjärjestused on samuti identsed. Ometi on leitud, et ka identsete kaksikute CGG kordusjärjestuste pikkuses esineb erinevusi. Uuringud monosügootsetel kaksikutel on viidanud, et CGG korduste arvu kasv leiab aset oogeneesis ja varajases embrüogeneesis. (Kruyer et al., 1994) CGG korduste arvu kasvu on püütud seletada DNA polümeraasi libisemise mehhanismiga. DNA polümeraas libiseb DNA ahelal liikudes tagasi ning replitseerib korduvalt trinukleotiide uude ahelasse juurde. Moodustuvad juuksenõela struktuurid, mis pärast DNA reparatsiooni saavad DNA ahela osaks. (Mirkin 2006)

Hiljutises artiklis on Gerhardt ning kolleegid välja toonud uue võimaliku CGG kordute arvu kasvu mudeli - *ori-switch* mudeli. Leiti, et normaalsetes indiviidides replitseeritakse (CGG)_n-sisaldavat *FMRI* lookust võrdse tõenäosusega nii vasakust kui paremast suunast (joonis 4). Sellisel juhul CGG kordused, mis asuvad lohiseval (*lagging*) ahelal läbivad kontraktsiooni samas kui paremalt replitseerides tekib kordusjärjestuse laienemine. Fragiilse X-i korral on aga *FMRI*-st vasakul asuv replikatsiooni origin inaktiveertud ning replikatsioonikahvel liigub paremalt, tekitades CGG korduste kasvu. (Gerhardt et al., 2014)



Joonis 4. Ori-switch mudel. Vasakult replitseerides tekivad kontraktsioonid. Kui replikatsioon algab paremal asuvast originist, toimub kordusjärjestuste laienemine. Fragiilse X-i sündroomi korral on *FMRI* geenist vasakul asuv origin inaktiveeritud. (Mirkin ja Mirkin, 2014 järgi)

Fragiilse X-i sündroomi sagedus üldpopulatsioonis on meestel 1:4000 ning naiste hulgas 1:8000. Fenotüübilt on antud sündroomiga patsientidele omased piklik ning kitsas näokuju, suured kõrvad, esilekerkiv lõug ning otsmik, ülipainduvad sõrmed, lampjalgsus ning meessoos esindajatel makroorhidism. Umbes kolmandikul patsientidest esineb ka autistlikke käitumismustreid, mis mõjutavad sotsiaalset suhtlemist, esineb ka krambihooge. Fragiilse X-i sündroomiga lastel on täheldatud keskendumishäireid, ärevust ning hüperaktiivsust. (<http://ghr.nlm.nih.gov/condition/fragile-x-syndrome>)

Tänaseks on hästi teada, et CGGBP1 seondub spetsiifiliselt mittemetüülitud 5'-(CGG)_n-3' kordustele *FMRI* geeni promootoril. Müller-Hartmann ning kolleegid leidsid, et CGGBP1 valk lokaliseerub tuumas ning omab tuuma lokalisatsiooni signaali aminohapete 80-84 vahel. Antud regiooni deleteerumine viib CGGBP1 ühtlase jaotumiseni üle kogu raku. Sama uurimisgrupp tegi kindlaks ka CGGBP1 ala (amniohapped 95-167), mis vastutab 5'-(CGG)_n-

3'-le seondumise eest. Kui CGGBP1 on üleekspressioonunud ning seondub *FMR1* promootoril olevatele CGG kordusjärjestusele, siis vähendab antud interaktsioon promootori aktiivsust, eriti olukorras, kus kordusjärjestuste arv on tõusnud. Samuti tehti kindlaks, et CGGBP1 on võimeline seonduma eelistatult inimese kromosoomide 13, 14, 15, 21, 22 lühikese öla telomeeridega. Nendel telomeeridel on 28S rRNA geenid, mis sisaldavad 5'-(CGG)_n-3' kordusi. (Müller-Hartmann et al., 2000)

1.3.2 CGGBP1 roll vähi korral

Võrreldes normaalse rakkudega, esineb vähirakkudes tihti kõrvalekaldeid rakutsükli. Singh ning kolleegid uurisid CGGBP1 rolli vähi rakuliinide (U-2987 MG) rakutsükli. Nad näitasid, et CGGBP1 ekspressioon mängib rolli rakutsükli rajas läbi mitmete mehhanismide, nagu CDKN1A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) ja GAS1 (*growth arrest-specific 1*) tasemete regulatsioon. Ilmnes, et RNA interferentsi abil saavutatud CGGBP1 ammendumine tuumori rakkudes põhjustas rakupopulatsiooni kasvu G0/G1 faasis ja vähendas rakkude arvu S-faasis. Lisaks tõstis CGGBP1 ammendumine ka rakutsükli regulaatorgeenide *CDKN1A* ja *GAS1* ekspressiooni, mis on seotud histooni H3 lüsiini 9 trimetüülatsiooni (transkriptsiooni repressiooniv histooni modifikatsioon) vähenemisega nendes promootorites. Singh ning kolleegid kontrollisid ka hüpoteesi, mille kohaselt CGGBP1 võib reguleerida ekspressiooni geenidel, mis kodeerivad G0/G1 faasis rakutsükli kontrollis osalevaid valke. (Singh et al., 2011) Üldiselt on CGGBP1 tuntud kui transkriptsiooni reguleerija, otseselt CGG kordusjärjestustele seondudes või läbi tema seondumise teiste transkriptsiooni reguleerivate valkudega nagu NFIX (*nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)*) ja HMGN1 (*high mobility group nucleosome binding domain 1*). (Naumann et al., 2004) Kõikidest Singh ja kolleegide poolt uuritud märklaudgeenidest, omas *CDKN1A* suurimat ekspressiooni kasvu. Kuigi *CDKN1A* promootor on CpG rikas, ei esine seal CGG korduseid. Ometi omab see NFI-seondumissaiti ja on reguleeritud NFI valkude kaudu. Leiti, et CGGBP1 seondub kromatiinile ja mõjutab selle profiili *CDKN1A* ja *GAS1* promootoritel. Edasi uuriti, kas *CDKN1A* tõusnud tase võib olla võtmesündmuseks CGGBP1 siRNA-indutseeritud G0/G1 arestis. Võrreldi CGGBP1 siRNA efekti HCT116 inimese soolevähi rakuliinis kas WT (*wild type*) või *CDKN1A* puudulike rakkudega. Leiti, et CGGBP1 siRNA põhjustas G0/G1 aresti rakkudes sõltumata *CDKN1A* genotüübist, viidates sellele, et *CDKN1A* ei ole vajalik CGGBP1 ammendumist induktsioonirakutsükli arestis. Sarnane katse WT või TP53 (*tumor protein p53*) puudulikes HCT116 rakkudes näitas, et isegi TP53 defitsiit üksi ei suuda päästa CGGBP1 siRNA induktsioonirakutsükli aresti. Need tulemused viitavad, et TP53 ja

CDKN1A ei ole üksikud determinandid rakutsükli reguleerimises CGGBP1 poolt. (Singh et al., 2011)

Viimasena testiti, kas GAS1 taseme *knock down* CGGBP1 ammendatud rakkudes võiks päästa CGGBP1 siRNA indutseeritud rakutsükli aresti. Võrreldes kontroll siRNAga, tekitas CGGBP1 siRNA G0/G1 aresti nii nagu varemgi, samas kui GAS1 siRNA üksi tekitas mõõduka rakkude populatsiooni suurenemise S-faasis ja alanemise G0/G1 populatsioonis. Samas, GAS1 ja CGGBP1 siRNA kombinatsioon ei suutnud päästa G0/G1 aresti. Üllatavalt nähti täiendavat suurenemist G0/G1 populatsioonis ja tugevamat reduktsiooni S ja G2/M faasis. Need tulemused viitavad, et GAS1 ei ole võtmeregulaator CGGBP1 siRNA-indutseeritud rakutsükli arestis. (Singh et al., 2011)

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli:

1. Võrrelda CGGBP1 seondumissaite inimese genoomis *in silico* ning CHIP-seq andmete põhjal.
2. Uurida CGGBP1 mõju rakutsükliga seotud geenide ekspressioonile CGGBP1 *knock down*'i korral
3. Uurida muutusi CGGBP1 seondumises CGG alasid sisaldavate geenide promotoraladele erinevates rakutsükli faasides.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Rakuliinid

Töös kasutati inimese embrüonaalse neeru rakke HEK293 ning T-REx-293 CGGBP1 üleekspresseeritud rakuliine T-REx 5 ja T-REx 7. T-REx rakuliini eripäraks on võimalus tetratsükliini (Tet) abil reguleerida genoomi sisestatud geeni ekspressiooni. Tegu on Tet-On süsteemiga ja tetratsükliini olemasolul seondub Tet tetratsükliini transaktivaatorile ning nende kompleks seejärel operonile. Selle tulemusena aktiveeritakse geeni transkriptsioon. Käesolevas töös kasutatud T-REx rakuliinid pärinevad Liisi Võsalt TÜ Tehnoloogiainstituudist. Rakke kasvatati IMDM söötmes (Iscove's Modified Dulbecco's Media, Naxo OÜ, Tartu, Eesti), millele lisati 10% veise loote seerumit FBS (Fetal Bovine Serum, Naxo OÜ, Tartu, Eesti) ning antibiootikume penitsiliin (100 U/ml) ja streptomütsiin (100 ng/ml) (Naxo OÜ, Tartu, Eesti). Rakke kasvatati temperatuuril 37 °C ning 5% CO₂ sisalduse juures MCO-19AIC inkubaatoris (Sanyo Electric Co, Jaapan).

2.2.2 Rakkude transfekterimine siRNA-ga

Transfekterimisele eelnevalt kasvatati HEK293 rakke IMDM söötmes, mis sisaldas 10% FBS ning oli antibiootikumide vaba. Rakkude transfekterimine viidi läbi 6-wellisel plaadil ning rakkude tihedus oli enne transfekterimist 30-50% konfluentsusest (ligikaudu 250000 raku). HEK293 rakkude transfekterimiseks kasutati lipofektamiini (Lipofectamine™ RNAiMAX, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Rakkude transfekterimine siRNA-ga (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) lipofektamiini RNAiMAX abil viidi läbi vastavalt

valmistajatehase instruksioonile, kasutades siRNA lõppkontsentratsiooni 10 nM welli kohta . Pärast transfekkeerimist asetati plaadid 37°C inkubaatorisse (5,0% CO₂) 72 tunniks. Kasutatud siRNA järjestused on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Kasutatud siRNA järjestused

siRNA	<i>Sense</i> (5' - 3')	<i>Antisense</i> (5' - 3')
CGGBP1 siRNA1	AAGUCAGACCAGCUACGGAGG	CCUCCGUAGCUGGUCUGACUU
CGGBP1 siRNA2	AACCGUUCUAAGACUGCUUUG	CAAAGCAGUCUUAGAACGGUU
CGGBP1 siRNA3	GGAGCGAUUUGUAGUAACA	UGUUACUACAAAUCGCUCC
CGGBP1 siRNA4	GCAAUGUGGUUCUGAAUCA	UGAUUCAGAACCACAUUGC
<i>Random</i> siRNA	CCCUGUCAGUAUUGAUAGAAA	UUUCUAUCAAUACUGACAGGG

2.2.3 RNA eraldamine

RNA eraldamiseks kasutati Tri-reagenti (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA) vastavalt valmistajatehase instruksioonile.

RNA kontsentratsiooni ja puhtuse määramiseks kasutati NanoDrop 2000 spektrofotomeetrit (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Pärast kontsentratsioonide mõõtmist säilitati RNA-d -20°C juures.

2.2.4 Nukleaasi töötlus

Turbo DNA-free Kit (Ambion). 1,5 ml tuubidesse lisati 25 µl RNA, 19 µl nukleaasi-vaba vett, 5 µl 10x Turbo RNase puhvrit ning 1 µl TURBO DNase. Lahust segati kergelt, tsentrifuugiti põhja, ning asetati 37°C termoblokki 20-30 minutiks. Seejärel lisati 5 µl resuspendeeritud *DNase inactivation reagent* (Ambion). Inkubeeriti toatemperatuuril 5 min, aeg-ajalt segades. Tsentrifugeeriti 9300 g juures 1,5 min (Eppendorf 5415R, Hamburg, Saksamaa). Supernatant, mis sisaldas RNA-d pipeteeriti uude 1,5 ml tuubi. Saadud RNA puhtust ning kontsentratsiooni hinnati NanoDropi 2000 spektrofotomeetri (Thermo Scientific) abil.

2.2.5 cDNA süntees

RNA-le komplementaarne DNA (cDNA) sünteesiti pöördtranskriptaasi reaktsiooni teel 200 ng RNA-st. Pöördtranskriptsiooni reaktsioonis kasutati oligo dT₁₈ praimerit.

cDNA süntees viidi läbi vastavalt *First Strand cDNA Synthesis kit* (Thermo Fischer Scientific, Vilnius, Leedu) instruksioonile. Pöördtranskriptsiooni tingimused olid järgmised: inkubeerimine 65°C termoblokis 5 min, millele järgnes jahutamine jääl, seejärel süntees 60 min 37 °C ning süntees juhuslike heksameersete praimerite seguga 5 min 25°C. Järgnes reaktsiooni peatamine 5 min 70°C. cDNAd kasutati kohe pärast sünteesi või säilitati –20°C juures kuni 5 päeva.

2.2.6 PCR cDNA kontrolliks

cDNA kontrolliti PCR abil. PCR lahus sisaldas 1x HotFirePol puhvrit, 1,5 mM MgCl₂, 0,3 mM dNTPd, Taq FirePol, cDNA, F+R HTRP1 (5+5 pmol) ning mQ vett.

PCR reaktsioon viidi läbi MJ Research PTC-200 Thermal Cycler (MA, USA) masinas. PCR programma on toodud alljärgnevas tabelis 3.

Tabel 3. PCR programm

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
DNA algdenaturatsioon	95°C	15 min	1
DNA denaturatsioon	95°C	30 s	40
Praimerite seandumine	58 °C	30 s	40
DNA ahela süntees	72 °C	30 s	40
lõppsüntees	72 °C 10 min	10 min	1

2.2.7 Geelelektroforees

PCR produkte kontrolliti geelelektroforeesi abil, 2,5% agarosgeelis. Geeli valmistamisel kasutati 0,5x TBE puhvrit ning agarooosi (Naxo OÜ). DNA visualiseerimiseks lisati geelile etiidumbromiidi (0,5 µg/ml). Markerina kasutati 50bp GeneRuler DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific).

2.2.8 Kasutatud praimerid

Rakutsükliga seotud geenide leidmiseks ChIP-seq andmetest kasutati *Panther classification system*-i (Mi et al., 2013). Märksõnadena kasutati *mitosis, cell cycle, cytokinesis*.

Valituks osutunud geenidele disainiti geeniekspressiooni tasemete määramiseks praimerid, kasutades NCBI Primer Blast-i ning PCR produktide elektrooniliseks kontrolliks NCBI e-PCR programmi. Praimerite disainimisel seati tingimusteks PCR product suurus: min 70bp, max 200 bp, praimerite sulamistemperatuur: min 59°C; opt 60°C; max 61°C; max T_m erinevus 2°C,

GC sisaldus 40,0-60,0%. Praimerid disainiti nii, et mõlema praimeri järjestus hõlmaks kahe eksoni piiri.

ChIP-qPCR meetodil uuritud geenide praimerid disainiti nii, et kahe praimeri vaheline amplifitseeritav ala sisaldaks CGG kordusjärjestusi. Disainitud praimerite järjestused on toodud lisas 1.

2.2.9 Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qPCR)

Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR) viidi läbi 7900 HT Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems, Singapur) masinaga kasutades 5x Hot firePol qPCR MasterMixi (Solis Biodyne, Tartu, Eesti).

qPCR reaktsioon viidi läbi 10 µl reaktsioonisegus, mis sisaldas 0,6-1 ng/ml cDNA-d, 1x qPCR mix, 0,4 µl praimerit, mQ vett. Proovid pipeteeriti 384-wellise plaadi aukudesse kolmes korduses. Erinevate geenide ekspressiooni tasemeid arvatati sõltuvuses koduhoidjageeni GAPDH-ga. qPCR reaktsiooni läbiviimisel kasutatav programm on esitatud tabelis 4. Saadud tulemusi analüüsiti võrdleva Ct meetodi abil. ChIP-qPCR-il saadud tulemusi analüüsiti Fold enrichment ning Percent input meetodiga.

Tabel 4. qPCR programm

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
polümeraasi aktivatsioon	95°C	15 min	1
denaturatsioon	95°C	15 s	40
praimerite seondumine ja elongatsioon	60°C	1 min	40
dissotsiatsiooni etapp	95°C; 60°C; 95°C	15s; 15s; 15s	1

2.2.10 Western blot

Kontrollimaks, kas siRNA reguleerib maha CGGBP1 taseme, ning kas T-REx rakuliinis pärast tetratsükliiniga töötlemist CGGBP1 tase on kõrgem, tehti Western blot analüüs. Rakkude lüüsimiseks eemaldati Petri tassidelt sööde, rakke pesti 2 korda PBS-iga. Seejärel rakud suspendeeriti PBS/3mM EDTA-s ning rakud koguti 1,5 ml tuubidesse. Rakud fuugiti põhja lauatsentrifuugis (Eppendorf 5415R) tingimustel 4°C, 1500 g, 5 minutit. Saadud sade suspendeeriti 50 µl PBS-s, millele lisati lüüsimiseks 50 µl 2x Laemmli puhvrit (4% SDS, 20% glütserool, 120mM Tris pH6,8, 0,01% broomfenoosinine).

Valgud lahutati SDS polüakrüülamiid geelelektrofooresil (*SDS-phage*), kasutades 12% polüakrüülamiidgeeli ning 1xSDS jooksupuhvrit (125 mM Tris, 960 mM glütsiin, 0,5% SDS). Valkude ülekandelt geelilt polüvinülideenfluoriid (PVDF) membraanile (Immobilon-P Millipore 0,45µm, Billerica, MA, USA) kasutati *semi-dry blotting* meetodit. Selleks niisutati *semi-dry* (24mM Tris base, 192mM glütsiin, 20% metanool) puhvris 3 filterpaberit, nendele asetati eelnevalt metanoolis niisutatud membraan, geel ning veel 3 filterpaberit. Ülekandeks voolutati 12 V juures 30 minutit (Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, CA, USA). Pärast membraani eemaldamist vooluplokist tehti blokeerimine 30 minutit loksutil blokeerimislahusega (1xTBS, 0,5% lõssipulber; 0,05% Tween 20). CGGBP1 detekteerimiseks kasutati spetsiifilist antikeha anti-CGGBP1 (C-17) (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) kontsentratsioonis 0,5 µg/ml. Antud primaarse antikehaga inkubeeriti membraani 1 tund. Järgnes pesu 3x 10 minutit Westerni pesulahusega (100mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20). Seejärel inkubeeriti membraani sekundaarse antikehaga 1 tunni vältel toatemperatuuril loksutil. Sekundaarse antikehana kasutati küüliku IgG vastast kitse antikeha (*goat anti-rabbit HRP*, lahjendus 1:1000) (Sigma-Aldrich). Inkubeerimisele järgnes 3x 10 minutit loksutil Westerni pesulahusega.

Signaali visualiseerimiseks kasutati *ECL Westernblotting detection Reagents kit*'i (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglismaa) vastavalt tootja protokollile ning membraanil olev signaal ilmutati röntgenfilmile.

2.2.11 Rakkude blokeerimine erinevates rakutsükli faasides

Rakkude blokeerimiseks erinevates rakutsükli faasides kasutati erinevaid reagente. S faasi arestiks kasutati 1 mM hüdroksüureat (Sigma-Aldrich) ning 2,5 mM tümidiini (Sigma-Aldrich) 24 tunni jooksul 10% FBS manulusel. G2/M blokiks kasutati rakkude töötlemist 10 µM RO-3306 (Sigma-Aldrich), samuti 10% FBS manulusel. G1 faasi arestiks kasutati rakkude näljutamist 24 tunni vältel seerumivaba söötmega.

Üleekspressseeritud liinide T-REx 5 ja T-REx 7 korral lisati esmalt 1µg/ml tetratsükliini. Indutseeriti 2 või 4 tundi, seejärel pesti rakke Petri tassil 1xPBS-iga, ning pandi uus sööde, millele lisati rakutsükli blokeerimise reagentid, vastavalt ülalkirjutatule.

2.2.12 Rakutsüklianalüüs ja läbivoolutsütomeetria

Rakud pesti 1xPBS-iga ning koguti 15 ml tuubi ning fikseeriti vastavalt protokollile, mis on kirjeldatud Patzke ja kolleegide poolt (Patzke et al., 2005). Pärast rakkude kogumist tuubi

teostati fuugimine 100 g 5 minutit (Sigma Laboratory 4K15C, UK). Sadestatud rakkudele lisati 1,5 ml Larseni puhvrit (6,5 mM Na₃HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,1% NP-40 pH 7,2) ning inkubeeriti lüüsimiseks 5 minutit jääl. Seejärel lisati fikseerimiseks juurde 0,5 ml 4% formaldehüüdi/PBS lahust ning inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Järgmiseks lisati 220 µl 1,25 mM glütsiini, segati kergelt ning fuugiti 3000 g 5 minutit 4°C. Supernatant eemaldati ning sade lahustati 1 ml PBS-sis ning lahus tõsteti 1,5 ml tuubi. Järgnevalt pesti sadet 1 ml 1xPBS-iga 2000 g 5 minutit 4°C. Pesu teostati 3 korda, seejärel suspendeeriti sade 200 µl PBS-is ning lisati 200 µl DAPI (Cystain DNA 1 Step, Partec GmbH, Münster, Saksamaa). Värvitud rakkude analüüsi FACS Aria I Cell Sorter (BD Biosciences, NJ, USA) aparatuuri ja FACSDiva version 6.1.3 tarkvara abil teostas Dmitri Lubenets (TÜ MRI).

2.2.13 Kromatiini immuunosadestamine (ChIP)

Petri tassidelt koguti rakud 15 ml tuubidesse, lisati 1xPBS-i 10 ml mahuni. Kovalentse sideme moodustumiseks valkude ja DNA vahel lisati 1 ml ristsidumissegu (11 % formaldehüüd, 100 mM NaCl, 0,5 mM EGTA, 50 mM Hepes pH=8,0) ning asetati 10 minutiks loksutile (MR-1 Mini Rocker Shaker, Biosan, Läti). Ristsidumise reaktsiooni lõpetamiseks lisati 1/10 mahust 125 mM glütsiini. Rakke pesti kaks korda 10 ml 1xPBS-ga ning fuugiti 100 g 5 minutit 4°C (Sigma Laboratory centrifuge 4K15C). Saadud sade võeti üles 1 ml NCP I-s (10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,25% TX-100) ning lahus tõsteti 1,5 ml tuubi ja tsentrifuugiti 2000 g 5 minutit 4°C (Eppendorf 5415R). Järgmisena võeti sade üles 1 ml NCP II (1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM Hepes pH=6,5, 200 mM NaCl) lahuses ning tsentrifuugiti samadel parameetritel. Tuumade lüüsimiseks resuspendeeriti sade 150 µl lüüsipuhvris (10 mM EDTA, 20 mM Tris pH=8,0, 0,5% NP-40, 1% SDS) ja inkubeeriti toatemperatuuril 10 minutit. Genoomse DNA fragmenteerimiseks sonikeeriti (Bioruptor UCD-200, Diagenode, Liège Belgia) rakud 15 minutit sätetel „High“. Pärast sonikeerimist lisati lahusele 150 µl IP puhvrit (2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH=8,0, 1% TX-100), segati vortexil ning tsentrifuugiti 10 minutit 1100 g 4°C juures. Tsentrifugeeritud lahusest võeti 10 µl supernatanti sonikeerimise efektiivsuse kontrolliks, sellele lisati 20 µl IP puhvrit ning säilitati 4°C juures külmikus. Ülejäänud 250 µl supernatanti tõsteti uude 1,5 ml tuubi ning lisati 1 ml IP puhvrit. Ebaspetsiifilise tausta eemaldamiseks eelpuhastati sonikeeritud ja lahustatud raku lüsaat, lisades 60 µl eelnevalt BSA-ga (1 mg/ml) blokeeritud G-valk sefarooskerasid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Järgnes 1,5 tundi rotaatoril 4°C juures. Pärast roteerimist tsentrifuugiti

proove 1 minut 100 g (Eppendorf 5415R) ning supernatandi fraktsioon koguti uutesse 1,5 ml tuubidesse. Supernatandile lisati CGGBP1 (C-17) antikeha (1:100) ning kontrollina kasutati IgG (Sigma-Aldrich) (1:1000). Proovid asetati rotaatorile 4°C juurde üleöö.

Järgmisel päeval koguti antikeha/valk kompleksid. Selleks kanti lüsaadid uutesse 1,5 ml tuubidesse, millesse oli varem lisatud võrdses koguses (100 µl) G-valk sefarooskerakeste segu ning lahused asetati tagasi roteerima kaheks tunniks 4°C juurde. Seejärel tsentrifuugiti 1 minut 2300 g juures ning 1% supernatanti säilitati input fraktsioonide jaoks. Ülejäänud supernatant eemaldati, kuna see sisaldas seondumata ning ebaspetsiifilist DNA-d. Järgnevalt teostati pesu nelja erineva puhvriga. G-valk sefaroos/antikeha/valk komplekse pesti esmalt madala soolasisaldusega kompleksipuhvriga (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH=8,1, 150 mM NaCl) kolm korda, lisades 1 ml vastavat puhvrit ning tsentrifuugides 1 minut 2300 g 4°C (Eppendorf 5415R) (samad tsentrifuugimise parameetrid kehtisid kõikide pesuetappide kohta). 1 ml kõrge soolasisalduse kompleks puhvriga (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH=8,1, 500 mM NaCl) pesti sadet 2 korda. Ühe korra pesti sadet 1 ml LiCl immuunkompleks pesupuhvriga (0,25 M LiCl, 1% NP-40, 1% *deoxycholic acid*, 1 mM EDTA, 10 mM Tris pH=8,1) ning lõpuks 2 korda 1 ml TE puhvris (10 mM Tris-HCl pH=8,0, 1 mM EDTA). Puhastatud valkkomplekside elueerimiseks kerakestelt lisati 150 µl eluatsiooni puhvrit (0,1 M NaHCO₃, 1% SDS) G-valk sefarooskerakestele. Tuubid asetati segajale keskmistel sätetel 15 minutit. Seejärel tsentrifuugiti 1 minut 2300 g juures. 125 µl supernatandi fraktsiooni tõsteti uude 1,5 ml tuubi ning korrati elueerimisprotsessi 15 minutit vortexil. Vastavad eluaadid tõsteti kokku, inputide (proov valgu totaallüsaadist enne immuunosadestamist) maht viidi eluatsioonipuhvriga 250 µl-ni. Proovid ja inputid asetati 65°C termoplokki üleöö, et eemaldada ristsidemed valgu ja DNA vahel. Sonikeerimise kontrolliks võetud proovid asetati samuti 65°C juurde ning järgneval päeval kontrolliti sonikeerimise efektiivsust 1% agarosgeelil geelelektroforeesi abil.

Kolmandal päeval võeti eluaadid ning inputid 65°C juurest, tsentrifuugiti kergelt ning alustati DNA puhastamise protokolliga. Selleks lisati proovidele ning inputidele 5 µl 5 M NaCl (lõppkontsentratsioon 0,25M) ja 2,5 mahus 96% etanooli. Tuubid asetati -20°C juurde sadenema 30 minutiks. Pärast sadestamist tõsteti proovid jääle ning tsentrifuugiti 15 min 13000 g 4°C juures. Supernatant eemaldati ning sademele lisati 180 µl TE puhvrit, 20 µl 10x Prot K puhvrit (50 mM Tris pH=8,0, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl) ning 2,5 µl 10 mg/ml prot K. Inkubeeriti 2 tundi 45°C juures. Seejärel lisati 200 µl fenool:kloroformi (1:1), segati vortexil ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 13000 g 10 minutit 4°C juures. Saadud vesifaas

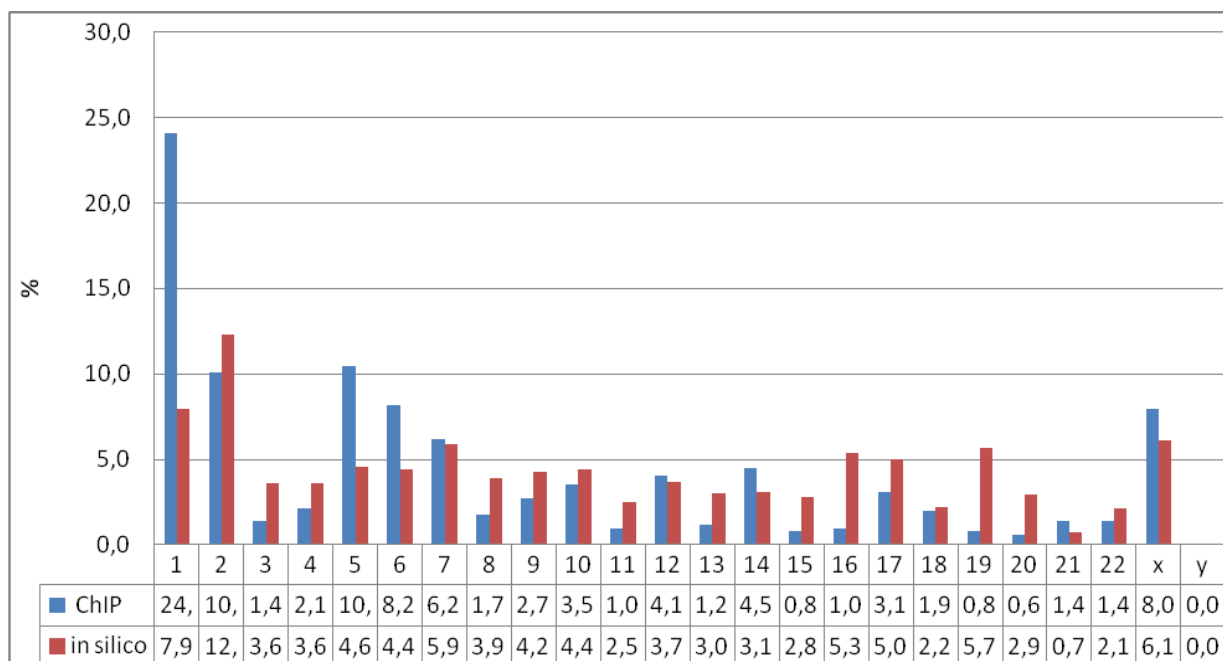
tõsteti uude 1,5 ml tuubi ning lisati NaCl lõppkontsentratsiooniga 0,25 M ning 2,5 mahus 96% etanooli. Sadestati 30 minutit -20°C juures. Pärast sadestamist hoiti proove jääl ning seejärel tsentrifugeeriti 13000 g 15 minutit 4°C . Sade kuivatati termoblokil 45°C juures ning võeti üles 50 μl -s TE puhvris, hoiti 45°C juures 15 minutit, tsentrifugeeriti maha ning säilitati -20°C juures.

2.3. Tulemused

2.3.1 CGGBP1 seondumissaidid

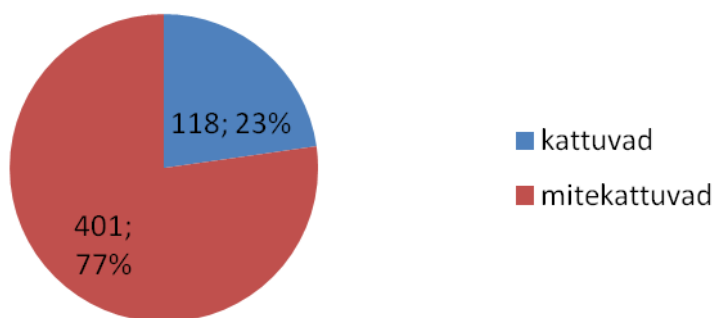
Inimese genoomis CGGBP1 valgule potentsiaalsete seondumiskohtade leidmiseks, teostati bioinformaatiline analüüs koostöös TÜ MRI Bioinformaatika õppetooli töötajatega. Analüüsi käigus tuvastati CGG rikkad alad erinevates kromosoomides, potentsiaalne seondumissait tuvastati alates viiest CGG järjestusest, milles ei esinenud ühtki katkestatud kordust. Kokku leiti 3462 potentsiaalset seondumissaiti. *In silico* andmete põhjal ei leidunud ühtegi seondumissaiti Y-kromosoomis ja enim piike tuvastati 2. kromosoomis (12,3%).

Võrdluseks bioinformaatilise analüüsi kõrvale otsiti seondumissaitide ka ChIP-seq andmete põhjal. ChIP-seq andmete analüüsi Galaxy ning MACS programmide abil teostas Liisi Võsa (TÜ Tehnoloogiainstituut). ChIP andmete põhjal leiti 519 potentsiaalset CGGBP1 seondumissaiti. Kusjuures enim piike leidis 1. kromosoomis (24%) ning sarnaselt *in silico* andmetele ei olnud Y-kromosoomis ühtki CGGBP1 seondumise ala. 10 leitud CGGBP1 seondumissaidis ei leidunud ühtki CGG/CGG trinukleotiidi. Joonisel 5 on välja toodud CGG kordusjärjestuse regioonide esinemine erinevates kromosoomides ChIP-seq ning *in silico* andmete põhjal.

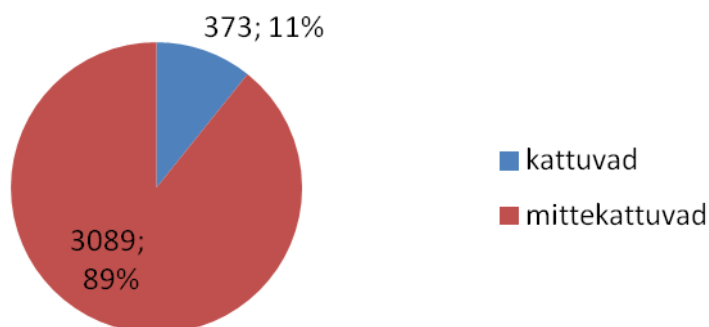


Joonis 5. CGG alade protsentuaalne esinemine erinevates kromosoomides. ChIP-seq andmed on toodud siniselt ja *in silico* andmed punaselt.

Vaadates ChIP-seq ning *in silico* andmete omavahelist kattumist, ilmnes, et 519-st 401 juhul ei kattunud ChIP-seq piigid ühegi *in silico* tuvastatud piigiga (joonis 6). ChIP-seq piikide alast välja jäi omakorda 3089 *in silico* piiki (joonis 7).

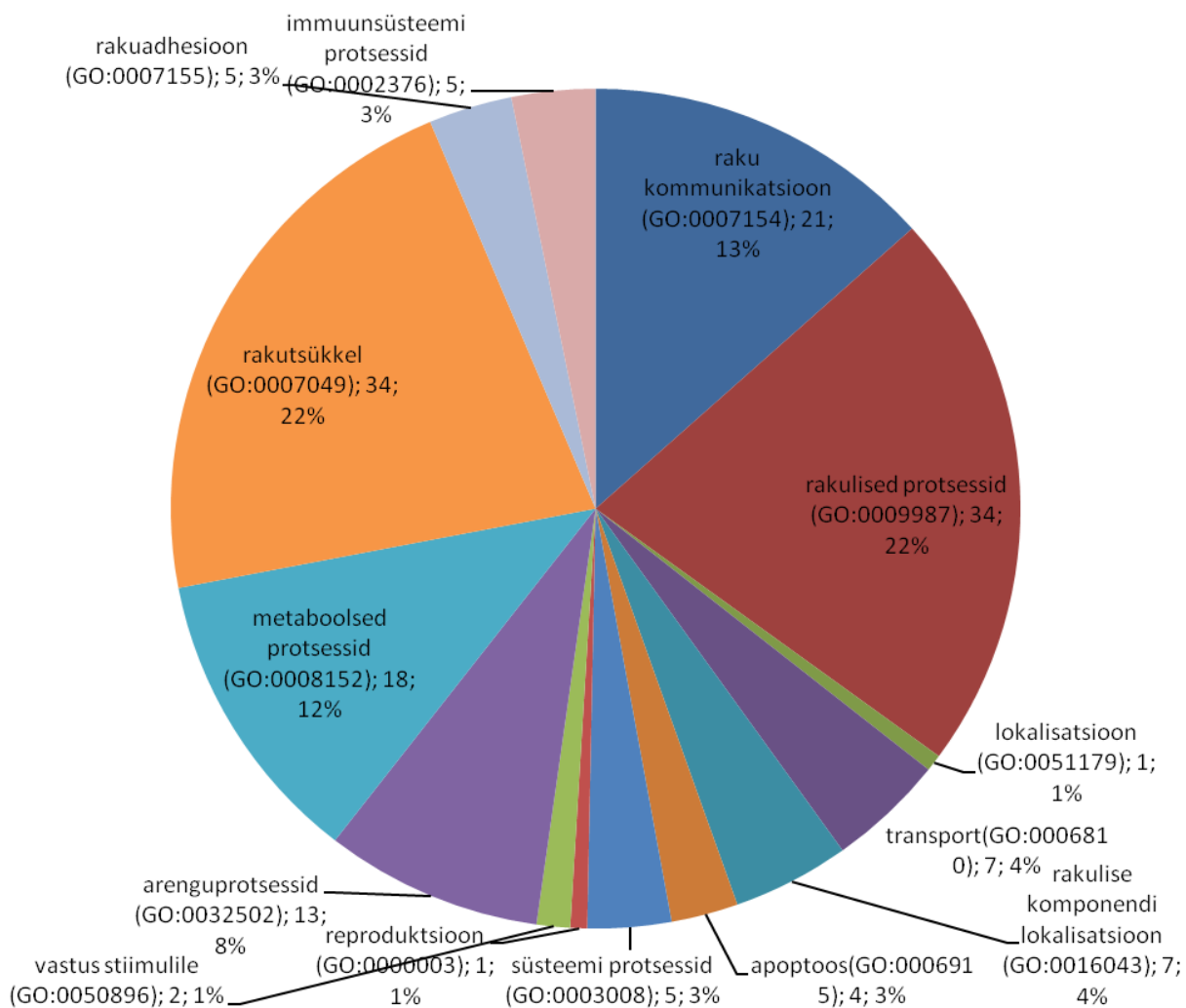


Joonis 6. ChIP-seq andmete põhjal leitud piikide kattuvus bioinformaatilise analüüsi tulemusel leitud piikidega.



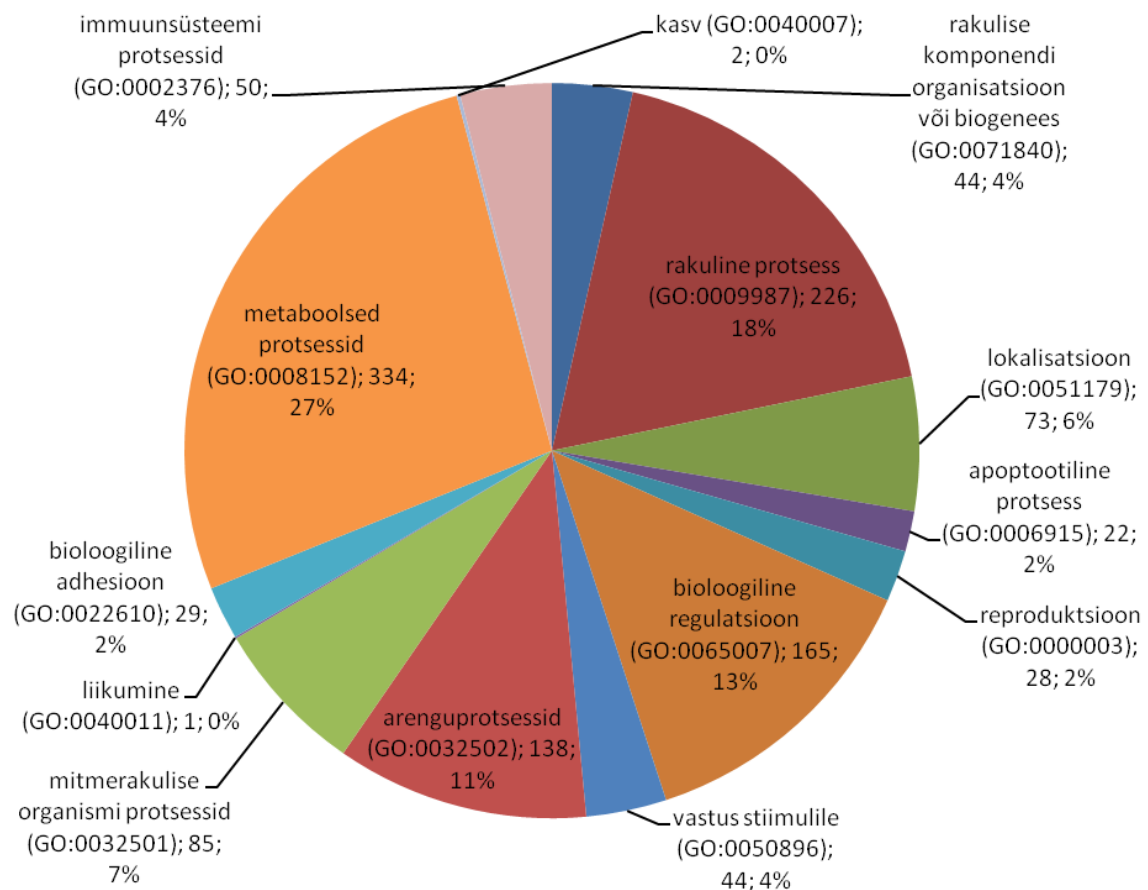
Joonis 7. Bioinformaatiliselt tuvastatud piikide kattuvus ChIP-seq abil leitud saitidega.

Et uurida, kas leitud seondumiskohtade taga esineb kindla funktsiooniga geenide ülekaal, vaadati, millistele geenidele CGGBP1 seonduda võiks. Panther programmi abil leiti, milliste bioloogiliste protsessidga on seotud CGGBP1 seondumiskohti sisaldavad geenid. Saadud tulemused on näidatud joonistel 8 ja 9.



Joonis 8. Bioloogiliste protsesside esinemine ChIP-seq andmete korral. Joonisel on toodud ChIP-seq andmetel saadud geenide, mille läheduses asusid CGGBP1 seondumissaidid, üldiste bioloogiliste funktsioonide jaotus.

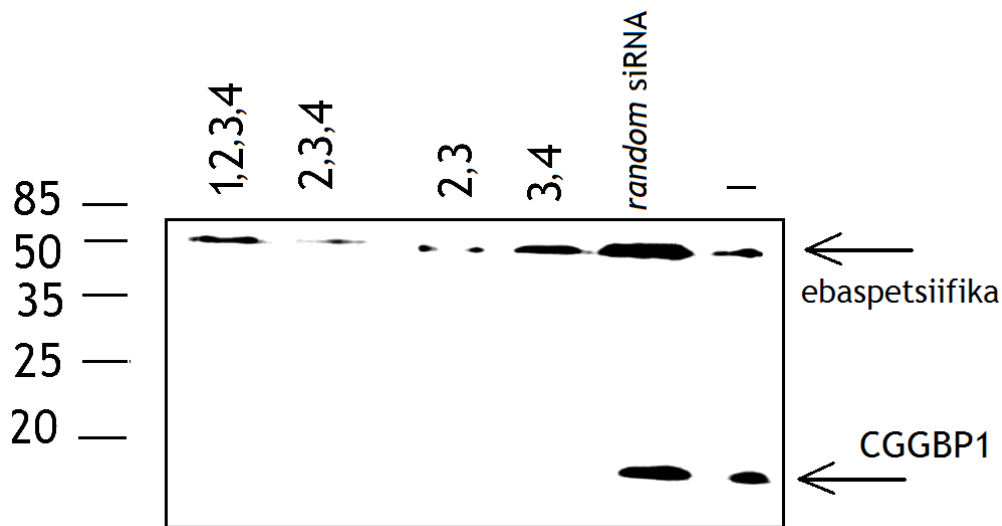
ChIP-seq andmete põhjal on suur osakaal rakutsükli geenidel (22%) ning rakulistel protsessidel (22%). *In silico* andmete põhjal tehtud analüüsi korral domineerivad metaboolsete protsessidega seotud geenid (27%) ning rakutsükliga seotud gene ei tuvastatud.



Joonis 9. *In silico* analüüsil leitud CGGBP1 seondumissaite omavate geenide osakaal erinevates bioloogilistes protsessides.

2.3.2 CGGBP1 ekspressiooni alla reguleerimine

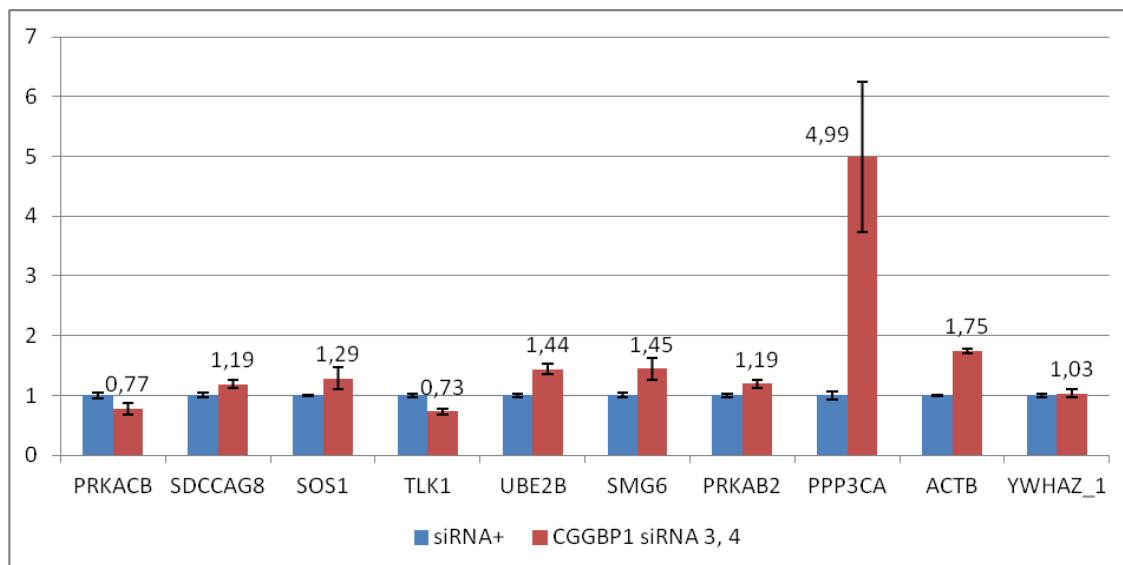
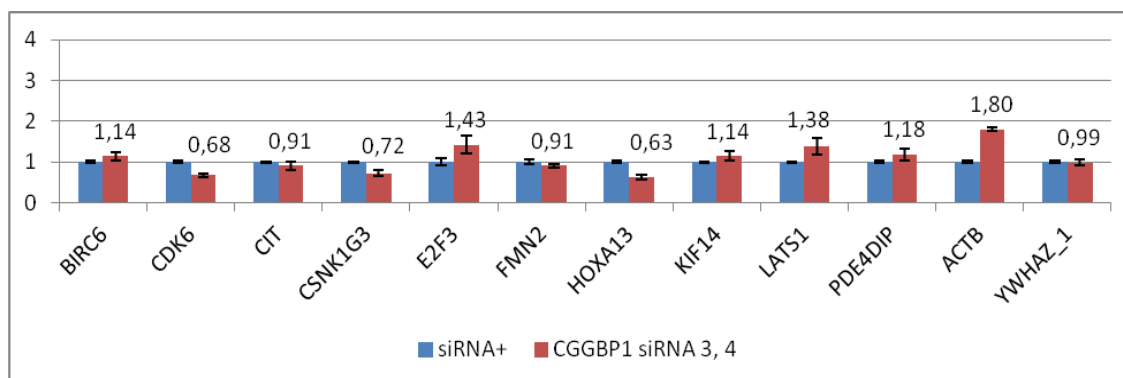
CGGBP1 ekspressiooni maha surumiseks HEK293 rakkudes kasutati RNAi meetodit. Väikesed RNA-d (siRNA-d) disainiti nii, et mRNA-le seondumise tagajärjel toimub komplementaarse mRNA lagundamine. HEK293 rakke transfekteeriti nelja erineva siRNA-ga ning 72 tunni möödudes rakud lüüsi. Järgnevalt tehti Western blot analüüs, et hinnata erinevate siRNA-de efektiivsust CGGBP1 ekspressioonile, saadud tulemused on näidatud joonisel 10. Kontrollina kasutati siRNA-ga mõjutamata ning *random* siRNA-ga töödeldud rakke. Jooniselt 10 on näha, et CGGBP1 siRNA-de kombinatsioonid 1, 2, 3 ja 4; 2, 3 ja 4; 2 ja 3 ning 3 ja 4 surusid maha CGGBP1 taseme, samas negatiivse kontrolli ja *random* siRNAga transfekteerides CGGBP1 ekspressiooni tase ei langenud. Edaspidistes katsetes kasutati CGGBP1 siRNA-de 3 ja 4 kombinatsiooni.



Joonis 10. Western blot analüüs siRNA-de efektiivsuse hindamiseks. Erinevad CGGBP1 siRNA-de 1-4 kombinatsioonid on maha surunud CGGBP1 ekspressiooni. Samas *random* siRNA-ga töötlemise ning transfekteeerimata HEK293 rakkude rajal (-) on näha CGGBP1 bänd umbes 20 kDa kõrgusel.

2.3.3 CGGBP1 mõju rakutsükli geenide ekspressioonile

CGGBP1 mõju uurimiseks rakutsükliga seotud geenidele, reguleeriti CGGBP1 ekspressioon alla siRNA-ga ning geenide ekspressiooni muutusi vaadeldi qPCR meetodi abil. HEK293 rakke kasvatati 6-wellides, kus 4 wellile lisati CGGBP1 siRNA-d 3 ja 4 72 tunniks, ühele wellile *random* siRNA ning ühes wellis olid töötlemata HEK293 rakud. Rakkudest eraldati RNA ning see konverteeriti cDNA-ks. Saadud cDNA amplifitseeriti *PRKACB*, *SDCCAG8*, *SOS1*, *TLK1*, *UBE2B*, *PRKAB2*, *SMG6*, *PPP3CA*, *BIRC6*, *CDK6*, *CIT*, *CSNK1G3*, *E2F3*, *FMN2*, *HOXA13*, *KIF14*, *LATS1*, *PDE4DIP* spetsiifiliste praimeritega qPCR abil. Antud rakutsükli geenid olid valitud ChIP-seq abil tuvastatud seondumissaitide hulgast. Referentsgeenidena kasutati *GAPDH*, *ACTB* ja *YWHAZ_1* spetsiifilisi primereid. Ühe geeni puhul 18-st on täheldatav selge ekspressiooni taseme tõus (joonis 11. A). *PPP3CA* ekspressioon on referentsgeeniga võrreldes tõusnud viis korda. Teiste geenide puhul märkimisväärseid geeniekspressiooni muutusi ei esinenud.

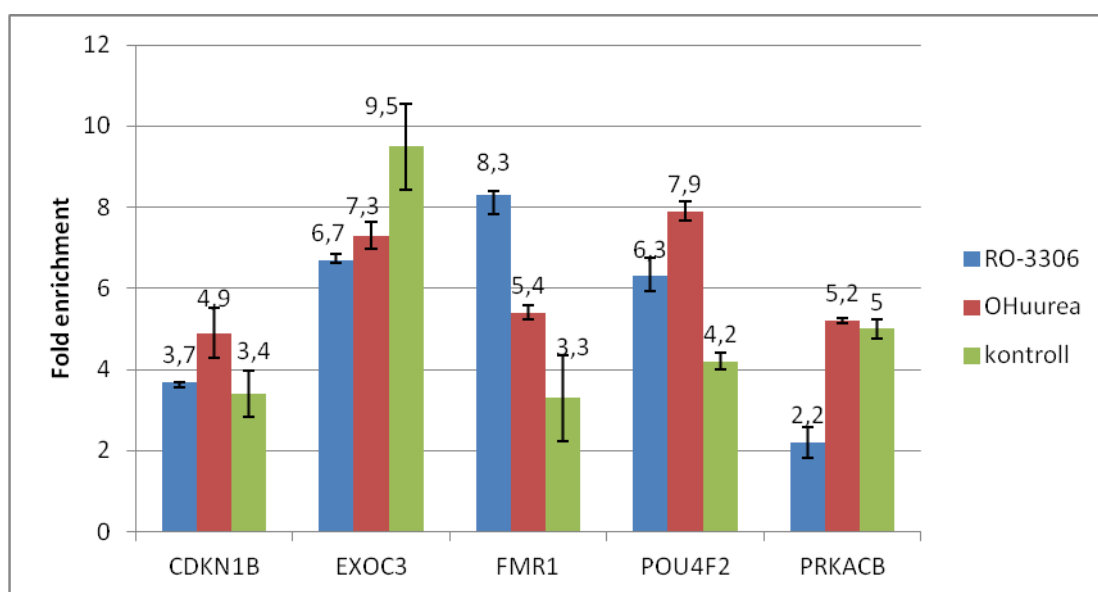
A**B**

Joonis 11. Rakutsükliga seotud geenide ekspressiooni andmete analüüs qPCR-i abil pärast siRNA töötlust. Tulemused on esitatud kahe katse keskmisena koos katsetevahelise varieeruvuse piiridega. Siniselt on *random* siRNA-ga (joonisel siRNA+), ning punaselt CGGBP1 siRNA 3 ja 4 transfekteritud rakud. Referentsgeenidena kasutati *GAPDH*, *ACTB* ja *YWHAZ_1*.

2.3.4 CGGBP1 seandumine erinevates rakutsüklifaasides

CGGBP1 on iseloomustatud kui rakutsükli mõjutavat geeni (Singh et al., 2011), seega otsustati edasi vaadata CGGBP1 seandumist geenide promootorile erinevates rakutsükli faasides. Et rikastada erinevates faasides olevate rakkude hulka, teostati rakutsükli sünkroniseerimine. Rakutsükli arestimiseks töödeldi HEK293 rakke 24 tunni vältel järgmiste reagentidega: tümidiin ning hüdroksüürea – S faas, RO-3306 – G2/M faas, seerumivaba sööde – G1 faas. Rakutsükli aresti kontrolliti FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) meetodil (rakutsükli pildid on toodud lisas 2) ning juba arestitud rakkudega tehti kromatiini

immunosadestamise analüüs, kasutades CGGBP1 (C-17) ning IgG anti keha. ChIP analüüsi käigus erinevatest rakutsükli faasides arestitud rakkudest eraldatud DNA-d kasutati qPCR-il. qPCR läbi viimisel kasutati geenide *FMRI*, *CDKN1B*, *POU4F2*, *EXOC3* ja *PRKACB* spetsiifilisi praimereid, mis olid disainitud amplifitseerima antud geenide CGG rikkaid järjestusi. Geenide valik ChIP-qPCR katseks erinevates rakutsükli faasides põhines CGG rikaste alade esinemisel. Kontrollina kasutati töötlemata HEK293 rakke. Tulemuste analüüsiks kasutati *Fold enrichment* meetodit. Joonisel 12 on näha, et *FMRI* signaal on kontrollprooviga võrreldes G2/M faasis tõusnud 2,5 korda ning *PRKACB* korral langenud 2,3 korda. Kuna antud katse on tehtud ühes korduses, oleks tulemuste kinnitamiseks vajalik läbi viia korduskatsed.

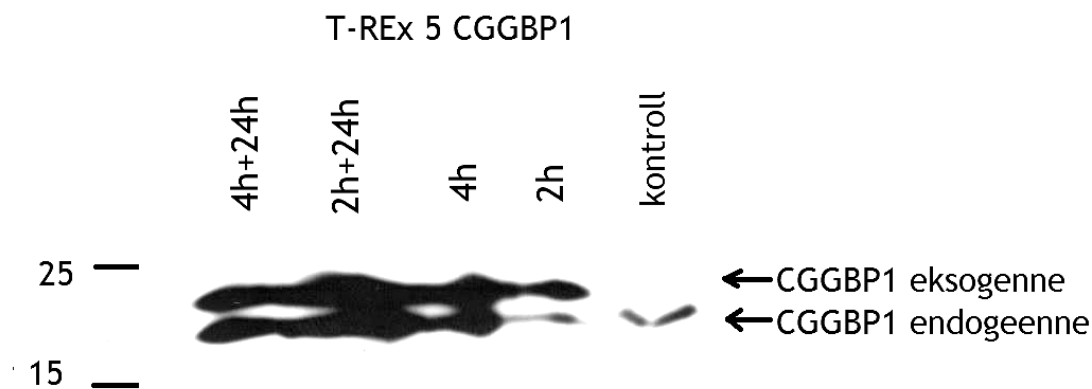


Joonis 12. ChIP-qPCR andmete analüüs. Hüdroksüureaga töödeldud rakud (punane) on rikastatud S faasis ning RO-3306 töötamise (sinine) korral G2/M faasis. Kontroll tähistab töötlemata HEK293 rakke (roheline). Signaali tõus on leitud IgG suhtes. Tulpadel on ära toodud \pm SEM väärtused.

2.3.5 CGGBP üleekspressioon T-REx rakuliinides

Kuna HEK293 rakkudes jäi ChIP signaal nõrgaks, otsustati edaspidi kasutada T-REx rakuliine, milles oli CGGBP1 üleekspressioon. Esmalt teostati Western blot, et kinnitada T-REx 5 ja 7 rakuliinides CGGBP1 ekspressiooni tõusu tetratsükliini lisamisega. Westerni jaoks võeti võrdne arv rakke iga proovi kohta, et tulemused oleksid võrreldavad erinevate ajapunktide vahel. Joonisel 13 on toodud Western bloti pilt, millel on näha CGGBP1 ekspressiooni tõusu tetratsükliini (1 μ g/ml) lisamisega T-REx 5 rakuliinis. Tetratsükliini lisati rakkudele 4 või 2 tunniks. Rakud fikseeriti kas kohe pärast tetratsükliiniga indutseerimise

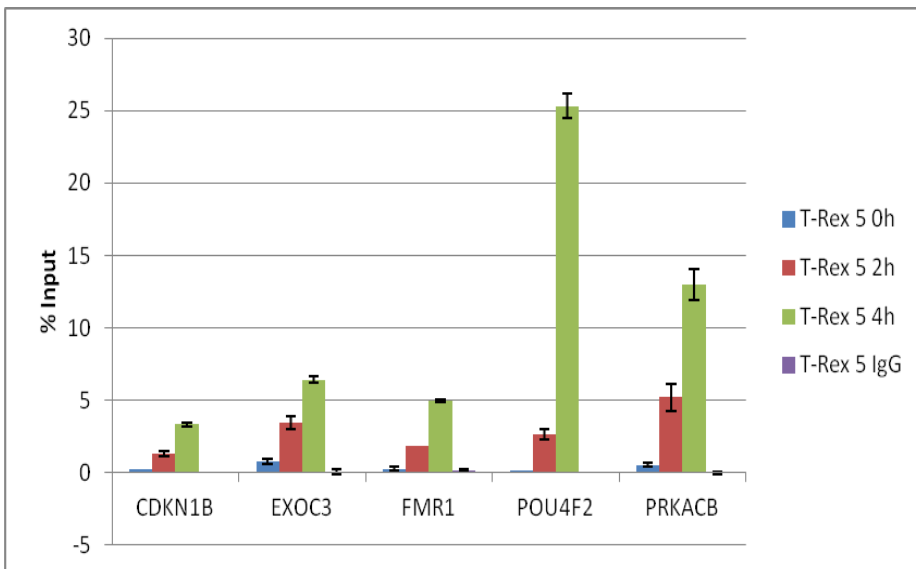
lõppu või lasti veel 24 tundi tetratsükliinivabas söötmes kasvada. Kõigi tetratsükliiniga töödeldud rakkude korral esines CGGBP1 üleekspressioon, samas kontrollproovis ekspressiooni tase ei tõusnud.



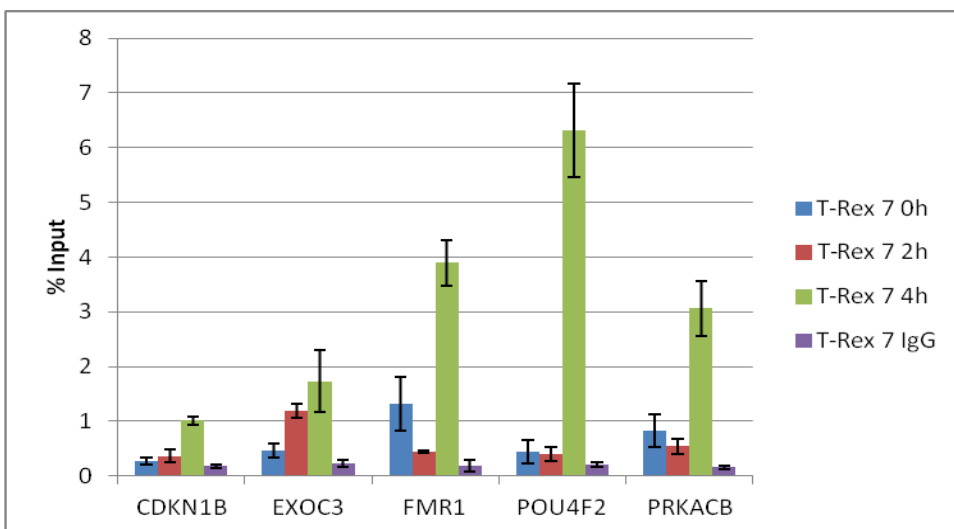
Joonis 13. Western blot T-REx 5 CGGBP1 üleekspressiooni korral. T-REx rakkudele tetratsükliini lisamine viib CGGBP1 ekspressiooni tõusuni, samas kontrollproovis (indutseerimata T-REx rakud) on CGGBP1 ekspressiooni tõus pole täheldatav.

2.3.6 CGGBP1 seondumine geenidele CGGBP1 üleekspressiooni korral

T-REx 5 ja 7 rakuliinides geeniekspressiooni uurimiseks tehti kromatiini immuunoadestamine kasutades CGGBP1 (C-17) ning kontrollina IgG antikeha. Eelnevalt indutseeriti T-REx rakuliine tetratsükliiniga 0, 2 või 4 tundi. CHIP-i tulemusel saadud DNA-d kasutati qPCR-i läbiviimiseks praimeritega *CDKN1B*, *FMRI*, *PRKACB*, *EXOC3* ning *POU4F2*. Tulemusi analüüsiti *Percent Input* meetodil (joonised 14 ja 15). Üldiselt esineb tendents, et mida kauem tetratsükliiniga indutseerida, seda kõrgem on CGGBP1 tase rakus ning vastavalt ka seondumissignaali. Kahte rakuliini võrreldes annab T-REx 5 tetratsükliiniga indutseerides tugevama CGGBP1 taseme tõusu.



Joonis 14. ChIP-qPCR andmete analüüs T-REx 5 rakuliinis. Joonisel on toodud qPCR analüüsi tulemused kromatiini immunosadestamisel saadud DNA fragmentidest *CDKN1A*, *EXOC3*, *FMR1*, *POU4F2* ja *PRKACB* geenidel. Seondumissignaal esines kõikidel geenidel.



Joonis 15. ChIP-qPCR andmete analüüs T-REx 7 rakuliinis. Joonisel on toodud qPCR analüüs ChIP tulemusel saadud DNA fragmentidest geenidel *CDKN1A*, *EXOC3*, *FMR1*, *POU4F2* ja *PRKACB*. Seondumissignaal tuvastati kõikide geenide korral.

2.4 Arutelu

In silico ja ChIP-seq andmeid võrreldes esines CGGBP1 seondumissaite *in silico* analüüsil tunduvalt rohkem. Üheks võimalikuks põhjuseks võib pidada *in silico* analüüsil seatud tingimusi. Nimelt pidi järjestikku esinema vähemalt viis CGG trinukleotiidi ilma ühegi katkestuseta. ChIP andmete põhjal aga loeti kokku üheks piigiks olukorrad, kus esinesid järjestikku CGG kordused ning nende vahel asus mõni üksik nukleotiid, mis rikkus CGG korrektse järjestuse. Seega võib üks ChIP piik sisaldada mitut bioinformaatilise lahendusega leitud potentsiaalset seondumissaiti. Kuna on näidatud, et CGGBP1 ei seonu metüülitud aladele (Naumann et al., 2004), siis võib kromatiini kokkupakkimine olla üheks põhjuseks, miks ChIP-seq analüüsil esines vähem seondumiskohti võrreldes *in silico* analüüsiga. Lisaks võivad erinevused leitud seondumissaitide vahel tuleneda asjaolust, et CGGBP1 seondub ka aladele, mis ei sisalda CGG trinukleotiide vaid lihtsalt CG rikkaid järjestusi (Singh et al., 2011). ChIP-seq andmete hulgas esines CGG trinukleotiide mittesisaldavaid regioone, kuhu CGGBP1 seonduda võiks, samas *in silico* analüüsis antud alasid ei tuvastanud. Need asjaolud seletavad osaliselt kahe katse tulemuste erinevusi ning väikest omavahelist kattuvust.

Erinevate meetoditega leitud seondumissaitide vähene kattuvus annab mõtlemisainet selle üle, kui suur on *in silico* andmete usaldusväärsus. Nagu tulemustest selgus, siis sama katse bioinformaatilise lahenduse ja ChIP-seq andmete võrdlus ei anna ühtset tulemust. Seega toetudes vaid *in silico* tulemustele, ei pruugi need vastata reaalsele olukorrale rakkudes.

Uurides tuvastatud CGGBP1 seondumissaitidel olevate geenide funktsioone, ei leitud kindlat trendi, pigem võib öelda, et CGGBP1 seondub väga erinevate bioloogiliste protsessidega seotud geenidele. Küll aga asus üpris suur osa ChIP-seq abil leitud piikidest rakutsükli (22%) ning rakuliste protsessidega (22%) seotud geenidel. *In silico* andmete põhjal tehtud analüüsi korral domineerivad metaboolsete protsessidega seotud geenid ning rakutsükliga seotud gene ei tuvastatud. Kuna varasemalt on näidatud CGGBP1 seost rakutsükliga (Singh ja Westermarck, 2011) ning ChIP-seq erinavalt *in silico* andmetest näitab reaalseid seondumiskohti, uuriti edasi rakutsükliga seotud gene CGGBP1 *knock downi* korral. 18-st uuritud geenist nähti CGGBP1 *knock downi*-i mõju ühele geenile - *PPP3CA* (*protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozym*) ekspressiooni tase oli viiekordistunud. Teiste geenide korral märkimisväärseid muutusi ei leitud. *PPP3CA* on seotud rakutsükli üleminekuga G1 faasist S faasi ja (Afroze et al., 2003) *PPP3CA* kuulub seriin/treoniin fosfataaside/ proteiin fosfataaside, katalüütilise subühiku perekonda. Seni pole näidatud seost CGGBP1 ja *PPP3CA* vahel, mistõttu tuleks antud seost edaspidi kinnitada ning edasi uurida.

Käesoleva uurimistöö raames püüti rakke arestida erinevates rakutsükli faasides. Kasutatud reagensid erinevate faaside arestiks küll töötasid, kuid erinevates rakutsükli faasides tehtud ChIP-qPCR andmete põhjal märkimisväärset erinevust sünkroniseerimata rakkudega võrreldes ei esinenud. HEK293 rakutsükli arestis G2/M faasis on täheldatav *FMRI* seondumissignaali tõus 2,5 korda ning *PRKACB* korral langus 2,3 korda. Kuna antud katse on tehtud ühes korduses, on vajalik tulemuste tõesust kinnitada korduskatsete abil. Lisaks tuleks edasistel katsetel rakutsükli blokeerimise protokollid parandada, et saavutada suurem rakkude rikastatus erinevates faasides. Samuti on plaanis rakutsükli faase blokeerida T-REx 5 ja 7 rakuliinides. Senistel katsetel (neid andmeid pole näidatud) on täheldatud rakutsükliks kuluva aja pikenemist üleekspresseeritud rakuliinides võrreldes HEK293 rakkudega.

CGGBP1 üleekspresseeritud rakuliinide korral ilmnes oodatavalt, et tetratsükliiniga kauem indutseerides CGGBP1 tase rakus tõusis ning seondumissignaal geenidele suureneb. On huvitav märkida, et kuigi T-REx rakuliin põhineb HEK293 liinil, siis tundub antud liin oluliselt erinevat HEK293 liinist rakutsükli pikkuse osas. Võrreldes omavahel töös kasutatud CGGBP1 üleekspresseeritud rakuliinidega oli T-REx 5 puhul CGGBP1 tase kõrgem kui T-REx 7 liinis sama tetratsükliini töötamise korral. Rakuliinide erinev tundlikkus tetratsükliini suhtes võib tuleneda rakuliinide konstrueerimise käigus tekkinud erinevustest, kuna ei ole võimalik jälgida, mis juhtub vektoriga pärast tema sisestamist, sealhulgas integratsioonikohta, koopiaarvu või koguni sisestatud konstrukti vaigistamist sihtmärkrakkudes.

Antud töös tehtud katsed ning erinevate meetodite kohandamine on aluseks edasistele eksperimentidele CGGBP1 rolli tuvastamises rakutsükli ning rakutsükliga seotud geenidele.

KOKKUVÕTE

CGGBP1 on 167 aminohappest koosnev valk, mille täpne funktsioon on tänaseni teadmata. Seni on pakutud, et CGGBP1 seondub 5'-CGG-3' rikastele aladele ning on seotud fragiilse X-i sündroomi esinemisega. Fragiilse X-i sündroomi põhjustavaks mutatsiooniks on trinukleotiidsed CGG korduse pikenemine *FMRI* geeni 5'UTR regioonis. Lisaks selgus hiljutistel katsetel inimese fibroblasti rakkudaga, et CGGBP1 fosforüülimine positsioonis S164 on telomeeri kaitsev signaal. Antud modifikatsioon võib mõjutada telomeeride otstes asuva telomeeri stabiliseerivat T-loop struktuuri, mida hoiab koos erinevatest valkudest koosnev shelterin kompleks. On näidatud ka CGGBP1 mõju rakutsükli vähirakkude korral. Tervetes inimese fibroblasti rakkudes on uuritud GGBP1 lokaliseerimise erinevates rakutsükli faasides, CGGBP1 näol on tegu tuumavalguga, mis rakkude lõpliku jagunemise ajal asub vahekehas. CGGBP1 defitsiidi korral on täheldatud G2 faasi aresti, mistõttu rakud pole võimelised sisenema mitoosi. CGGBP1 täpsete funktsioonide kohta on siiski vähe publikatsioone ning antud valguga toimemehhanismid on veel suuresti teadmata.

Käesoleva magistr töö eksperimentaalses osas võrreldi inimese genoomis *in silico* ja ChIP-seq andmete analüüsil tuvastatud CGGBP1 seondumissaite. Samuti uuriti CGGBP1 mõju rakutsükliga seotud geenide ekspressioonile CGGBP1 *knock down*'i korral. Kuna *in silico* andmed ei arvestanud kromatiini struktuuri ning antud meetodil leiti erinevalt ChIP-seq andmetest teoreetilised seondumissaidid, siis uuriti geeni ekspressiooni muutusi ChIP-seq analüüsil leitud seondumissaite sisaldavatel geenidel. Uuritud rakutsükli geenidest vajab edasist tähelepanu *PPP3CA*, mis teiste geenidega võrreldes andis CGGBP1 *knock down* korral ekspressiooni tõusu. Vaadeldi ka CGGBP1 seondumist CGG alal sisaldavate geenide promotoraladele erinevates rakutsükli faasides. Kuna rakkude rikastamise optimeerimine erinevates faasides osutus väga aeganõudvaks, siis oleks siin vaja teostada rohkem eksperimente täiendades rakutsükli blokeerimise protokollid ning uurida erinevate geenide ekspressiooni muutusi CGGBP1 üleekspresseeritud rakuliinides.

CGGBP1 binding sites in human genome and its role to cell cycle

Kristine Kreitsman

SUMMARY

CGGBP1 is a highly conserved 167 amino acids long protein. Its precise function and structure is still unknown. First it was discovered that CGGBP1 binds to *FMRI* promoter, which is an important gene in human intellectual disability and is related to Fragile X syndrome. CGGBP1 could bind to CGG-rich sequences and its binding is sensitive to DNA methylation status. Some works have shown that CGGBP1 blocks cell cycle in G0/G1 phase in cancer cells and has important role in abscission. Depletion of CGGBP1 results in G2 phase blocking in normal human fibroblast cells. One recent article showed a new role of CGGBP1 as telomere protecting signal. Despite the above mentioned the precise function of CGGBP1 is still unknown.

The aim of present work was to compare CGGBP1 binding sites detected by *in silico* analysis and ChIP-seq method. These two methods did not give highly overlapping results due to the different approaches. The biological processes of genes, which located near to CGGBP1 binding sites were very different and did not give a specific trend. Although, 22% of ChIP-seq detected genes were associated with cell cycle. To further investigate the role of CGGBP1 in cell cycle related genes, their expression was studied in CGGBP1 knock down cells. PPP3CA showed an increase in CGGBP1 depleted cells. Further investigation is needed here. Also the binding of possible CGGBP1 targets were studied in different cell cycle phases. No remarkable changes were observed. In future there is plan to investigate the influence of CGGBP1 overexpression to gene expression and also in different cell cycle phases.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

A) Ajakirjad

Afroze, T., Yang, L. L., Wang, C., Gros, R., Kalair, W., Hoque, A. N., Mungrue I.N., Zhu, Z., Husain, M. (2003). Calcineurin-independent regulation of plasma membrane Ca²⁺ ATPase-4 in the vascular smooth muscle cell cycle. *Am J Physiol*, 285: 88-95.

Basell, G.J., Warren, S.T. (2008). Fragile X syndrome: Loss of Local mRNA Regulation Alters Synaptic Development and Function. *Neuron*. 60: 201-214.

Crawford, D.C., Acuna, J.M., Sherman, S.L. (2001). FMR1 and the fragile X syndrome: Human genome epidemiology review. *Genet Med* 3:359-371.

Gerhardt, J., Tomishima, M. J., Zaninovic, N., Colak, D., Yan, Z., Zhan, Q., Rosenwaks, Z., Jaffrey., S. R, Schildkraut, C. L. (2014). The DNA Replication Program Is Altered at the *FMR1* Locus in Fragile X Embryonic Stem Cells. *Mol cell*. 53: 19-31.

Houtgraaf, J. H., Versmissen, J., & van der Giessen, W. J. (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med*, 7: 165-172.

Kruyer, H., Mila, M., Glover, G., Carbonell, P., Ballesta, F., Estivill, X. (1994). Fragile X syndrome and the (CGG)_n mutation. Two families with discordant MZ twins. *Am. J. Hum. Genet*. 54: 437-442.

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *TIBS*. 30: 630-641.

Mi, H., Muruganujan, A., & Thomas, P. D. (2013). PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.*, 41: 377-386.

Mirkin, E. V., & Mirkin, S. M. (2014). To Switch or Not to Switch: At the Origin of Repeat Expansion Disease. *Mol Cell*. 53: 1-3.

Musacchio, A., & Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Rev Molr Cell Biol.*,8: 379-393.

Müller-Hartmann, H., Deissler, H., Naumann, F., Schmitz, B., Schröer, J., Doerfler, W. (2000). The Human 20-kDa 5'-(CGG)_n-3'-binding Protein Is Targeted to the Nucleus and Affects the Activity of the *FMR1* Promoter. *JBC*. 275: 6447-6452.

Naumann, F., Remus, R., Schmitz, B. & Doerfler, W. (2004). Gene structure and expression of the 5'-(CGG)_n-3'-binding protein (CGGBP1). *Genomics*. 83: 106-118.

Obaya, A. J., & Sedivy, J. M. (2002). Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.*, 59: 126-142.

Patzke, S., Hauge, H., Sioud, M., Finne, E. F., Svivertsen, E. A., Delabie, J., Stokke, T., Aasheim, H-C. (2005). Identification of a novel centrosome/microtubule-associated coiled-coil protein involved in cell-cycle progression and spindle organization. *Oncogene*. 24: 1159-1173.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 73: 39-85.

Sánchez, I., & Dynlacht, B. D. (2005). New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Sem Cell Dev Biol*. 16: 311-321.

Schafer, K. A. (1998). The cell cycle: a review. *Vet Pathol*. 35: 461-478.

Singh, U., Maturi, V., Jones, E. R., Paulsson, Y., Baird, D. M., Westermark, B. (2014). CGGBP1 phosphorylation constitutes a telomere-protection signal. *Cell Cycle*. 13: 96-105.

Singh, U., Roswall, P., Uhrbom, L., Westermark, B. (2011). CGGBP1 regulates cell cycle in cancer cells. *BMC Mol Biol*. 12:28.

Singh, U., Westermark, B. (2011). CGGBP1 is a nuclear midbody protein regulating abscission. *Exp Cell Res*. 317: 143-150.

B) Raamatud

Stoyanova, V., & Oostra, B. A. 2004. The CGG repeat and the *FMR1* gene, p. 173-184. In *Trinucleotide Repeat Protocols*. Humana Press.

B.J, Alberts, A Johanson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, and M. Anderson, S. Granum (ed). 2008. p. 1053-1114. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science, New York.

G. M. Cooper, R. E. Hausman. 2009. p. 654-659. *In The Cell: A Molecular Approach*, 5th ed. ASM Press, Washington, D.C.

C) Interneti allikad

<http://ghr.nlm.nih.gov/condition/fragile-x-syndrome> (10.04.2014)

<http://cimg1.ck12.org/datastreams/f-d%3Ad203ba77bc1de277476fa98792a24986752ee5269586040ca4f01479%2BIMAGE%2BIMAGE.1> (10.04.2014)

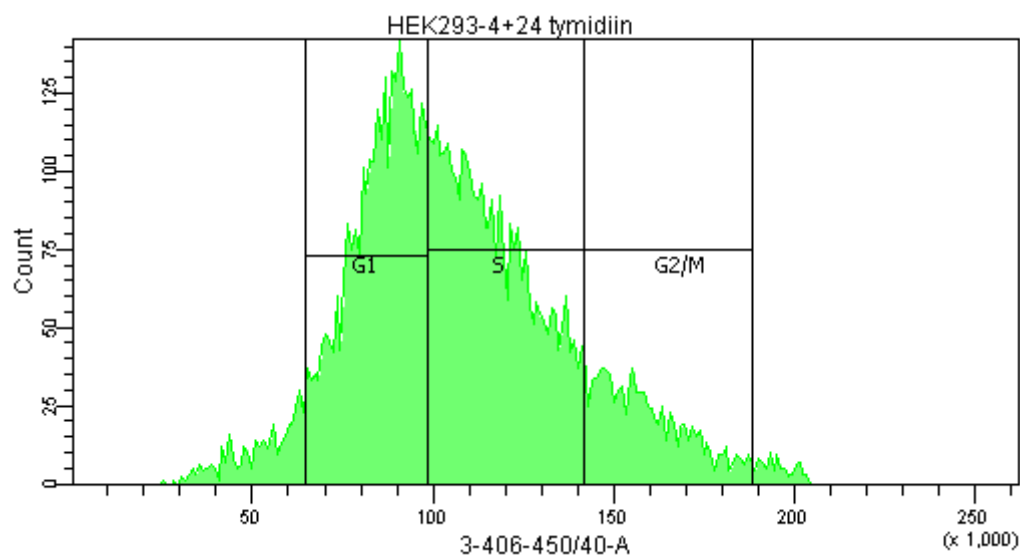
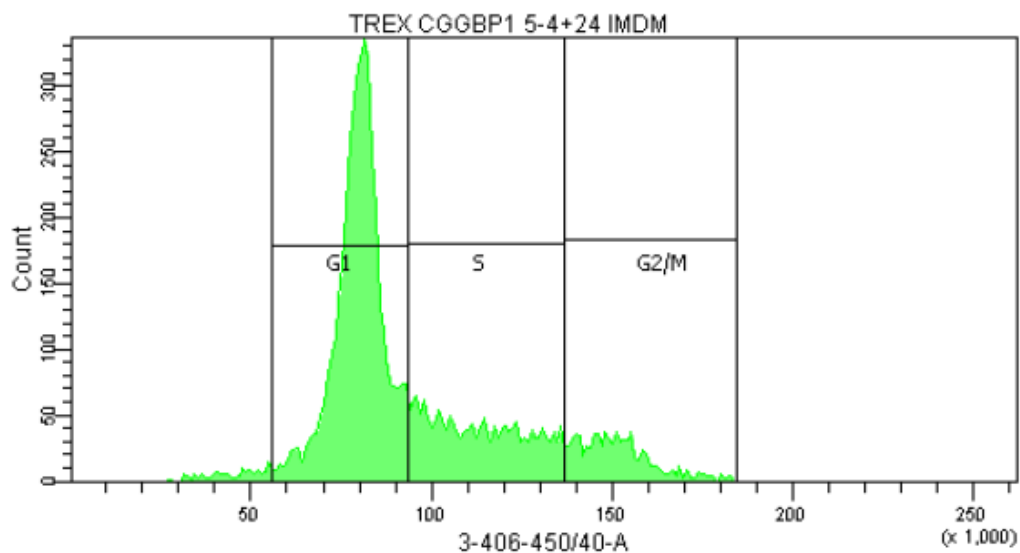
<http://www.pantherdb.org/> (7.10.2013)

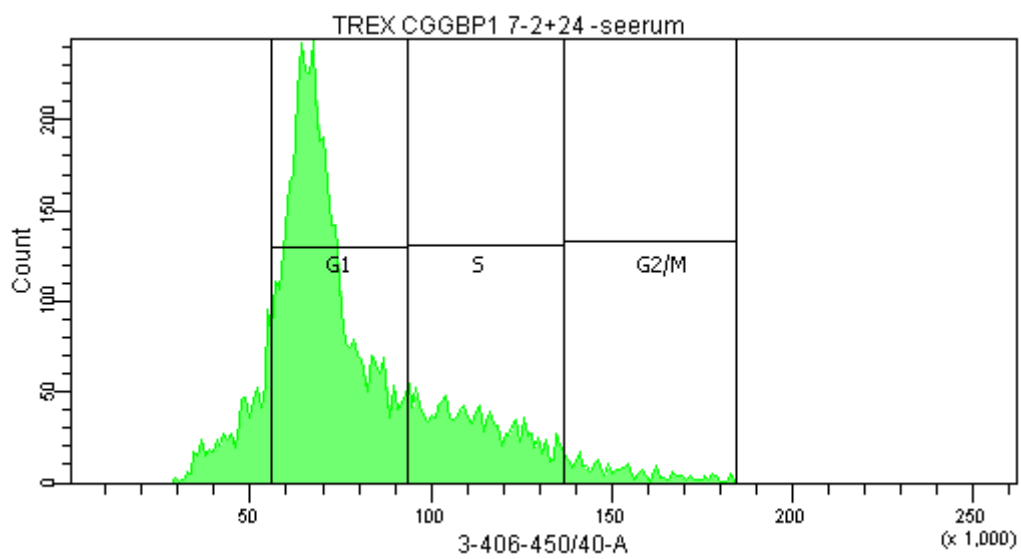
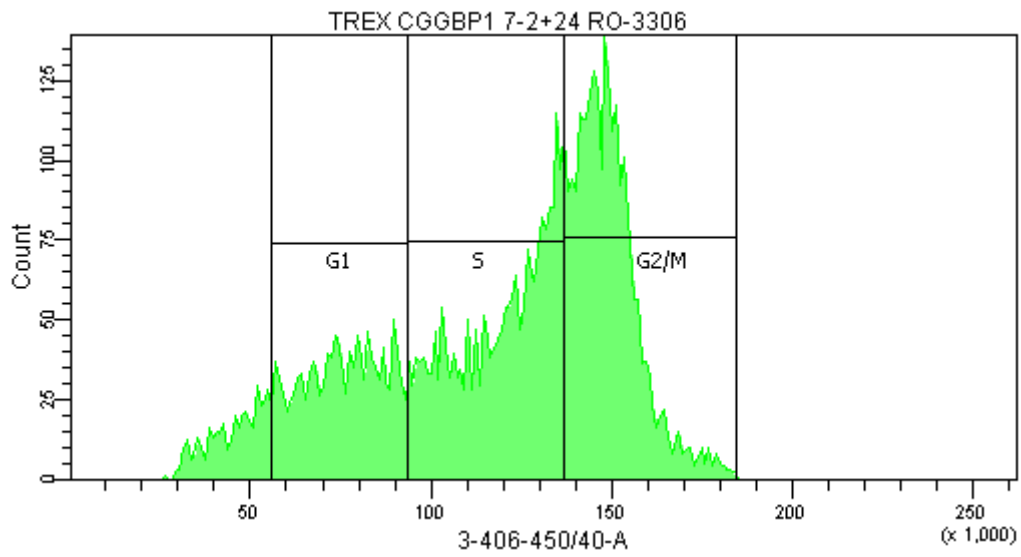
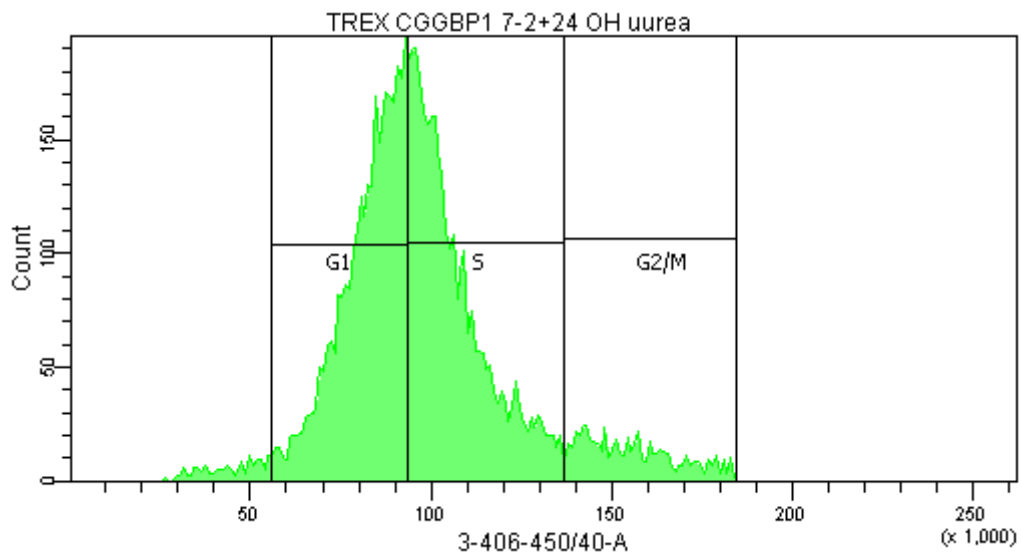
LISAD

LISA 1. Kasutatud praimerid

Geen	<i>Forward (5'-3')</i>	<i>Reverse (5'-3')</i>	<i>Kasutus</i>
BIRC6	TGATGGCAAGGTTTGTT	GTCTGAGGATTCCACTTC	qPCR
CDK6	TGCACAGTGTACGAACAGA	ACCTCGGAGAAGCTGAAACA	qPCR
CIT	GCTTCCCTGTCTCAATC	ATTCGTGGAAACACAGC	qPCR
CSNK1G3	TGGAGATACAAAACGGGCTACA	GCAACTGTTTACCAATCCAGTCA	qPCR
E2F3	AAAGCCCCTCCAGAAACAAGA	CCTTGGGTACTTGCCAAATGT	qPCR
FMN2	CCTTTCAAGGAAAACATGG	CTCTGTCAGTGAATTTTCC	qPCR
HOXA13	CAAATGTACTGCCCAA	ATGGGAGACCACGTC	qPCR
KIF14	ATAGCAAGACTTGAGGATG	AGCATCCCTGCAAAAAT	qPCR
LATS1	CGATGTCTAGCACATTCTT	TGTATCCTGTTCGTAGCA	qPCR
PDE4DIP	GGAAGCCTGCTCTGACATGG	GCAGAATGACTCGAATGATGGA	qPCR
PPP3CA	GTACTIONTCTGGAGGGAAG	TTGATAGCTTCATCAGCC	qPCR
PRKAB2	ATGCGTTTCGATCTGAGGAAAG	GGTTCAGCATAACATGGTTGGG	qPCR
PRKACB	CTAATCTATGAAATGGCAGC	GACCTTTCAGAAACAATC	qPCR
SDCCAG8	AGCTATTAATCAACTGGAGG	ACACACCTTTGTGACAT	qPCR
SMG6	GAGGATGACATCAGGGA	CAGCCTGGATCTTTTCC	qPCR
SOS1	CATGGAGAAGGAATTTACAG	TTTGAAATCTTGGGAGAG	qPCR
TLK1	CTGTCCAAGATTATGGATGA	AAATACCAGTAAGTGCCTG	qPCR
UBE2B	TGTGGGTGTCAAGTGG	CCTTCTGGTCCAAATATAAC	qPCR
ACTB	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	CGGCCACATTGTGAACCTTG	qPCR
YWHAZ_1	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	CCGCCAGGACAAACCAGTAT	qPCR
GAPDH_1	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	qPCR
GAPDH	AAACCCATCACCATCTTCCA	TACTCAGCACCAGCATCACC	ChIP-qPCR
CDKN1B	CCGCAACCAATGGATCTC	GGAGGCTGACGAAGAAGAAA	ChIP-qPCR
EXOC3	TAGCCGTAGAGGGTGAGTCG	CAGAGACAGGGAGAGCAAGG	ChIP-qPCR
FMR1	GTTGTTGGGAGGGAAGGACT	TCCTCGCTGGTCTCTCATT	ChIP-qPCR
POU4F2	TGATGTCCGTGAACAGCAAG	CCGAGTACTTGGGCTCCAC	ChIP-qPCR
PRKACB	GTGCTAAGGAGTTCGCTGGA	CACTCCACAGTCTGGGACAA	ChIP-qPCR

Lisa 2. FACS pildid rakutsükli arestis. HEK293, T-REx 5 ja 7 rakuliinide arest S-faasis (töötlus hüdroksüureaga või tümidiiniga), G2/M faasis (töötlus RO-3306-ga) ja G1 faasis (seerumivabas söötmes), võrdluseks on toodud sünkroniseerimata rakud (joonisel märgitud IMDM). Esmalt indutseeriti rakke tetratsükliiniga 2 või 4 tundi, seejärel rakutsükliit blokeeriva reagentiga 24 tunni vältel.





LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristine Kreitsman

(autori nimi)

(sünnikuupäev: 25.01.1990)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

CGGBP1 seondumissaidid inimese genoomis ja mõju rakutsüklile,
(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Ants Kurg,

(juhendaja nimi)

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

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

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, 26.05. 2014 *(kuupäev)*