

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Siret Somarokov

**Muutused replikatiivse helikaasi subühikute MCM3 ja MCM7 lokalisatsioonis ning  
interaktsioonis sensorvalguga KEAP1 vastusena oksüdatiivsele stressile**

Magistritöö

Juhendaja vanemteadur PhD Ivar Ilves

TARTU 2015

# SISUKORD

LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	6
1. ÜLEVAADE KIRJANDUSEST .....	7
1.1. DNA replikatsioon .....	7
1.1.1. Replikatsiooni initsiatsioon .....	8
1.1.1.1. MCM2-7 kui DNA helikaasi mootorvalkude kompleks .....	8
1.1.1.2. Replikatsiooni litsentseerimine .....	9
1.1.1.3. Helikaasi aktivatsioon ja replikatsiooni elongatsioon .....	10
1.1.2. DNA replikatsiooni regulatsioon .....	11
1.1.2.1. DNA replikatsiooni regulatsioon DNA kahjustuste korral .....	13
1.1.2.2. MCM-ide rakulise lokaliseerimise roll DNA replikatsiooni regulatsioonis .....	14
1.1. Oksüdatiivne stress ja sellega seotud regulatsioonimehhanismid .....	16
1.1.1. Oksüdatiivse stressi sensorvalk KEAP1 .....	16
1.1.2. Replikatiivse DNA helikaasi MCM2-7 subühikud KEAP1 interaktsioonipartneritena .....	19
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	20
2.1. Töö eesmärgid .....	20
2.2. Materjalid ja meetodika .....	20
2.2.1. Rakkude kasvatamine koekultuuris ja töötlus vesinikperoksiidiga .....	20
2.2.2. Rakkude fraktsioneerimine .....	21
2.2.3. SiRNA transfektsioon .....	22
2.2.4. <i>Western blot</i> analüüs .....	23
2.2.5. PLA analüüs .....	25
2.3. Tulemused .....	28
2.3.1. MCM-ide lokaliseerimine primaarsetes keratinotsüütides muutub H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> toimel .....	28
2.3.2. 300 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> tekitab primaarsetes keratinotsüütides DNA kahjustusi, aga mitte apoptoosi .....	31
2.3.3. MCM3 endine lokaliseerimine ei taastu peale lühiajalist 300 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> stressi, vaid MCM3 tase langeb aja jooksul kõikjal rakus .....	32
2.3.4. MCM3 ja MCM7 PLA abil määratud interaktsioonisignaalide hulk KEAP1-ga suureneb primaarsetes keratinotsüütides 300 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> toimel .....	33
2.4. Arutelu .....	39

KOKKUVÕTE .....	44
SUMMARY .....	46
TÄNUSÕNAD .....	48
KIRJANDUSE LOETELU .....	49
VEEBIAADRESSID .....	58
LISAD .....	59
Lisa 1 .....	59
Lisa 2 .....	62
LIHTLITSENTS.....	63

## LÜHENDID

- ATM – ataksia telangiiektaasia muteerunud kinaas (ingl *ataxia telangiectasia mutated*)
- ATR – ATM-Rad3-sarnane kinaas (ingl *ATM-Rad3-related*)
- BTB – KEAP1 domeen (ingl *Broad complex, Tramtrack and Bric-à-Brac*)
- C – tsütoplasma piirkond (ingl *cytoplasm*)
- Cdc – raku jagunemist kontrolliv valk (ingl *cell division cycle*)
- CDK – tsükliin sõltuv kinaas (ingl *cyclin-dependent protein kinase*)
- Cdt1 – raku jagunemist kontrolliv valk (ingl *cell division cycle 10-dependent transcript 1*)
- ChBNe – kromatiiniga seotud tuuma ekstrakt (ingl *chromatin bound nuclear extract*)
- CHK1 – kontrollpunkti kinaas 1 (ingl *checkpoint kinase 1*)
- CHK2 – kontrollpunkti kinaas 2 (ingl *checkpoint kinase 2*)
- CMG – Cdc-45, MCM2-7 ja GINS valgukompleks
- CPE – tsütoplasmaatiline fraktsioon (ingl *cytoplasmic extract*)
- Crml – tuumaekspordi valk (ingl *chromosomal maintenance 1*)
- CSK – tsütoskeleti (ingl *cytoskeleton*)
- CTR – C-terminaalne regioon (ingl *C-terminal region*)
- CySk – tsütoskeleti fraktsioon (ingl *cytoskeleton extract*)
- DDK – Dbf4-Cdc7 kinaas (ingl *Dbf4-Cdc7 kinase*)
- DGR – KEAP1 topelt glütsiini kordus domeen (ingl *double glycine repeat*)
- Dpb11 – DNA replikatsiooni regulaator [ingl *DNA replication regulator DNA Polymerase B (II)*]
- DPP3 – dipeptidüül-peptidaas 3 (ingl *dipeptidyl-peptidase 3*)
- dsDNA – kaheahelaline DNA (ingl *double stranded DNA*)
- GINS – *Go-Ichi-Ni-San* jaapani keeles 5, 1, 2, 3, tähistamaks subühikuid Sld5-Psf1-Psf2-Psf3
- H2I – heeliks-2 insert
- HPEK - inimese primaarsed epidermaalsed keratinotsüüdid (ingl *human primary epidermal keratinocytes*)
- IVR – vahepealne regioon (ingl *intervening region*)
- KEAP1 – Kelch moodi ECH seotud valk 1 (ingl *Kelch-like ECH-associated protein 1*)
- MAF – transkriptsioonifaktor (ingl *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*)
- MCM – minikromosoomi säilitamine (ingl *minichromosome maintenance*)

ME – membraane fraktsioon

N - tuuma piirkond (ingl *nucleus*)

NES – tuuma ekspordi signaal (ingl *nuclear export signal*)

NLS – tuuma lokaliseerimise signaal (ingl *nuclear localization signal*)

NRF2 – NF-E2 seotud faktor 2 (ingl *NF-E2 related factor 2*)

ORC – replikatsiooni alguspunkti ära tundev kompleks (ingl *origin recognition complex*)

P – sademe fraktsioon (ingl *pellet*)

PCNA – DNA polümeraasi protsesiivsusfaktor (ingl *proliferating cell nuclear antigen*)

PGAM5 – fosfoglütseraadi mutaasi perekonna fosfataas 5 (ingl *phosphoglycerate mutase family member 5*)

PLA – läheduse tuvastamise testi (ingl *proximity ligation assay*)

PMSF – fenüülmetüülsulfonüülfluoriid (ingl *phenylmethanesulfonylfluoride*)

Psf – replikatsiooni valk (ingl *partner of Sld five*)

PVDF – polüvinülideenfluoriid

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (ingl *reactive oxygen species*)

S – lahustuv fraktsioon (ingl *soluble*)

siRNA – (ingl *small interfering RNA*)

Sld – DNA replikatsiooni regulaatorvalk (ingl *DNA replication regulator synthetic lethal mutations with dpb11-1*)

SNE – lahustuv tuuma fraktsioon (ingl *soluble nuclear extract*)

ssDNA – üheaheelaline DNA (ingl *single stranded DNA*)

XPO1 – tuumaekspordi valk ekspordiin 1 (ingl *exportin 1*)

## SISSEJUHATUS

DNA replikatsioon on rakkude jagunemise keskne protsess, mis peab toimuma võimalikult korrektselt ning seetõttu on see ulatuslikult reguleeritud nii normaalsetes rakkudes kui stressivastuse korral. DNA replikatsiooni esimeses etapis, mida nimetatakse litsentseerimiseks, laetakse replikatiivne DNA helikaas MCM2-7 kromatiinile ning see määrab kõik võimalikud replikatsiooni alguspunktid. Edasi võimaldab MCM2-7 helikaasi aktivatsioon CMG kompleksi koosseisus replikatsiooni käivitamise. Käesolevas töös vaadeldi, kas MCM2-7 helikaas võiks olla replikatsiooni regulatsiooni sihtmärgiks oksüdatiivse stressi korral. Reaktiivsete hapnikuühendite poolt tekitatud oksüdatiivne stress aktiveerib rakus erinevaid kaitsemehhanisme, mille ülesanne on rakku kahjustuste eest kaitsta ning koordineerida juba tekkinud kahjustuste parandamine ülejäänud rakuliste protsessidega. Raku jätkusuutlikust silmas pidades on DNA replikatsiooni reguleerimine tingimustes, kus oksüdatiivne stress on DNA-d kahjustanud, eriti oluline. Selleks on rakkudes kaitsemehhanismid, mis vajadusel raku jagunemise peatavad. Oksüdatiivse stressi sensorvalku KEAP1-te käsitletakse eelkõige oksüdatiivse stressi kaitsevastust käivitava transkriptsioonifaktori NRF2-e negatiivse regulaatorina. Samas on leitud, et ka teised valgud, nende seas replikatiivse helikaasi MCM2-7 subühikud MCM3 ja MCM7 interakteeruvad KEAP1-ga (Ilves, publitseerimata andmed; Hast *et al.*, 2013). Selline interaktsioon viitab võimalusele, et KEAP1 osaleb oksüdatiivse stressi korral ka replikatsiooni regulatsioonis.

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida, kas KEAP1 reguleerib oksüdatiivse stressi korral replikatsiooni MCM2-7 subühikute MCM3 ja MCM7 kaudu. Täpsemalt uuritakse kuidas mõjutab oksüdatiivne stress MCM3 ja MCM7 subühikute lokalisatsiooni ning interaktsiooni stressi sensori KEAP1-ga. Uurimistöö viidi läbi Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

**Märksõnad: replikatsiooni regulatsioon, MCM3, MCM7, KEAP1, oksüdatiivne stress.**

# 1. ÜLEVAADE KIRJANDUSEST

## 1.1. DNA replikatsioon

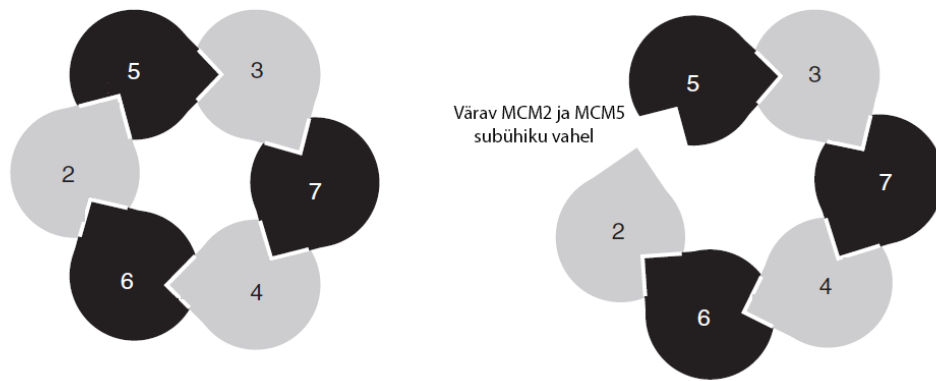
Protsessi, mille käigus rakk kopeerib kogu oma genoomse materjali, et järgneva jagunemise käigus tekkivad tütarrakud päriks sellest identse koopia, nimetatakse DNA replikatsiooniks. Alates esimestest pooldumistest sügoodis kuni hilisemas elus kudede uuenemiseni, on DNA replikatsioon keskne protsess rakkude jagunemises, tagades geneetilise materjali katkematu pärandumise. DNA replikatsiooni mastaapsusest ja olulisusest annab aimdust fakt, et inimese kehas on hinnanguliselt  $3,72 \times 10^{13}$  rakku (Bianconi *et al.*, 2013), kus DNA on kopeeritud lähtudes ühest ainsast viljastatud munarakust. DNA replikatsioon peab seega toimuma äärmiselt täpselt ja kontrollitult, et iga rakk organismis päriks vigadeta DNA. Kuna probleemid raku jagunemise regulatsioonis on iseloomulikud kasvajalistele protsessidele, on DNA replikatsiooni ja regulatsiooni häired samuti potentsiaalsed kasvajate tekke ning progressiooni põhjustajad. Peamisteks DNA replikatsiooni ja sellega kaasnevateks etappideks on replikatsiooni initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon, samuti DNA lahti pakkimine enne replikatsiooni ning kõrgemat järku DNA struktuuride taasmoodustumine peale replikatsiooni. Nende protsessidega kaasneb ulatuslik kromatiini remodelleerimine ning modifitseerimine. Lisaks on DNA replikatsioon tihedalt koordineeritud kvaliteedikontrolli, DNA vigade paranduse ning transkriptsiooni läbi viivate protsessidega (O'Donnell *et al.*, 2013).

### 1.1.1. Replikatsiooni initsiatsioon

DNA replikatsiooni algatamise ehk initsiatsiooni võib jagada replikatsiooni litsentseerimiseks rakutsükli M faasist G1 faasini ja sellele järgneva replikatsiooni tegelikuks käivitamiseks G1/S üleminekul (Diffley, 2004; Méndez & Stillman, 2000; Blow & Dutta, 2005). Mõlema etapi toimumises mängib kesksel rollil MCM2-7 ehk replikatiivse helikaasi mootorvalkude kompleks.

#### 1.1.1.1. MCM2-7 kui DNA helikaasi mootorvalkude kompleks

MCM 2-7 helikaas on kaheaheelalist DNA-d lahti harutav valgukompleks, mille aktiivsus on hädavajalik, et DNA polümeraas saaks üheaheelalist DNA (ingl *single stranded DNA*, ssDNA) matriitsi kasutades DNA-d replitseerida (Boos *et al.*, 2012). MCM-id (ingl *minichromosome maintenance*) avastati esmalt kui pärmi minikromosoomi säilitamiseks vajalikud geenid (Maine *et al.*, 1984). MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 ja MCM7 on nüüdseks identifitseeritud kui eukarüootse DNA helikaasi kõrgelt konserveerunud subühikud (Forsburg, 2004). MCM-id moodustavad rõngakujulise kompleksi, kus kuus subühikut paigutuvad kindlas järjekorras – MCM5-3-7-4-6-2 (joonis 1) ning rõnga keskele jääb kanal, mis on piisavalt suur mahutamaks kaheaheelalist DNA-d (ingl *double stranded DNA*, dsDNA) (Crevel *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2011; Bell & Botchan, 2013). MCM5 ja MCM2 subühikute vahel paikneb värv (Costa *et al.*, 2011), mis on oluline heksameeri laadimiseks DNA-le (Samel *et al.*, 2014). MCM2-7 kompleks paigutatakse esmalt inaktiivse vormina dsDNA-le (Remus *et al.*, 2009). Replikatsiooni käivitamisel aktiveeritakse see lisafaktorite abil (Yeeles *et al.*, 2015) ning aktiivne helikaas liigub hiljem mööda ssDNA-d (Fu *et al.*, 2011). MCM2-7 helikaas harutab DNA kaksikahelat, liikudes ssDNA-d mööda 3' → 5' suunas, lükates ühte DNA ahelat teise küljest lahti (Graham *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2011). MCM2-7 valgud kuuluvad AAA+ perekonna ATPaaside hulka ning DNA ahelal liikumiseks ja dupleksi lahti harutamiseks kasutab MCM2-7 helikaas ATP hüdrolyüüsi energiat (Forsburg, 2004). Lisaks AAA+ valkude iseloomulikele motiividele on MCM-idel iseloomulikud „juuksenõela sõrme“ struktuurid. Arhede MCM-ide analüüsi põhjal on need vajalikud DNA-ga seondumiseks ning ATP-st sõltuvaks DNA dupleksi lahti keeramiseks. Nendest struktuuridest on N-terminaalne juuksenõel, heeliks-2 insert (H2I) ja presensor-1 suunatud MCM kompleksi sisse ning väliline juuksenõel välja. (Bochman & Schwacha, 2009)



**Joonis 1. MCM2-7 subühikute paigutus heksameetris.** MCM2-7 on tähistatud numbritega 2-7. Paremalt on näidatud MCM2 ja MCM5 subühiku vahel paiknev värv. Modifitseeritud joonis Bell & Botchan järgi (2013).

### 1.1.1.2. Replikatsiooni litsentseerimine

Litsentseerimine on replikatsiooni etapp, kus kromatiinile paigutatakse MCM2-7 kompleks ning määratakse seeläbi DNA replikatsiooni alguspunktid. Replikatsiooni alguspunktideks (ingl *origin*) nimetatakse DNA regioone, kuhu seonduvad litsentseerimiseks vajalikud initsiaatorvalgud ning kust algab DNA replikatsioon. Kui bakterites on tavaliselt üksainus kindla konserveerunud nukleotiidses järjestuses DNA replikatsiooni alguspunkt, siis eukarüootsetes organismides on neid seoses genoomi suuremaks ja keerulisemaks muutumisega üle kõikide kromosoomide mitmeid. Enamikel eukarüootidel ei ole replikatsiooni alguspunkt kindla DNA järjestusega määratud, kuid erandina on defineeritud järjestusega replikatsiooni alguspunkt replikatsiooni uurimise ühel mudelorganismil pagaripärmil *Saccharomyces cerevisiae*'l (Leonard & Méchali, 2013).

Replikatsiooni alguspunkti litsentseerimiseks on hädavajalikud ORC (ingl *origin recognition complex*), Cdc6 (ingl *cell division cycle 6*) ning Cdt1 (ingl *cell division cycle 10-dependent transcript 1*) valgud, mis osalevad inaktiivse MCM2-7 helikaasi kromatiinile laadimises (Siddiqui *et al.*, 2013) (joonis 2). Esmalt tunnevad ORC ja Cdc6 ära DNA replikatsiooni alguspunktid (Speck *et al.*, 2005; Speck & Stillman, 2007) ning järgnevalt laetakse Cdt1 vahendusel MCM2-7 heksameerid DNA-le, moodustunud kompleksi nimetatakse pre-replikatsiooni kompleksiks (Randell *et al.*, 2006). ORC, Cdc6 ja Cdt1 ei mängi replikatsioonis pärast MCM2-7 kromatiinile laadimist enam rolli ning edasistes protsessides osalevad juba järgmised regulaatorvalgud (Yeeles *et al.*, 2015; Randell *et al.*, 2006). MCM 2-7 helikaas laetakse dsDNA-le kaksikheksameerina, mis jääb inaktiivseks, kuni rakud on otsustanud

siseneda S-faasi ning käivitada replikatsiooni alguspunktidest mõlemas suunas liikuvad replikatsioonikahvlid (joonis 2) (Evrin *et al.*, 2009; Gambus *et al.*, 2011; Remus *et al.*, 2009).

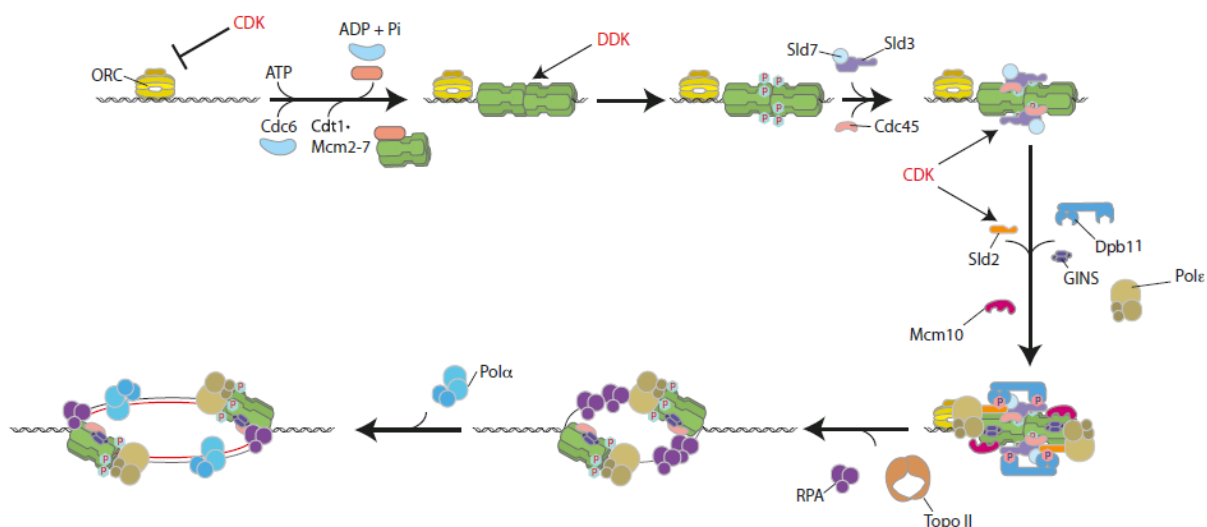
### **1.1.1.3. Helikaasi aktivatsioon ja replikatsiooni elongatsioon**

MCM2-7 kromatiinile laadimine ei ole üksi piisav replikatsioonikahvli käivitamiseks (ingl *origin firing*). MCM2-7 helikaas on vaja aktiveerida, et see omandaks võime dsDNA-d lahti harutada ning võimaldaks DNA polümeraasil ligipääsu DNA matriitsile. Helikaasi aktiivsusega kompleksi nimetatakse CMG-ks (Cdc-45, MCM2-7 ja GINS) ning see moodustub, kui inaktiivsele MCM2-7 heksameerile lisanduvad Cdc45 (ingl *cell division cycle 45*) ja neljast subühikust koosnev GINS (*Go-Ichi-Ni-San*, jaapani keeles 5, 1, 2, 3, tähistamaks subühikuid Sld5-Psf1-Psf2-Psf3) (Ilves *et al.*, 2010). Helikaasi aktiivseks muutumisega kaasneb dsDNA ahelate esialgne lahknemine ning CMG kompleksis oleva MCM2-7 helikaasi üleminek dsDNA ümbritsevalt vormilt ssDNA-ga seotud vormile (Costa *et al.*, 2011), misjärel helikaas saab edasise DNA lahti keeramisega alata (Fu *et al.*, 2011).

Aktiivse CMG kompleksi moodustumise protsessi on praeguseks kõige detailsemalt kirjeldatud *S. cerevisiae*'s, kus selleks on vaja lisafaktoreid Sld3, Sld7, Sld2 (ingl *DNA replication regulator synthetic lethal mutations with dpb11-1*), Dpb11 [ingl *DNA replication regulator DNA Polymerase B (II)*] ja polümeraas  $\epsilon$ . Nende valkude kaasamiseks on kriitilise tähtsusega proteiinkinaasid CDK (ingl *cyclin-dependent protein kinase*) ja DDK (ingl *Dbf4-Cdc7 kinase*) (Siddiqui *et al.*, 2013; Yeeles *et al.*, 2015). *S. cerevisiae*'s kaasatakse MCM2-7 helikaasi käivitamiseks minimaalselt vajalikest faktoritest Sld3, Sld7 ja Cdc45 DDK aktiivsusest sõltuvalt ning Sld2, Dpb11, GINS, polümeraas  $\epsilon$  ja Mcm10 (vajalik mitte CMG moodustamiseks, vaid aktiveerimiseks) nii DDK kui CDK aktiivsusest sõltuvalt (Yeeles *et al.*, 2015) (joonis 2). Polümeraas  $\epsilon$  on vajalik CMG kompleksi moodustamiseks (Yeeles *et al.*, 2015) ning täidab hiljem oma funktsiooni DNA juhtiva ahela sünteesil, polümeraas  $\delta$  on vaja replisoomiga liita mahajääva ahela sünteesiks (Kunkel & Burgers, 2008; Georgescu *et al.*, 2015). Enne replikatsiooni algust liidetakse relisoomiga ka primaas, tänu millele sünteesitakse praimerid ja saab alata protsessiivne DNA kopeerimine (Tognetti *et al.*, 2014) (joonis 2).

Kuigi replisoomi kokkupanek kõrgemates eukariootides on ilmselt keerukam kui *S. cerevisiae*'s, viitavad praegused teadmised sellele, et üldjoontes on protsess eukariootides konserveerunud (Tognetti *et al.*, 2014). Kõrgemates eukariootides on kõigi MCM2-7 käivitamises osalevate faktorite jaoks peale Sld7 olemas sarnast funktsiooni läbiviivad valgud

(Yekezare *et al.*, 2013). CMG moodustumiseks vajalikele *S. cerevisiae* valkudele Sld3, Sld2 ja Dpb11-le vastavad selgroogsete Treslin/Ticrr, RecQ4 ja TopBP1/Cut5 valgud (Collart *et al.*, 2013; Tognetti *et al.*, 2014). Samas osaleb kõrgemates eukarüootides CMG aktiveerimises ka teisi olulisi lisafaktoreid (Balestrini *et al.*, 2010; Boos *et al.*, 2013; Chowdhury *et al.*, 2010).



**Joonis 2. DNA replikatsiooni initsiatsioon *S. cerevisiae*'s.** Esmalt seondub ORC kompleks replikatsiooni alguspunktidele ning MCM2-7 lisatakse kromatiinile Cdc6 ja Cdt1 sõltuvalt. Aktiivse helikaasi kompleksi CMG (Cdc45, MCM2-7 ja GINS) moodustumises osalevad lisafaktorid Sld7, Sld3, Sld2, Spb11 ja polümeraas  $\epsilon$ . CMG käivitamiseks on vaja ka Mcm10. Replikatsiooni alustamiseks on lisaks vajalikud RPA, Topo II ja polümeraas  $\alpha$  ehk primaas. CDK inhibeerib ORC seondumist kromatiinile ning on vajalik CMG moodustumiseks, fosforüleerides Sld3-e ning Sld2-e. DDK on samuti vajalik CMG moodustumiseks ja tema substraadiks on MCM2-7. Modifitseeritud joonis Yeeles *et al.* põhjal (2015).

### 1.1.2. DNA replikatsiooni regulatsioon

MCM2-7 ning teised pre-replikatiivse kompleksi valgud on kasvajates ja düsplaasias ebaloomulikult kõrgel tasemel ekspresseeritud ning seetõttu on neid kasutatud prognostiliste markeritena (Williams & Stoeber, 2007; Hook *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 1998). Võimalik on, et MCM-ide üle-ekspressioon kasvajates on tingitud kasvajatele iseloomulikust intensiivsest rakujagunemisest. Samas on tõendeid, et litsentseerimise häirumine ning üleliigne või ka liiga vähene MCM2-7 kromatiinile laadimine, võib olla otsene põhjus, mis viib rakkude kasvavajaliseks muutumiseni. Valel ajal ning üleliigne DNA litsentseerimine võib põhjustada mitmekordselt kopeeritud DNA piirkondi ning liiga vähene MCM2-7 kromatiinile laadimine kahjustab rakkude võimet kogu genoomi replitseerida (Blow

& Gillespie, 2008). Seetõttu kontrollitakse DNA replikatsiooni ning eelkõige litsentseerimist mitmete mehhanismide vahendusel ning tagatakse selle veatu toimimine koordineeritult teiste rakuliste protsessidega.

Üheks oluliseks aspektiks DNA replikatsiooni regulatsioonis on rakutsüklist sõltuv kontroll, mida vahendatakse tsükliin sõltuvate kinaasidega (CDK) (Siddiqui *et al.*, 2013). Rakutsükliis eristub neli faasi – G1 faasis valmistub rakk DNA sünteesiks, S faasis toimub DNA süntees, G2 faasis valmistub rakk mitoosiks ja mitoosi (M) faasis segregeeritakse replitseerunud kromosoomid ning toimub tütarakkude teke. Ühest replikatsiooni alguspunktist mitmekordse replikatsiooni takistamiseks on replikatsiooni initsiatsiooni kaks peamist etappi – MCM2-7 kromatiinile laadimine ja järgnev aktiveerimine, lahutatud rakutsükli erinevatesse faasidesse. MCM2-7 kromatiinile laadimine on lubatud ainult rakutsükli hilises M faasis ja G1 faasis (Diffley, 2004; Méndez & Stillman, 2000), S-faasis suureneb CDK tase ja *S. cerevisiae*'s suunab CDK poolne fosforüleerimine Cdc6 lagundamisele (Elsasser *et al.*, 1999), MCM-ide tuumast ekspordile (Nguyen *et al.*, 2000; Labib *et al.*, 1999) ja ORC valkude inaktivatsioonile (Wilmes *et al.*, 2004; Chen & Bell, 2011). Imetaja rakkudes viib CDK sõltuv Cdt1 fosforüleerimine selle lagundamiseni (Sugimoto *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004). ORC kompleksi subühikute fosforüleerimine CDK poolt viib nende lagundamisele (Méndez *et al.*, 2002), tuumast ekspordile (Saha *et al.*, 2006) ning kromatiiniga seondumise inhibeerimiseni (Méndez *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2012). Kõrgemates eukarüootides on lisaks CDK sõltuvale regulatsioonile veel teisi mehhanisme, et tagada litsentseerimise inhibeerimine väljaspool G1-faasi. Uute replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine inhibeeritakse lisaks geminiiniga, mis seob Cdt1-te ja takistab seeläbi MCM-ide kromatiinile laadimise (Wohlschlegel *et al.*, 2000). Peale selle osaleb S faasis toimuval DNA replikatsioonist sõltuval Cdt1 lagundamisel ka DNA polümeraasi protsessiivsusefaktor PCNA (ingl *proliferating cell nuclear antigen*) (Arias & Walter, 2006). MCM2-7 helikaasi kromatiinile laadimine on seega mitmete regulatoorsete radade sihtmärk, rõhutades selle olulisust korrektse DNA replikatsiooni seisukohast.

Alates S faasist suureneb CDK tase ja takistatakse MCM2-7 kromatiinile laadimist, samas on tänu CDK-le võimalik MCM2-7 helikaasi järgnev aktiveerimine. Aktiivse helikaasi kompleksi ehk CMG moodustamiseks on vajalikud nii CDK kui DDK kinaasid (Siddiqui *et al.*, 2013; Yeeles *et al.*, 2015). *S.cerevisiae*'s on CDK fosforüleerimise substraatideks Sld3, Sld2 ning DDK substraadiks MCM2-7, ülejäänud vajalikud faktorid lisanduvad nendest fosforüleerimistest sõltuvalt (Yeeles *et al.*, 2015) (joonis 2).

Lisaks reguleeritakse replikatsiooni käivitamise ajastust replikatsiooni alguspunktidest, sest kõiki kromatiinile laetud MCM2-7 komplekse ei aktiveerita S-faasi alguses korraga. Replikatsiooni alguspunkte jagatakse nende käivitumise aja järgi varasteks või hilisteks (Masai *et al.*, 2010). Samuti ei käivitata DNA replikatsiooni läbiviimiseks kõiki eelnevalt kromatiinile laetud MCM2-7 komplekse, vaid ainult umbes 10% neist (Burkhart *et al.*, 1995; Mahbubani *et al.*, 1997; Donovan *et al.*, 1997). Ülejäänud MCM2-7 kompleksid on vajalikud selleks, et tagada genoomi replikatsioon ka võimaliku replikatiivse stressi tingimustes (Ibarra *et al.*, 2008; Woodward *et al.*, 2006). See võimaldab uue replikatsiooni alguspunkti käivitamist ning DNA replitseerimist piirkondades, kus eelmise replikatsioonikahvli progressioon ja DNA süntees on erinevatel põhjustel aeglustunud või peatunud (Zeman & Cimprich, 2014).

#### **1.1.2.1. DNA replikatsiooni regulatsioon DNA kahjustuste korral**

DNA kahjustused, mis tekivad näiteks spontaansetes reaktsioonides reaktiivsete hapniku ühenditega, takistavad replikatsiooni (Hoeijmakers, 2009). Kui replikatsioonikahvel satub DNA-d sünteesides vastamisi kahjustustega, siis replikatsioon peatub ja see on vajalik, et vigane DNA ei päranduks järgmisesse põlvkonda (Ciccina & Elledge, 2010). Vastuseks DNA kahjustusele aktiveeritakse *S.cerevisiae*'s Rad53 kinaas, mis lülitab välja helikaasi aktivatsioonil osalevad DDK ja Sld3 neid fosforüleerides ning tõkestab sellega edasise replikatsiooni alguspunktide käivitamise (Zegerman & Diffley, 2010). Kõrgemates eukarüootides aktiveeritakse DNA kahjustuse korral ATM (ingl *ataxia telangiectasia mutated*) ja ATR (ingl *ATM-Rad3-related*) kinaasid, mis vastavalt kahjustuse ulatusele peatavad rakutsükli ja koordineerivad kahjustuse parandamise DNA replikatsiooniga, suunavad raku apoptoosi või pöördumatusse kasvu peatumisse ehk *senescence*'i (Ciccina & Elledge, 2010). ATR aktiveeritakse peamiselt üheaahelaliste DNA katkete korral ning selle funktsiooniks on fosforüleerida mitmeid sihtmärke, millest CHK1 (ingl *checkpoint kinase 1*) on üks olulisemaid (Ciccina & Elledge, 2010; Liu *et al.*, 2000). CHK1 inhibeerib CDK-de aktiivsust ning takistab seega replikatsiooni käivitamist ja aeglustab rakutsükli läbimist (Sanchez, 1997; Sørensen *et al.*, 2003). Lisaks inhibeerib CHK1 sarnaselt *S. cerevisiae* Rad53-le Sld3 homoloogi Treslin/ticrr-i (Boos *et al.*, 2011) ja DDK kinaasi (Heffernan *et al.*, 2007) takistades replikatsiooni käivitamist. ATM kinaas aktiveeritakse kaheaahelaliste katkete korral ning see aktiveerib omakorda CHK2-e (ingl *checkpoint kinase 2*) (Lavin, 2008), mis nagu CHK1 inhibeerib CDK aktiivsust (Costanzo *et al.*, 2000). Lisaks reguleerib CHK2 replikatsiooni inhibeerides replikatsiooni elongatsiooni (Ilves *et al.*, 2012). DNA kahjustuse

korral on regulatsiooni sihtmärgiks ka G1 faasis toimuv replikatsiooni litsentseerimine. Seni on leitud, et DNA kahjustuse tekkel inhibeeritakse MCM2-7 kromatiinile laadimist Cdt1 lagundamise läbi ning see toimub sõltumatult ATM/ATR signalisatsioonirajast (Hu, 2006; Higa *et al.*, 2003; Ralph *et al.*, 2006).

#### **1.1.2.2. MCM-ide rakulise lokaliseerimise roll DNA replikatsiooni regulatsioonis**

*S. cerevisiae*'s on MCM2-7 rakulise lokaliseerimise regulatsioon üks võimalus vältimaks mitmekordset replikatsiooni. MCM2-7 kompleks transporditakse G2 ning M faasiks tuumast välja MCM3-e CDK poolsest fosforüleerimisest sõltuvalt (Nguyen *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2001; Liku *et al.*, 2005; Labib *et al.*, 1999). Seni pole teistest eukarüootidest leitud MCM2-7 lokaliseerimise regulatsiooni mehhanisme, mis takistavad pre-replikatiivsete komplekside moodustumist. Inimese rakkudes laetakse MCM2-7 kromatiinile peale mitoosi ja eemaldatakse kromatiinilt, kui rakud läbivad S faasi (Méndez & Stillman, 2000). MCM-id püsivad tuumas läbi terve rakutsükli (Schulte *et al.*, 1995) ning nende tase ei muutu rakutsükli vältel (Méndez & Stillman, 2000). Seega tundub, et kõrgemates eukarüootides on rakutsüklil sõltuvalt pigem reguleeritud MCM2-7 kromatiiniga assotsiatsioon mitte tase ega lokaliseerimine.

Enamik MCM2-MCM7 valke on rakkudes MCM2-7 heksameerina (Prokhorova & Blow, 2000; Fujita, 2006; Kimura *et al.*, 1996), mille moodustumine on vajalik MCM2-7 tuuma transpordiks. Katsed *Schizosaccharomyces pombe* on näidanud, et MCM2-7 kokkupanek toimub ainult tsütoplasmas ja see on vajalik heksameeri lokaliseerimiseks tuuma (Pasion & Forsburg, 1999). Lisaks transporditakse heksameeri mitte moodustavad MCM-id tuumast välja, kui üks subühikutest on inaktiveeritud (Pasion & Forsburg, 1999), mis viitab võimalusele, et intaktne heksameer on vajalik ka lokaliseerimise säilitamiseks tuumas. *S. cerevisiae*'s on samuti MCM2-7 tuuma lokaliseerimiseks vajalik heksameeri teke (Labib *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2000) ja hiire rakkudes on nii MCM2 ja MCM3 vajalikud heksameeri tuuma lokaliseerimiseks (Kimura *et al.*, 1996), viidates jällegi sellele, et MCM2-7 võidakse tuuma viia heksameerina.

Kuna MCM2-7 liigub tuuma kompleksina, on vajalik, et mõni subühikutest omaks signaali, mis suunab kompleksi transporti tuuma. On leitud, et MCM2 ja MCM3 subühikud kannavad tuuma lokaliseerimise signaale (ingl *nuclear localization signal*, NLS), millega tuuma impordi retseptorid seonduvad. MCM2-1 on NLS tuvastatud *S. cerevisiae* (Nguyen *et al.*, 2000), *S. pombe* (Pasion & Forsburg, 1999) ja hiire rakkudes (Ishimi *et al.*, 2001). MCM3-1 on tuuma

lokalisatsiooniks vajalik NLS leitud *S. cerevisiae* (Young *et al.*, 1997) ja inimese rakkudest (Takei & Tsujimoto, 1998). Kusjuures *S. cerevisiae*'s teostatud katsed näitavad, et nii MCM2 kui MCM3 NLS signaali on korruga vaja, et heksameer tuuma transporditaks (Liku *et al.*, 2005). Kimura ja kaasautorite poolt teostatud töö hiire rakkudega (Kimura *et al.*, 1996), kus nii MCM2 ja MCM3 olid heksameeri tuuma lokalisatsiooniks vajalikud, viitab sellele, et ka kõrgemates eukariootides võib MCM2-7 tuuma lokalisatsioon sarnaselt reguleeritud olla.

*S. cerevisiae*'l transporditakse MCM2-7 alates S faasist tuumast välja (Nguyen 2000, Nguyen 2001) ning on leitud, et tuuma ekspordi signaal (ingl *nuclear export signal*, NES) paikneb MCM3 subühikul (Liku *et al.*, 2005). Valkude ekspordi tuumast vahendavad NES siduvad retseptorvalgud nagu Crm1 (ingl *chromosomal maintenance 1*). Katsetest *S. cerevisiae*'ga leiti, et Crm1 retseptor ekspordib MCM3 NES sõltuvalt vähemalt MCM3 ja MCM7 subühikud tuumast välja (Liku *et al.*, 2005). *Xenopus*'e ekstraktist on leitud, et Crm1 seob tuumas CDK sõltuvalt MCM7 subühikut, võimalik, et kogu heksameetri, ja inhibeerib sellega replikatsiooni initsiatsiooni, kuid kompleksi tuumast eksport pole selleks vajalik (Yamaguchi & Newport, 2003). Inimese rakkudes tehtud eksperimentidega on näidatud, et MCM3 interakteerub NES vahendusel XPO1-ga (eksportiin 1, imetajate homoloog Crm1 valgule) (Chuang *et al.*, 2012). Seega omab MCM3 subühik rolli MCM2-7 heksameeri tuuma impordis ja ekspordis, kuid on võimalik, et XPO1 vahendusel ka replikatsiooni initsiatsiooni regulatsioonis.

Helikaasi funktsiooni täitmiseks on kõik kuus subühikut MCM2-7 kompleksis hädavajalikud (Forsburg, 2004). Hiirtes teostatud katsed näitavad, et destabiliseeritud MCM4 või vähenenud MCM2 tasemetega hiiri iseloomustab geneetiline ebastabiilsus ning suurem vastuvõtlikkus kasvajatele ja arengudefektidele (Shima *et al.*, 2007; Pruitt *et al.*, 2007). Destabiliseeritud MCM4-ga hiirtes on teiste MCM-ide tase langenud 40%. Vähendades nendes hiirtes lisaks MCM2, 6 või 7 hulka suureneb nende vastuvõtlikkus kasvajatele, esineb embrüonaalset letaalsust ning probleeme rakkude proliferatsiooniga. Samas, kui lisaks viia MCM3 tase alla, siis sellised efektid vähenevad ning suureneb kromatiiniga seotud MCM2-7 hulk. (Chuang *et al.*, 2010) MCM3 regulatoorset rolli MCM2-7 kromatiinile laadimises toetab ka *S. cerevisiae*'s läbi viidud töö, kus leiti, et MCM3 C-terminaalne piirkond on vajalik Ctd1/MCM2-7 seondumiseks ORC/Cdt6-ga ja kromatiinile laadimiseks (Frigola *et al.*, 2013).

## 1.1. Oksüdatiivne stress ja sellega seotud regulatsioonimehhanismid

Oksüdatiivne stress tekib, kui rakkudes on häiritud reaktiivsete hapnikuühendite (ingl *reactive oxygen species*, ROS) ja antioksidatiivsete kaitsemehhanismide vaheline tasakaal. ROS-id on näiteks superoksiid anioon ( $O_2^{\cdot-}$ ), vesinik peroksiid ( $H_2O_2$ ) ja hüdroksüülradikaal ( $HO\bullet$ ) (Hensley *et al.*, 2000; Ma, 2010). ROS-id tekivad rakkude normaalse metabolismi käigus, kuid neid toodetakse ka mitmete väliste mõjutuste toimetel, nagu UV-kiirgus, ravimid ja teised kemikaalid (De Bont & van Larebeke, 2004). Normaalses oludes tekib rakkudes ROS-e madalates kontsentratsioonides ja antioksidatiivsed süsteemid saavad nende neutraliseerimisega hakkama. Madalates kontsentratsioonides on ROS-id signaalmolekulidena isegi vajalikud (Ma, 2010; Ma, 2013). Kõrgenenud ROS-ide taseme korral ei suuda raku antioksidatiivsed süsteemid neid neutraliseerida ning reaktsioonides ROS-idega tekivad biomolekulide kahjustused, mis võivad viia rakkude kasvu pidurdumise, apoptoosi või nekroosini (Ma, 2010; Martindale & Holbrook, 2002). Arvatakse, et ROS-idest põhjustatud kahjustused on seotud organismi vananemise ning mitmete haiguste väljakujunemisega (Balaban *et al.*, 2005). Näiteks võib oksüdatiivne stress soodustada kasvajate teket ning progressiooni, tekitades DNA kahjustusi (Hoeijmakers, 2001; Negrini *et al.*, 2010). ROS-id põhjustavad DNA aluste keemilisi modifikatsioone ning lisaks võivad nende toimetel tekkida DNA üheaahelalised või ka kaheaahelalised katked (Berquist & Wilson, 2012).

### 1.1.1. Oksüdatiivse stressi sensorvalk KEAP1

Oksüdatiivse stressi puhul töötavad raku süsteemid, mis tajuvad ROS-ide poolt tekitatud kahjustusi ning aktiveerivad vajalikke kaitse või reparatsiooniga seotud signaalradu. Näiteks DNA kahjustuse korral aktiveeritakse ATM ja ATR kinaasid. Lisaks on rakkudes mehhanismid, mis käivitavad kaitsevastuse, tajudes otseselt kahjustavaid ROS-e. KEAP1 (ingl *Kelch-like ECH-associated protein 1*) on üks selline sensormolekul, mis oksüdatiivsetele ning ka elektrofiilsetele stressoritele reageerides aitab rakku nende eest kaitsta (Itoh *et al.*, 1999; Wakabayashi *et al.*, 2003). KEAP1 on negatiivne regulaator oksüdatiivse stressi eest kaitsvate valkude ekspressiooni indutseerivale transkriptsioonifaktorile NRF2-le (ingl *NF-E2 related factor 2*) (Itoh *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2009). Stressita rakkudes on NRF2 seotud KEAP1 dimeeriga ning tänu sellele toimub NRF2 poliubikvitineerimine ja edasine proteasoomne lagundamine (Kobayashi *et al.*, 2004). Oksüdatiivse stressi tingimustes on NRF2 lagundamine takistatud, NRF2 saab kuhjuda tuuma ning kiirelt käivitada oma

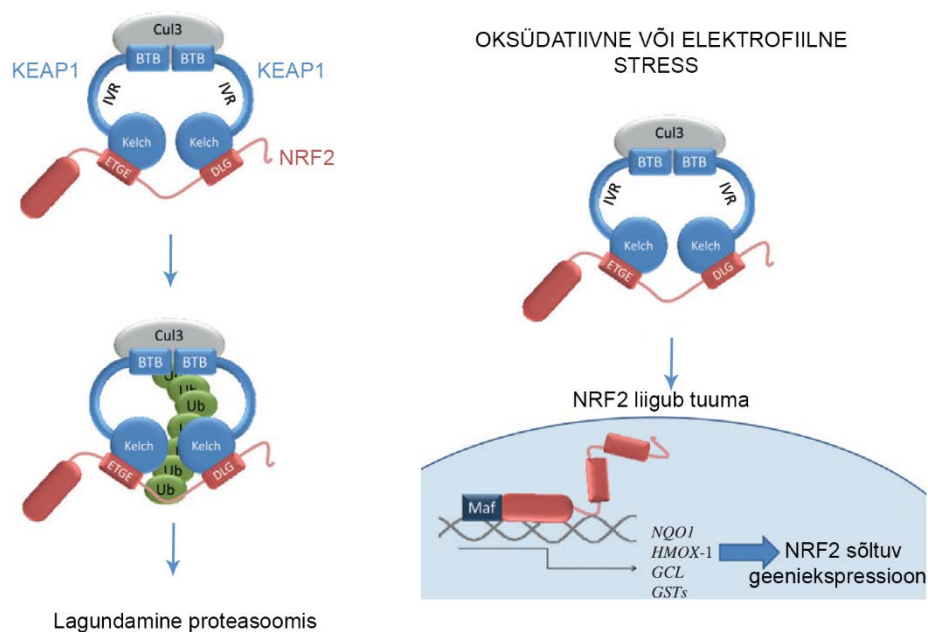
reguleeritavate geenide transkriptsiooni. Koos MAF (ingl *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*) perekonna transkriptsioonifaktoritega käivitab NRF2 nende geenide ekspressiooni, mis kodeerivad antioksidante, oksüdeerivaid ühendeid inaktiveerivaid ensüüme ja kahjulikke aineid väljutavaid membraanivalke. Lisaks stimuleerivad NRF2 poolt indutseeritud geenid NADPH sünteesi ja kahjustunud valkude parandamist (Kensler *et al.*, 2007).

Üks NRF2 molekul seondub KEAP1 homodimeeriga oma N-terminuses olevate ETGE ja DLG motiivide vahendusel (joonis 3). Kuigi ETGE motiivi afiinsus KEAP1-le on tugevam kui DLG motiivi afiinsus, on mõlemaid vaja KEAP1 sõltuvaks ubikvitineerimiseks (Tong *et al.*, 2006). KEAP1 on selles süsteemis spetsiifilisust määrav adaptorvalk, mis interakteerub üheaegselt nii NRF2 kui ubikvitiinligaasi subühiku CUL3-ga ja vahendab ubikvitiinligaasist sõltuvat ubikvitiini polümeeri lisamist NRF2 valgule (Kobayashi *et al.*, 2004). Ubikvitiinligaas on valk, mis koos ubikvitiini aktiveeriva ensüümi ja ubikvitiini konjugeeriva ensüümiga märgistab valke ubikvitiini monomeeridest koosneva ketiga edasiseks proteosoomseks lagundamiseks (Pickart, 2001).

KEAP1 monomeeril on neli eristatavat domeeni: BTB (ingl *Broad complex, Tramtrack and Bric-à-Brac*), IVR (ingl *intervening region*), KELCH/DGR (ingl *double glycine repeat*) ning CTR (ingl *C-terminal region*). BTB domeeni vahendusel tekib KEAP1 dimeer ning KELCH/DGR ja CTR domeenid moodustavad piirkonna, millega seondub NRF2 (Ogura *et al.*, 2010). Elektrofiilsete ja oksüdatiivsete stressorite otseseks märklauaks on IVR domeenis olevad konserveerunud tsüsteiini jäägid, mille modifitseerimisel NRF2-te enam ei lagundata (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Wakabayashi *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2009). Dinkova-Kostova ja kolleegide poolt läbi viidud eksperimendid viitavad sellele, et NRF2 ja KEAP1 interaktsioon on tsükliline. Esmalt seondub KEAP1-ga NRF2 ETGE motiiv ning seejärel DLG motiiv ja ainult mõlema interaktsiooni olemasolul saab toimuda NRF2 ubikvitineerimine (Baird *et al.*, 2014). KEAP1 on ankurdatud aktiini tsütoskeletile (Kang *et al.*, 2004), tänu millele hoiab ta NRF2-te tsütoplasmas ning suunab selle lagundamisele ja inhibeerib tuuma liikumist.

KEAP1 ja NRF2 süsteemi aktiveerivad väga paljud ühendid – näiteks teatud taimedes leiduv sulforafaan, ravim oltipraz, keskkonnast pärit arseen või endogeensed molekulid NO või H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ma, 2013; Fourquet *et al.*, 2010). Endogeensed oksüdeerijad NO ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksüdeerivad KEAP1 ning tekitavad monomeeride siseseid ja vahelisi disulfiidsidemeid (Fourquet *et al.*,

2010). Teised NRF2 indutseerijad modifitseerivad KEAP1 tsüsteini jääke, neid ilmselt oksüdeerides või alküleerides, põhjustades KEAP1 konformatsiooni muutumist ning NRF2 lagundamise peatumist (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002).



**Joonis 3. NRF2 ja KEAP1 süsteem.** NRF2 interakteerub KEAP1 KELCH/DGR piirkonnaga DLG ja ETGE motiivide vahendusel, NRF2 poliubikvitineeritakse ubikvitiinligaasi subühik CUL3 sõltuvalt ning suunatakse proteasoomi lagundamisele. Oksüdatiivse või elektrofiilse stressi tingimustes ei lagundata NRF2-te enam ning see koguneb tuuma ja käivitab oksüdatiivse stressi eest kaitsvate geenide ekspressiooni. Koostatud Kansanen *et al* (2013) ja Baird *et al* (2014) põhjal.

KEAP1 on kriitiline sensor ROS-ide äratundmises ning selle aktiveerimisel on oluline roll rakkude kaitsevõime suurendamisel. KEAP1 raja korrektne funktsioneerimine on vajalik selleks, et rakkude genoomis ei tekiks ROS-ide toimel mutatsioone, mis võiksid soodustada rakkude muutumist kasvajalisteks. Samas on KEAP1 sensorsüsteemi aktivatsioonil ka teine külg. Kui juba kasvajalisteks muutunud rakkudes NRF2 aktivatsiooni võimendada, võib see pakkuda kasvaja rakkudele kaitset kõrgeenenud oksüdatiivse stressi, kemoterapeutiliste ainete ning kiiritusteraapia vastu (Jaramillo & Zhang, 2013). Mitmetes kasvajates on leitud KEAP1, NRF2 või CUL3 mutatsioone ning näiteks 34% lamerakulistes kopsu-kasvajates (ingl *squamous cell carcinoma*) on NRF2 ja KEAP1 sensorsüsteem seetõttu defektne (Hammerman *et al.*, 2012).

### 1.1.2. Replikatiivse DNA helikaasi MCM2-7 subühikud KEAP1 interaktsioonipartneritena

Lisaks NRF2-le on leitud ka teisi KEAP1-ga interakteeruvaid valke, mis omavad ETGE või sellele sarnast domeeni. Näiteks seondub DPP3 (ingl *dipeptidyl-peptidase 3*) valk oma ETGE domeeni vahendusel KEAP1-ga, konkureerides NRF2-ga ja võib seeläbi aktiveerida NRF2 sõltuva transkriptsiooni ilma oksüdatiivse stressita (Hast *et al.*, 2013). Lisaks on avastatud KEAP1 interaktsioonipartner PGAM5 (ingl *phosphoglycerate mutase family member 5*), mis seondub läbi oma ETGE sarnase ESGE motiivi vahendusel ning on stressist sõltuv KEAP1 ubikvitineerimise substraat (Lo & Hannink, 2006).

Afiinsuspuhastamist ja mass-spektromeetriat kasutades on leitud, et KEAP1-ga seondub ETGE domeeni vahendusel ka replikatiivse helikaasi subühik MCM3 (Hast *et al.*, 2013). See interaktsioon leiti ka meie laboris MCM3 interaktsioonipartnereid uurides (Ilves, publitseerimata andmed). Meie laboris läbi viidud biokeemilistes katsetes tuvastati lisaks, et KEAP1-ga seondub ka teine MCM2-7 subühik MCM7. See interaktsioon on nõrgem kui MCM3 puhul, kuna kõrge afiinsusega ETGE motiivi asemel sisaldab MCM7 VSGE motiivi (Ilves, publitseerimata andmed). Nii MCM3 ETGE kui MCM7 VSGE motiivid paiknevad heeliks-2 insert (H2I) struktuurielemendis, mis on MCM-ides funktsionaalselt oluline ja konserveerunud (Jenkinson & Chong, 2006). Arhede MCM valkude uurimisel on selgunud, et H2I on oluline helikaasi aktiivsuseks (Jenkinson & Chong, 2006; Bell & Botchan, 2013).

KEAP1 interaktsioon MCM2-7 subühikute MCM3 ja MCM7-ga viitab võimalusele, et KEAP1 osaleb MCM2-7 helikaasikompleksi regulatsioonis oksüdatiivse stressi tingimustes, kus DNA replikatsiooni initsieerimine võiks viia kahjustunud DNA replikatsioonini. MCM3 ning MCM7 oleksid head kandidaadid MCM2-7 helikaasikompleksi regulatsiooni sihtmärkidena. Nagu eelnevates peatükkides kirjeldatud, on MCM3 taseme kaudu võimalik kontrollida kogu kromatiinile laetud MCM2-7 kompleksi taset (Chuang *et al.*, 2012) ning lisaks on MCM3-l roll MCM2-7 kompleksi transpordi ja rakulise lokaliseerimise regulatsioonis (Kimura *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1997; Takei & Tsujimoto, 1998; Liku *et al.*, 2005; Chuang *et al.*, 2012). MCM7 puhul on aga teada tema seondumine mitmete teiste DNA kahjustuse käigus aktiveeritavate valkudega (Bochman *et al.*, 2008) ning selle ubikvitineerimine omab rolli replikatsiooni terminatsiooniprotsessis (Maric *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2014).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Käesolev uurimistöö on osa projektist, kus uuritakse, kas ja kuidas on KEAP1 interaktsioon replikatiivse helikaasi subühikute MCM3 ning MCM7-ga seotud genoomi replikatsiooni regulatsiooniga oksüdatiivse stressi tingimustes. Nimetatud interaktsioonide funktsioon ning nendega seotud molekulaarsed rajad rakus on seni kirjeldamata. KEAP1 ja oksüdatiivse stressi rolli uurimiseks replikatsiooni regulatsioonis vaadeldi käesoleva magistritöö eksperimentaalses osas täpsemalt

- kas replikatiivse helikaasi subühikute MCM3 ja MCM7 lokaliseerimine ning tase rakus muutub oksüdatiivse stressi tingimustes
- kas MCM3 ja MCM7 interaktsioon KEAP1-ga muutub oksüdatiivse stressi tingimustes.

### 2.2. Materjalid ja meetodika

#### 2.2.1. Rakkude kasvatamine koekultuuris ja töötlus vesinikperoksiidiga

Töös kasutati inimese eesnahast eraldatud primaarseid epidermaalseid keratinotsüüte (ingl *human primary epidermal keratinocytes*, HPEK, CELLnTEC, Šveits), mida kasvatati 10 ml-s Cnt-57.S söötmes (CELLnTEC) 100 mm diameetriga koekultuuri tassidel 5% CO<sub>2</sub> sisaldusega ning veeauruga küllastatud inkubaatoris temperatuuril 37° C. Söödet vahetati iga 2 või 3 päeva tagant. Rakke passeeriti edasi 70% - 80% konfluentsuse saavutamisel, katsetes kasutatud rakkude passaaži arv jäi 5-8 vahele. Rakke passeeriti tootja protokollide järgides ja rakkude eemaldamiseks koekultuuri tassi pinnalt kasutati Accutase lahust (CELLnTEC). Uuele koekultuuri tassile kanti 300 tuhat kuni 1 miljon rakku vastavalt vajadusele. Rakkude lugemiseks kasutati Countess masinat ja vastavaid rakulugemis kambreid (Thermo Fisher Scientific, Ameerika Ühendriigid) ning trüpaansinist (Thermo Fisher Scientific) elusate rakkude eristamiseks. Katsete läbiviimiseks passeeriti rakud 100 mm või 60 mm diameetriga koekultuuri tassidele või 24-auguga plaatidele. 60 mm diameetriga tassidel kasutati rakkude kasvatamisel 5 ml söödet ja 24-auguga plaadi ühes augus 0,5 ml söödet.

Rakkudes oksüdatiivse stressi esile kutsumiseks, kasutati 30% vesinikperoksiidi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) lahust (Sigma-Aldrich, Ameerika Ühendriigid), millest valmistati vahetult enne söötmele lisamist 10 mM lahendus PBS-is (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH

7,4). Valmistatud 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lahjendust lisati söötmele nii, et lõppkontsentratsioon oleks 5 µM, 120 µM, 300 µM või 1000 µM. Tassidele, kuhu 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lahust lisati vähem või ei lisatudki, viidi söötmele lisatava vedeliku kogumaht teiste tassidega võrdseks, lisades puudujääva ruumala PBS-i.

### 2.2.2. Rakkude fraktsioneerimine

Rakkude fraktsioneerimisel kasutati kahte protokollit. Esimene neist eraldab rakud lahustuvaks (S) ning sadestunud (ingl *pellet*, P) fraktsiooniks, kus P fraktsioon on rikastatud kromatiiniga (Symeonidou *et al.*, 2013). Kaks päeva enne rakkude kogumist passeeriti ühele 60 mm tassile 0,7 miljonit rakku. 14 h, 4 h, 1 h või 30 minutit enne rakkude kogumist lisati söötmele 5 µM, 120 µM, 300 µM või 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lõppkontsentratsiooni saamiseks 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lahust PBS-is. Rakkude kogumisel eemaldati esmalt sööde, misjärel rakud koguti PBS-is kummikaabitsaga. Rakud tsentrifugiti (Eppendorf Centrifuge 5415R, edasised tsentrifuugi etapid sama masinaga) toatemperatuuril 5 min 200 g juures põhja ja eemaldati supernatant. Rakud suspendeeriti 150 µl jääkülmas CSK (ingl *cytoskeleton*)-Triton puhvril (10mM HEPES, 100mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 300mM sahharoos, 0,1% Triton X-100, 10 mM β-glütserofosfaat, 10mM NaF, pH 7,9) ning vahetult enne kasutamist lisati proteaasi inhibiitorid lõppkontsentratsiooniga 1x Roche ja 10 mM PMSF (ingl *phenylmethanesulfonylfluoride*). Proove inkubeeriti 15 min jääl ja tsentrifugiti seejärel 15 min temperatuuril 4° C 16 000 g juures. 100 µl supernatanti, mis on lahustuv fraktsioon, kanti puhtasse tuubi, misjärel lisati sinna 20 µl 6x Laemmli puhvrit (60% glütserool, 300 mM TrisHCl pH 6,8, 864 mM β-merkaptotetanool, 12% SDS, 0,1% broomfenoolsinine, 12 mM EDTA pH 8,0). Sademelt eemaldati ülejäänud supernatant, misjärel sadet pesti 200 µl CSK-Triton puhvriga, tsentrifugides 15 min temperatuuril 4° C 16 000 g juures. Pestud sade suspendeeriti 30 µl 2x Laemmli puhvril ja saadi kromatiiniga rikastatud sadestunud fraktsioon (P). Valkude denatureerimiseks inkubeeriti Laemmli puhvriga proove 100° C juures 5 min ning seejärel kasutati edasises *Western blot* analüüsis. Katset korrati kahel sõltumatul korral.

Lisaks kasutati töös Thermo Scientific rakkude fraktsioneerimise protokollit ja reagente (*Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells*). Protokollit alusel eraldati rakud järgmisteks fraktsioonideks: tsütoplasmaatiline ekstrakt (CPE), membraanne ekstrakt (ME), lahustuv tuuma ekstrakt (SNE), kromatiiniga seotud tuuma ekstrakt (ChBNe) ning tsütoskeleti ekstrakt (CySk). Katseks kasvatati rakke 100 mm tassidel 70% konfluentsuseni ning 8 h, 4 h või 1 h enne kogumist lisati rakkudele 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lahust 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

lõppkontsentratsiooni saamiseks. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indutseeritud efektide pööratavuse kontrollimiseks lisati 50% konfluentsusega rakkudele 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lahust 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lõppkontsentratsiooni saamiseks, rakke inkubeeriti 6 h ja vahetati sööde. Rakud koguti kas kohe või 24 h, 48 h ja 72 h peale peale 6 h H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubatsiooni lõppu. Pööratavuse katsel loeti rakke enne fraktsioneerimist materjali hulga ühtlustamiseks. Rakkude kogumiseks pesti rakud PBS-is ning töödeldi koekultuuri tassilt eemaldamiseks trüpsiin-EDTA (0,05%/0,02%) lahusega, mis inhibeeriti veise loote seerumi 10% lahusega PBS-is. Rakke tsentrifugeeriti 5 min toatemperatuuril 200 g juures, supernatant eemaldati ja rakkudele lisati PBS. Seejärel tsentrifugeeriti rakke taas 5 min toatemperatuuril 200 g juures ja PBS eemaldati. Edasine rakkude fraktsioneerimine viidi läbi tootja protokollil alusel. Kõiki eraldatud fraktsioone säilitati jääl kuni 6xSDS Laemmli puhvri lisamiseni. 300 µl ruumalaga fraktsioonidele lisati 60 µl 6xSDS Laemmli puhvrit ja 150 µl ruumalaga fraktsioonidele 30 µl 6xSDS Laemmli puhvrit. Proove inkubeeriti valkude denatureerimiseks temperatuuril 100°C 5 min ning kasutati edasi *Western blot* analüüsiks. 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0 h, 1 h, 4 h ja 8 h töötusega on katset korratud 1 korra, kuid lisaks on tulemusi kinnitatud 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0 h ja 6 h töötusega kahel katsel (andmeid ei ole töös esitatud). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indutseeritud efektide pööratavuse kontrollimise katset on läbi viidud üks kord.

### 2.2.3. SiRNA transfektsioon

SiRNA (ingl *small interfering RNA*) transfektsioonideks passeeriti kolm päeva enne transfektsiooni 24 auguga plaadile 20 tuhat rakku ühe augu kohta. Transfektsiooniks kasutati siPORT NeoFX transfektsioonireagenti (Thermo Fisher Scientific) ja Silencer Select siRNA-sid (Thermo Fisher Scientific). KEAP1 ekspressiooni võrreldi kolme Silencer Select KEAP1 siRNA (s18981, s18982, s18983, edaspidi KEAP1 siRNA I, II ja III), negatiivse kontrolli siRNA-ga (Silencer Select *Negative Control*) töödeldud ja siRNA-ga töötlemata rakkude vahel. Transfektsioon viidi läbi tootja protokollil alusel, kuid rakke ei transfekteeeritud passeerimisega samal ajal, vaid transfektsioonisegu lisati juba kinnitunud rakkudele. Rakke inkubeeriti koos transfektsioonikompleksidega 24 tundi 5% CO<sub>2</sub> sisaldusega ning veeauruga küllastatud inkubaatoris temperatuuril 37° C ning seejärel vahetati sööde. 80 tundi peale transfektsiooni rakud koguti. Selleks pesti neid PBS-iga ja eemaldati tassi põhjast 30 µl 2xSDS Laemmli puhvris kummikaabitsaga. Lüsate inkubeeriti 10 min 100°C juures ja analüüsiti *Western blot*-il. Katse viidi läbi kahes paralleelkatses.

Lisaks analüüsiti siRNA-ga transfekteeritud rakke ka PLA (ingl *proximity ligation assay*) meetodil. Sellel juhul jäi transfektsiooniprotokoll samaks, kuid transfekteeriti 12 mm katteklaasile kinnitunud rakke ja rakkude kogumise asemel rakud fikseeriti (vt „PLA analüüs“). Enne fikseerimist inkubeeriti rakke 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  juures 6 tundi. PLA analüüsiks valmistati rakud ette nagu on kirjeldatud peatükis „PLA analüüs“. PLA katsetes transfekteeriti rakke KEAP1 siRNA I-ga ja võrreldi transfekteerimata rakkudega, katset viidi läbi ühe korra.

#### **2.2.4. Western blot analüüs**

*Western blot* analüüsi kasutati fraktsioneeritud proovide ja siRNA transfektsiooni katse rakulüsaatides olevate valkude uurimiseks. Esmalt lahutati proovid SDS-poliakrüülamiidgeelis (Green & Sambrook, 2012). Kaspaas-3, dimetüül-histoon-3 ja H2A.X uurimiseks kasutati 15% geeli ja ülejäänud valkude uurimiseks 10% geeli. Valkude elektroforeesil lahutamiseks kasutati Mini-PROTEAN Tetra Cell masinat (Bio-Rad, Ameerika Ühendriigid) ning 1x SDS jooksupuhvrit (0,125 M Tris, 0,9M glütsiin, 0,5% SDS). S ja P fraktsioonide analüüsil laeti geelile S fraktsiooni 10  $\mu\text{l}$  ja P fraktsiooni 5  $\mu\text{l}$ . CPE, SNE, ME, ChBNe ja CySk fraktsioonide analüüsil laeti geelile kõiki fraktsioone 10  $\mu\text{l}$ . SiRNA katse rakulüsaatide analüüsil laeti geelile 10  $\mu\text{l}$  rakulüsaati. Valkude molekulmassi hindamiseks laeti geelile lisaks proovidele 5  $\mu\text{l}$  *Pageruler Prestained* suurusmarkerit (Thermo Fisher Scientific). SDS-poliakrüülamiidgeelil lahutatud proovid kanti üle metanoolis aktiveeritud Immobilon-P PVDF (polüvinüülideenfluoriid) membraanile (Millipore, Ameerika Ühendriigid) Bio-Rad'i TransBlot SD ülekandemasinas, kasutades poolkuiva ülekande puhvrit (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% etanool). Ülekanne toimus 45 min - 1h 12V juures. Kui valgud olid membraanile kantud, blokeeriti membraani 5% lõssilahuses (5% lõssipulber, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) loksutil 1 tund toatemperatuuril. Seejärel lisati membraanile primaarne antikeha 2% lõssilahuses ning inkubeeriti 1-3 h toatemperatuuril või üleöö 4° C juures loksutil. Kasutatud primaarsete antikehade kontsentratsioonid, lahjendused ja tootjad on toodud tabelis 1. Pärast primaarse antikeha inkubatsiooni pesti membraani vähemalt kolm korda 10 minutit *Western blot* pesulahuses (50 mM TrisHCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20). Peale pesu inkubeeriti membraani 1 tund toatemperatuuril 2% lõssi lahuses loksutil sekundaarse antikehaga lahjendusega 1:10 000. Vastavalt primaarsele antikehale valiti küülikus toodetud kitse, kitses toodetud hiire või kitses toodetud küüliku primaarse antikeha vastane sekundaarne IgG antikeha (LabAS, Eesti). Pärast sekundaarse antikeha inkubatsiooni pesti membraani vähemalt kolm korda 10 min *Western blot* pesulahuses. Signaali detekteerimiseks

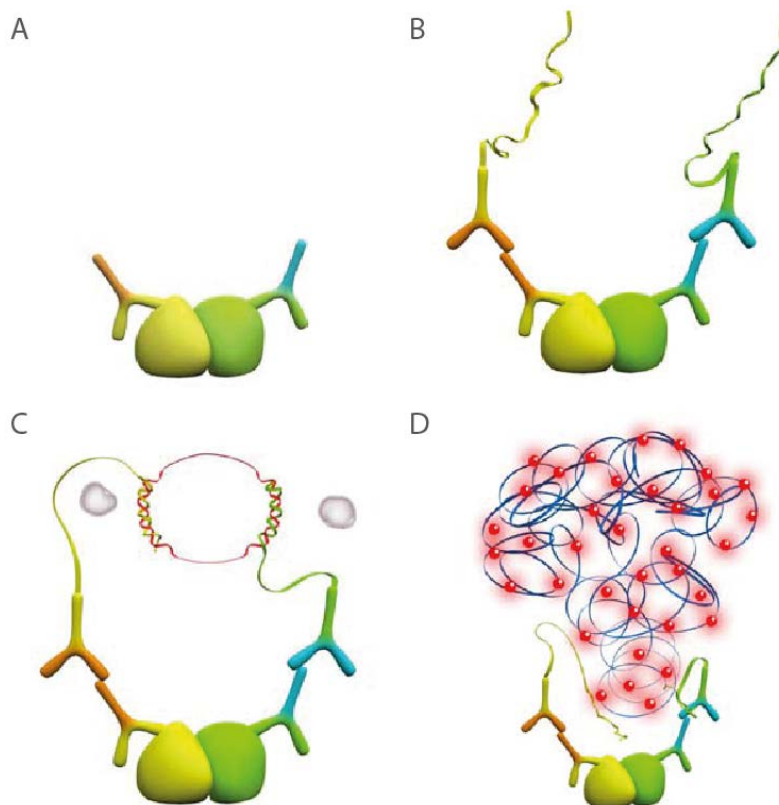
kasutati Amersham ECL (GE Healthcare, Suurbritannia) või Femto Super Signal (Thermo Fisher Scientific) ilmutusreagente ning membraani eksponeeriti seejärel röntgenfilmile (AGFA Healthcare, Belgia). Filmid skaneeriti ja töödeldi Adobe Photoshop-is ja Adobe Illustrator tarkvara abil (Adobe Systems, Ameerika Ühendriigid).

**Tabel 1. Western blot meetodil kasutatud primaarsed antikehad ja nende lahjendused**

Antikeha (tootekood)	Tootja	Lahjendus
anti-MCM3 (sc-9850), kitse polükloonaalne IgG	Santa Cruz Biotechnology, Ameerika Ühendriigid	1:200
anti-MCM6 (sc-9843), kitse polükloonaalne IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:200
anti-MCM7 (sc-374403), hiire monokloonaalne IgG <sub>2a</sub>	Santa Cruz Biotechnology	1:200
anti-NRF2 (sc-722), küüliku polükloonaalne IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:200
anti-KEAP1 (sc-365626), hiire monokloonaalne IgG <sub>2b</sub>	Santa Cruz Biotechnology	1:200
anti-aktiin (sc1616), kitse polükloonaalne IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:500
anti-kaspaas-3 (ab-13847), küüliku polükloonaalne IgG	Abcam, Suurbritannia	1:1000
anti-dimetüül-histoon 3 (07-030), küüliku polükloonaalne IgG	Millipore	1:2000
Anti- $\gamma$ -H2A.X (ab-22551), hiire monokloonaalne IgG <sub>1</sub>	Abcam	1:1000

### 2.2.5. PLA analüüs

Töös kasutati valkude vaheliste interaktsioonide uurimiseks läheduse tuvastamise testi (ingl *proximity ligation assay*, PLA). Selle meetodiga on võimalik tuvastada molekulide vahelist lähedust fluorestseeruva signaaliga, kui molekulid asuvad lähemal kui 40 nm. Esmalt töödeldakse rakke interaktsioonipartneritele spetsiifiliste eri loomaliikides toodetud primaarsete antikehadega (joonis 4A). Seejärel lisatakse kummagi primaarse antikeha spetsiifilised PLA sekundaarsed antikehad, millest üks on konjugeeritud PLUS ja teine MINUS oligonukleotiidiga (joonis 4B). Kui sekundaarsed antikehad asuvad piisavalt lähedal, hübridiseeruvad sekundaarsete antikehade oligonukleotiidid koos ühendavate oligonukleotiididega (joonis 4C, punased oligonukleotiidid) tsirkulaarseks DNA-ks ning DNA ligaas ligeerib ühendavate oligonukleotiidide ahelad (joonis 4C). Osa ligeeritud tsirkulaarsest DNA-st on kaheaahelaline ja osa üheaahelaline. Kaheaahelaline osa on järgnevalt lisatavale polümeraasile praimeriks ning DNA-d paljundatakse veereva ratta amplifikatsioonil. Kahe molekuli vahelist interaktsiooni või lähedust detekteeritakse amplifitseeritud DNA-le kinnituvate oligonukleotiidide abil, mis on fluorestseeruva molekuliga konjugeeritud ja mille signaali saab detekteerida ja kvantifitseerida (joonis 4D) (Söderberg *et al.*, 2006; Fredriksson *et al.*, 2002).



**Joonis 4. Läheduse tuvastamise meetod.** Interaktsioonipartneritele seonduvad eri liikidest pärit primaarsed antikehad (A). Seejärel seovad PLA sekundaarsed antikehad vastavaid primaarseid antikehi (B). Kui kaks sekundaarset antikeha on piisavalt lähestikku ligeeritakse nende küljes olevad oligonukleotiidid ühendava oligonukleotiidiga (punane) kokku (C). Järgmises etapis sünteesib DNA polümeraas tsirkulaarse matriitsi põhjal DNA-d ning sellega seonduvad fluorestseeruva molekuliga konjugeeritud oligonukleotiidid (D). Pildid on pärit tootja protokollist.

PLA analüüsiks passeeriti kas päev enne fikseerimist 100 tuhat rakku või kaks päeva enne 60 – 70 tuhat rakku 24 auguga plaadi aukude põhjas olevatele katteklasidele. KEAP1 siRNA efekti uurimiseks passeeriti 20 tuhat rakku 5 päeva enne fikseerimist. KEAP1 siRNA transfektsiooni viidi läbi nagu on kirjeldatud peatükis „SiRNA transfektsioon“. 6 h enne rakkude fikseerimist lisati osadele rakkudele 120 µM, 300 µM või 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lõppkontsentratsiooni saamiseks 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lahust PBS-is. Seejärel pesti katteklasil olevad rakud PBS-iga ja fikseeriti 20 min 4% PFA-ga toatemperatuuril. Edasi pesti rakke kolm korda PBS-iga 5 min kaupa loksutil ja permeabiliseeriti 0,1% Triton-X-100 lahusega PBS-is 5 min. Edasine ettevalmistus PLA analüüsiks viidi läbi tootja protokollil alusel (Duolink® In Situ Orange Starter Kit Mouse/Rabbit, Sigma Aldrich). Negatiivse kontrolli puhul jäeti primaarsete antikehadega inkubatsioon vahele. Töös kasutati valkude läheduse tuvastamiseks ühe valgu kitses ja teise hiires toodetud antikehasid ning vastavaid PLA sekundaarseid antikehasid. Katsetes kasutatud primaarsete antikehade kohta on informatsioon toodud tabelis 2. Alexa Fluor-488 falloidiini (Thermo Fisher Scientific) kasutati tootja protokollil järgi. 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mõju MCM3 ja KEAP1 interaktsioonile uuriti kahes paralleelkatses. Lisaks uuriti 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mõju MCM3 ja KEAP1 interaktsioonile ka eraldi KEAP1 siRNA efekti uurimise katses, mis viidi läbi ühe korra. 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mõju KEAP1 interaktsioonile või lähedusele MCM7, MCM6, MCM2 või GINS1-ga uuriti ühe korra. 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mõju uurimise katse KEAP1 ja MCM3 interaktsioonile viidi läbi kahes paralleelkatses ja 120 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mõju uurimine ühes.

**Tabel 2. PLA meetodil kasutatud primaarsed antikehad ja nende lahjendused**

Antikeha (tootekood)	Tootja	Lahjendus
anti-MCM3 (sc-9850), kitse polüklooraalne IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:50
anti-MCM6 (sc-9843), kitse	Santa Cruz Biotechnology	1:50

polükloonaalne IgG		
anti-MCM7 (sc-374403), hiire monokloonaalne IgG <sub>2a</sub>	Santa Cruz Biotechnology	1:50
anti-MCM2 (sc-9839), kitse polükloonaalne IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:50
anti-GINS1 (sc-85853), kitse polükloonaalne IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:50
anti-KEAP1 (sc-365626), hiire monokloonaalne IgG <sub>2b</sub>	Santa Cruz Biotechnology	1:50
anti-KEAP1 (sc-15246), kitse polükloonaalne IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:50

Proove analüüsiti Zeiss LSM 710 konfokaalmikroskoobiga (Zeiss, Saksamaa). Iga proovi kohta valiti 4-6 vaatevälja ja jäädvustati nendest 7-14 xy-tasandi kihti piki z-telge. Jäädvustamist alustati tasandist, kus PLA signaalid hakkasid kaduma ning lõpetati teisel pool fokaaltasapinda, kui PLA signaalid hakkasid taas kaduma. Pilte analüüsiti ImageJ programmis (*National Institutes of Health, Ameerika Ühendriigid*), kus liideti kokku kõik kihid, loeti signaalide arv tuumas ja tuumast väljas olevas alas ning leiti vaatevälja kohta keskmine. Kuna näidati, et signaalid jäid rakkude sisse, siis arvestati tuumast väljas paiknevaid signaale tsütoplasmas olevaks. Erinevate proovide PLA signaalide arvu võrdlev statistiline analüüs tehti statistilise andmetöötluse programmiga R (*The R Foundation*). Andmete jaotumist vastavalt normaaljaotusele kontrolliti Shapiro-Wilk testiga ja normaaljaotuste omavahelist varieeruvust kontrolliti F-testiga. Keskväärtuste erinevust võrreldi mittepaariviisilise t-testiga. Kui tegu ei olnud normaaljaotusega, siis võrreldi populatsioonide keskväärtusi Wilcox testiga. Statistiliselt usaldusväärseks arvati tulemus, mille p-väärtus jäi alla 0,05. MCM3 ja KEAP1 interaktsiooni uurimisel koos KEAP1 siRNA-ga arvati erinevus statistiliselt oluliseks kui p väärtus oli Bonferroni'i korrigeeritud arvestades alla 0,025. Seda seetõttu, et KEAP1 ja MCM3 interaktsioonide hulga erinevust 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga testiti nii töötlemata kui siRNA ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töödeldud populatsiooni vastu. PLA signaalide keskmist hulka tuumas ja tsütoplasmas visualiseerivad graafikud koos standardvigadega koostati Microsoft Exceli tarkvaraga.

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. MCM-ide lokaliseerimine primaarsetes keratinotsüütides muutub H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toimel

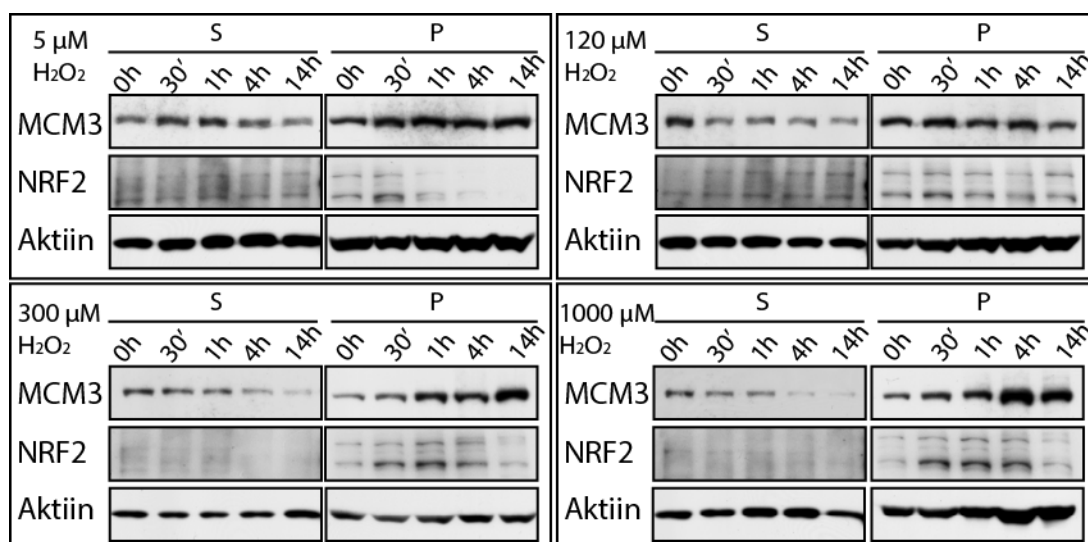
Hindamaks, kas oksüdatiivne stress mõjutab replikatiivse helikaasi kompleksi MCM2-7 regulatsiooni, uuriti esmalt kompleksi subühiku, MCM3-e lokaliseerimist ja taset rakus. Selleks kasutati inimese primaarseid epiteelirakke (HPEK). Oksüdatiivse stressi indutseerijana kasutati vesinikperoksiidi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sest tegu on endogeenselt toodetava molekuliga, mis on stabiilne ning difundeerub kergesti läbi membraanide (Chance *et al.*, 1979). Lisaks aktiveerib H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kui oksüdatiivse stressi indutseerija, MCM3 interaktsioonipartneri KEAP1-e (Fourquet *et al.*, 2010)

Leidmaks sobivat oksüdatiivse stressi taset testiti nelja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsiooni erinevate mõjuajadega MCM3 lokaliseerimist ja taseme muutuse suhtes. Kasutati H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsioone 5 µM, 120 µM, 300 µM või 1000 µM ning mõjuaja 30 minutit, 1 h, 4 h või 14 h. Nimetatud kontsentratsioonidel on varasemalt kirjeldatud vastavalt rakkude kasvu stimuleeriv, ajutist kasvu peatumist esile kutsuv, püsivat kasvu peatumist esile kutsuv või apoptootilist raku suremist põhjustav efekt (Wiese *et al.*, 1995). Kuna MCM3 täidab oma funktsiooni kromatiinil uuriti esmalt, kas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-l on mõju MCM3 lokaliseerimisele. Selleks uuriti lahustuvat (S) ning kromatiiniga rikastatud sademe (P) fraktsiooni (Symeonidou *et al.*, 2013). KEAP1 on oksüdatiivse stressi sensor, mis H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toimel muudab oma konformatsiooni ning käivitab NRF2 kaudu rakku kaitsvate valkude sünteesi (Fourquet *et al.*, 2010). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toimet HPEK rakkudele KEAP1 vahendusel kinnitab NRF2 taseme tõus sadenenud valkude fraktsioonis 300 ja 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötuste korral (joonis 5). MCM2-7 helikaasi subühiku MCM3-e tase väheneb 300 ja 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötuste korral alates 1 h mõjuajast lahustavas fraktsioonis ning koguneb samal ajal sadenenud valkude fraktsiooni (joonis 5). Kusjuures 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puhul suureneb MCM3 tase sademe fraktsioonis kiiremini ning 4 h pärast on saavutatud maksimaalne tase. 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötusel on kõige rohkem MCM3-e sademe fraktsioonis 14 h pärast (joonis 5). Seega põhjustab 300 ja 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poolt tekitatud oksüdatiivne stress muutuse MCM2-7 subühiku, MCM3-e lokaliseerimises.

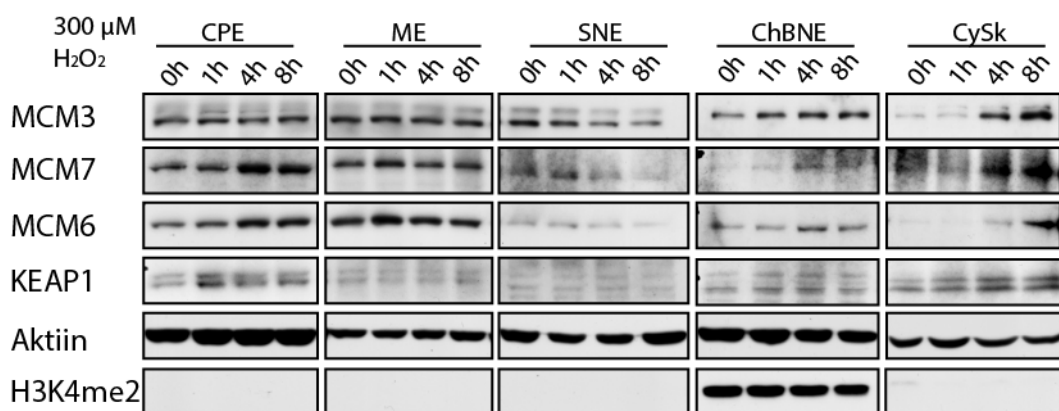
MCM3 kogunemist kromatiinile vastusena oksüdatiivsele stressile pole varem kirjeldatud. Seega vajas uurimist, millisele rakustruktuurile MCM3 täpsemalt koguneb. Selleks kasutati Thermo Scientific'u poolt välja töötatud rakkude fraktsioneerimise protokoll (Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells), mis eraldab rakud järgmisteks fraktsioonideks: tsütoplasmaatiline ekstrakt (CPE), membraane ekstrakt (ME), lahustuv tuuma ekstrakt (SNE),

kromatiiniga seotud tuuma ekstrakt (ChBNe) ning tsütoskeleti ekstrakt (CySk). Kuna 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kontsentratsioonil on varasemalt rakkudele kirjeldatud apoptootiline mõju (Wiese *et al.*, 1995), kasutati MCM3 lokalisatsiooni muutvatest kontsentratsioonidest ainult 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kontsentratsiooni, et vältida liiga tugeva oksüdatiivse stressiga kaasnevaid lisaefekte. Ajapunktidest jäeti ära 30 min, kuna MCM3 lokalisatsioon muutus alates 1 tunnist. Lisaks asendati 14 h ajapunkt 8 h-ga, sest visuaalsel vaatlusel muutus rakkude morfoloogia 14 h puhul apoptootiliselt kahjustunud rakkudega sarnaseks (tulemusi pole esitatud). Fraktsioonide analüüsil selgus, et MCM3 koguneb  $\text{H}_2\text{O}_2$  indutseeritud stressiga tegelikult mitte kromatiinile, vaid tsütoskeleti (CySk) fraktsiooni ning paralleelselt langeb MCM3 tase tuuma lahustuvas (SNE) fraktsioonis (joonis 6). Kromatiiniga seotud valkude (ChBNe) fraktsioonis MCM3 tase ei muutu. Sarnaselt MCM3-le käituvad ka teised MCM2-7 subühiku valgud MCM7 ja MCM6 (joonis 6). Oksüdatiivse stressi sensorvalgu KEAP1 tase tsütoplasmas (CPE) suureneb veidi 1 h  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubatsiooni järel ning 4 h ja 8 h pärast suureneb tase tsütoskeletil (joonis 6). Kinnitamaks, et tsütoskeleti ekstrakt ei sisalda kromatiini ning MCM3 liigub just tsütoskeleti fraktsiooni, kasutati kontrollina dimetüül-histoon-3 antikeha, mis andis detekteeritava bändi ainult kromatiiniga seotud tuuma fraktsioonis (joonis 6).

Kui MCM3 tsütoskeletile (CySk) kogunemine on väga selgelt näha, siis tuuma lahustuvate valkude fraktsioonist (SNE) MCM3 taseme langus nii selge ei ole. Üks põhjustest võib olla see, et osades rakkudes ei muutu MCM3 lokalisatsioon uuritud ajaskaalas. Tsütoskeletil, kus ilma stressita MCM-id peaaegu üldse ei lokaliseeru, on kogu rakupopulatsiooni koos fraktsioneerimisel taseme muutus märgatavam kui tuuma lahustuvas fraktsioonis. Seega, et kinnitada fraktsioneerimise katsetel saadud tulemusi ning uurida, kas kõik rakud vastavad oksüdatiivsele stressile ühtemoodi, analüüsiti MCM3 lokalisatsiooni muutust ka fluorestsentsmikroskoopiaga. Võrreldes töötlemata rakke  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga töödeldud rakkudega on näha, et 6 h 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  mõjutuse puhul on rakkude hulk, kus MCM3 on tugevalt tuumas ekspresseeritud väiksem (Lisa 1, joonis 1A ja 1B). Efekt tugevneb veelgi 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga (Lisa 1, joonis 1A ja 1B). Seega fluorestsentsmikroskoopiaga saadud tulemused kinnitavad fraktsioneerimisel saadud tulemusi ning selle põhjal langeb rakkudes MCM3 tase tuumas ning suureneb tuumast väljas. Samas mitte kõik rakud ei vasta  $\text{H}_2\text{O}_2$ -le korruga ning rakud, kus MCM3 ei kao uuritud ajaskaalas tuumast, võivad kogu rakupopulatsiooni fraktsioneerimisel muuta lahustuvast tuuma fraktsioonist MCM3 taseme languse vähem märgatavaks.



**Joonis 5. MCM3 tase suureneb 300 ja 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  toimet sadenenud valkude fraktsioonis.** Lahustuva (S) ja sadenenud (P) fraktsioonide *Western blot* analüüs MCM3, NRF2 ja aktiini vastaste antikehadega. Analüüsiti 5, 120, 300 ja 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kontsentratsioonidega 30 minutit, 1 h, 4 h ja 14 h töödeldud rakkude fraktsioone ning hinnati MCM3 ja NRF2 tasemete dünaamikat võrreldes töötlemata rakkudega. NRF2 on detekteeritav mitme bändina (~95–110 kDa) (Lau *et al.*, 2013). Aktiini *Western blot* on materjali hulga kontrolliks. S ja P fraktsioonide pildid on tehtud erineva säriajaga. Tulemused kordusid kahe katse *Western blot*'idel.

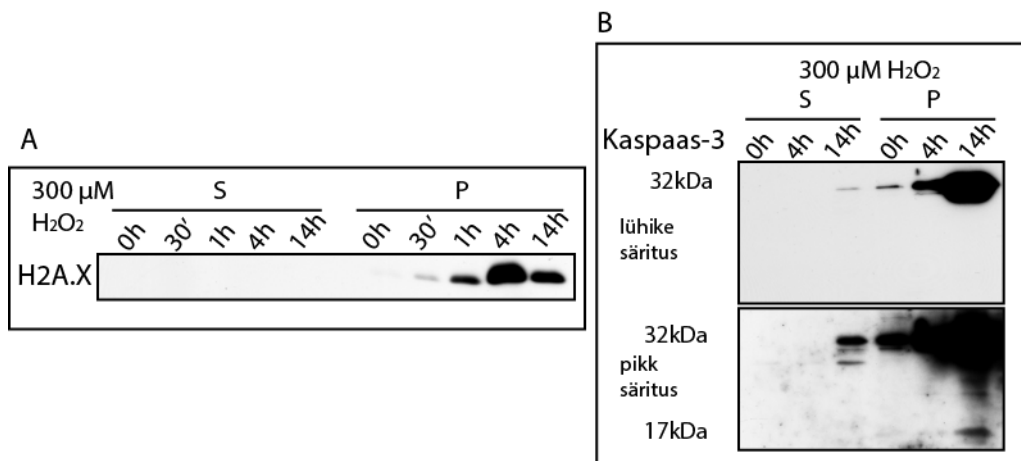


**Joonis 6. MCM3 koguneb 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  toimet tsütoskeleti fraktsiooni ning tase langeb tuuma lahustuvas fraktsioonis.** Tsütoplasmaatilise (CPE), membraani (ME), lahustuva tuuma (SNE), kromatiiniga seotud tuuma (ChBNe) ning tsütoskeleti (CySk) fraktsioonide *Western blot* analüüs MCM3, MCM7, MCM6, KEAP1, NRF2, aktiini ja dimetüleeritud histoon3 (H3K4me2) vastaste antikehadega. Analüüsiti 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kontsentratsiooniga 1 h, 4 h ja 8 h töödeldud rakkude fraktsioone ning hinnati MCM3, MCM7, MCM6, KEAP1 ja NRF2 tasemete dünaamikat võrreldes töötlemata rakkudega. KEAP1 ülemine bänd peaks esindama tema redutseeritud vormi ning alumine intramolekulaarse disulfiidsidemega vormi (Hourihan *et al.*, 2013; Fourquet *et al.*, 2010). Aktiini *Western blot* on materjali hulga kontrolliks ning H3K4me2 *Western blot* fraktsioneerimise kontrolliks. Erinevate fraktsioonide pildid on tehtud erineva säriajaga.

### 2.3.2. 300 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ tekitab primaarsetes keratinotsüütides DNA kahjustusi, aga mitte apoptoosi

$\text{H}_2\text{O}_2$  tekib pidevalt normaalse metabolismi käigus, kuid teatud tingimustel võib  $\text{H}_2\text{O}_2$  ületada rakus normaalse taseme ning tekitada DNA-le kahjustusi.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ohtlik mõju rakkudele ning DNA-le tuleneb peamiselt Fentoni reaktsiooni käigus toimuvast konversioonist hüdroksüülradikaaliks, mis reageerib kiirelt biomolekulidega (Henle & Linn, 1997; Mello Filho *et al.*, 1984). Seetõttu uuriti, kas 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga, kus MCM3 liikus sadenenud valkude ja tsütoskeleti fraktsioonidesse, kaasnevad genoomse DNA kahjustused. DNA kahjustuse tekkimise indikaatoriks kasutati histooni H2A fosforüleeritud vormi  $\gamma\text{-H2A.X}$ , mis tekib DNA kaheaahelaliste katkete korral (Katsube *et al.*, 2014). Käesolevas töös leiti, et 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  toimel suureneb  $\gamma\text{-H2A.X}$  tase kromatiiniga rikastatud sadenenud valkude fraktsioonis (joonis 7A), mis näitab, et sellise  $\text{H}_2\text{O}_2$  kontsentratsiooniga kaasnevad DNA kahjustused rakus.

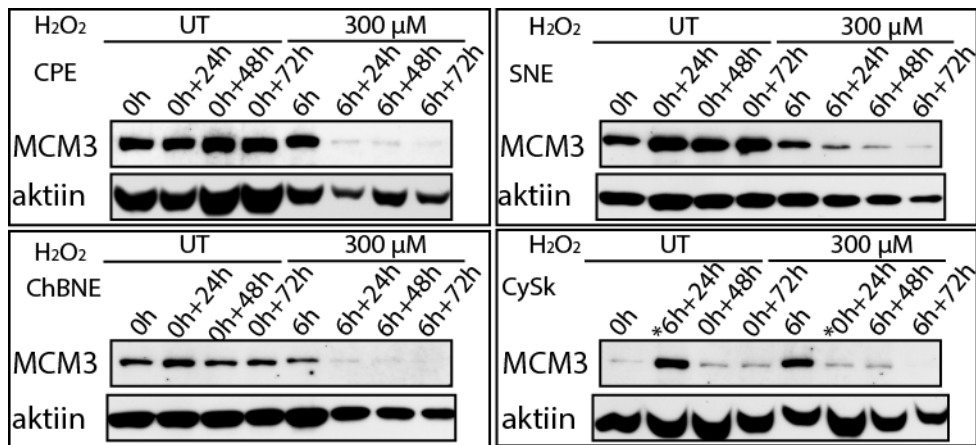
Varasemate andmete põhjal ei tohiks 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kontsentratsioon apoptoosi tekitada (Wiese *et al.*, 1995). Erinevatele rakkudele võib  $\text{H}_2\text{O}_2$  toime olla aga üsnagi erinev (Gülden *et al.*, 2010). Seetõttu uuritigi, kas MCM3 kuhjumine sademe fraktsiooni 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  toimel võiks olla seotud apoptoosiga kaasnevate efektidega. Apoptoosi hindamiseks hinnati aktiveeritud kaspas-3 ekspressiooni 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga mõjutatud rakkude lahustavas ja sademe fraktsioonis. Üheks apoptoosile iseloomulikuks sündmuseks on rakkudes käivituv kaspaside kaskaad, mis põhjustab erinevate valkude proteolüütilist lõikamist. Kaspas-3 on üks aktiveeritavatest kaspasidest, mis on aktiveerimata kujul 32 kDa suurune valk. Apoptoosi käigus lõigatakse seda proteolüütiliselt ja tekivad 17 kDa ja 12 kDa suurused subühikud, mis liituvad aktiivseks ensüümiks. (Porter & Jänicke, 1999) Kasutatud antikeha detekteerib nii 32 kDa suuruse inaktiivse kui 17 kDa suuruse aktiivse kaspas-3-e. Aktiivse kaspas-3 17 kDa subühiku teke on 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  puhul nähtav alles 14 h pärast, samas suureneb 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  toimel inaktiivse kaspas-3 32kDa suuruse vormi hulk eriti sadenenud fraktsioonis alates 4 h töötlustest (joonis 7B). Lisaks 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  4 h töötlusele puudus apoptoosi indutseeriv toime ka 6 h töötlusel (tulemusi pole esitatud). See kinnitab, et lühiajalistel mõjutustel ei ole 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  apoptoosi indutseeriv.



**Joonis 7. A)  $\gamma$ -H2A.X tase tõuseb 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toimel. B) Aktiivne kaspaas tekib 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötlusel 14 h pärast.** A) Lahustuva (S) ja sademe (P) fraktsioonide *Western blot* analüüs H2A.X spetsiifilise antikehaga. Analüüsiti 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsioonidega 30 minutit, 1 h, 4 h või 14 h töödeldud ja töötlemata rakke.  $\gamma$ -H2A.X *Western blot* viidi läbi ühe katse proovidega. B) Lahustuva (S) ja sademe (P) fraktsioonide *Western blot* analüüs kaspaas-3 vastase antikehaga. Analüüsiti töötlemata, 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga 1 h, 4 h ja 14 h mõjutatud rakke. Kaspaas-3 *Western blot* viidi läbi ühe katse proovidega. Aktiveerimata kaspaas-3 ekspressiooni hinnati lühikese säriajaga filmidelt ning aktiveeritud kaspaas-3 ekspressiooni pika säriajaga filmidelt.

### 2.3.3. MCM3 endine lokalisatsioon ei taastu peale lühiajalist 300 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stressi, vaid MCM3 tase langeb aja jooksul kõikjal rakus

Kuna 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ei tekita lühiajalisel mõjutamisel rakkudes apoptoosi, uuriti järgnevalt, kas 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poolt põhjustatud MCM3 tsütoskeletile lokaliseerumine on pööratav. Selleks uuriti rakkude taastumist peale 6 h 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötlust ning leiti, et MCM3 lokalisatsioonimuster ei pöördu töötlemata rakkudega samaks isegi peale 24-72 h värskes söötmes taastumist. 24 h pärast langeb MCM3 tase tsitoplasmaatilises (CPE), lahustuvas tuuma (SNE) ja kromatiiniga seotud tuuma (ChBNe) fraktsioonis, kadudes peaaegu täielikult (joonis 8). Tsütoskeleti (CySk) fraktsioonist hakkab MCM3 tase langema 48 h peale 6 h 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötlust (joonis 8). Kuna eelnevalt selgus, et membraani (ME) fraktsioonis ei teki 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötlusel MCM-ide tasemes muutusi ei teostatud taastumise uurimisel ME fraktsiooni proovidele *Western blot* analüüsi.



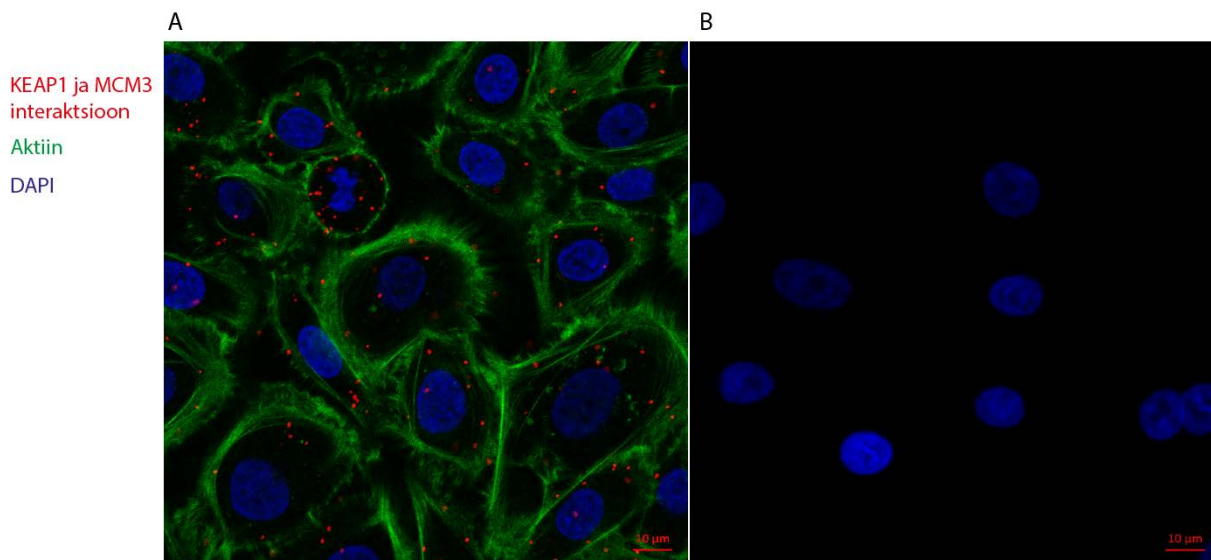
**Joonis 8. 48 h peale 6 h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötlustest taastumist hakkab MCM3 kaduma CySk fraktsioonist ja 24 h pärast teistest fraktsioonidest.** Tsütoplasmaatilise (CPE), lahustuva tuuma (SNE), kromatiiniga seotud tuuma (ChBNe) ning tsütoskeleti fraktsioonide *Western blot* analüüs MCM3 ja vastaste antikehadega. Analüüsiti töötlemata rakke (UT) ning 6h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsiooniga töödeldud, 6h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsiooniga töödeldud ja seejärel 24 h, 48 h või 72 h taastunud rakke. Aktiini *Western blot* on materjali hulga kontrolliks. Taastumise katse ning *Western blot* analüüs viidi läbi ühel korral. Erinevate fraktsioonide pildid on erineva säritusega. \* tähistatud proovid on geelile kandes vahetusse läinud.

### 2.3.4. MCM3 ja MCM7 PLA abil määratud interaktsioonisignaali hulk KEAP1-ga suureneb primaarsetes keratinotsüütides 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toimel

Eelnevatest tulemustest selgus, et MCM3 ja teiste MCM2-7 replikaativse helikaasi subühikute lokaliseerimine muutub 300 μM ja 1000 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga mõjutamisel (joonis 5). Kuna oksüdatiivse stressi sensorvalk KEAP1 on rakkudes ankurdatud aktiini tsütoskeletile (Kang *et al.*, 2004), võiks MCM3 ja teiste MCM-ide kogunemine tsütoskeleti fraktsiooni olla sõltuv KEAP1 interaktsioonist MCM3 ja MCM7-ga. Seetõttu asutigi järgnevalt kaardistama, kas 6 h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötlus mõjutab KEAP1 interaktsiooni MCM3 ning MCM7-ga. Interaktsioonide uurimiseks kasutati läheduse tuvastamise testi (ingl *proximity ligation assay*, PLA), kus valkude vahelist interaktsiooni või lähedust iseloomustab fluorestseeruv signaal, kui uuritavad valgud asuvad lähemal kui 40 nm (Söderberg *et al.*, 2006; Fredriksson *et al.*, 2002).

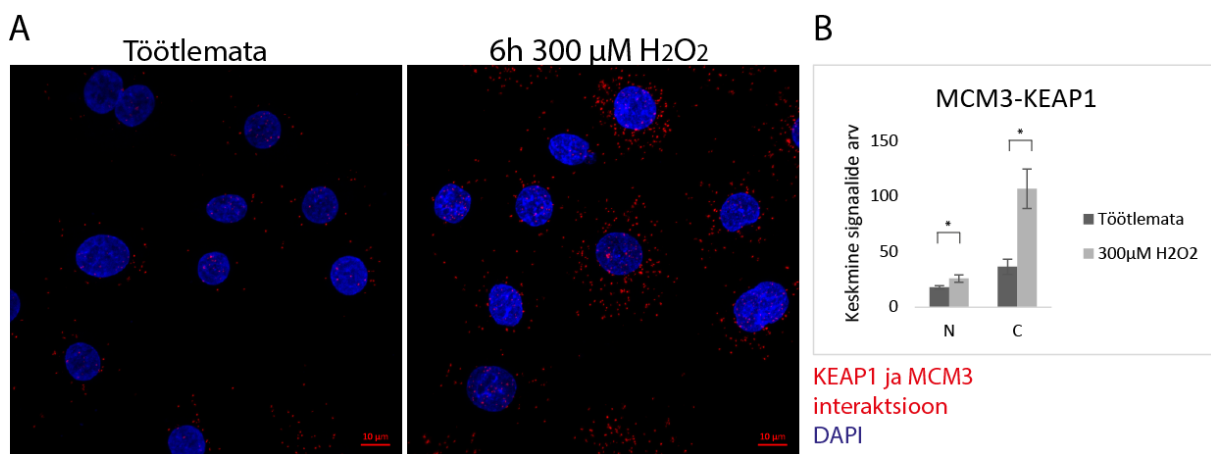
Uurimaks, kas KEAP1 ja MCM3 interaktsioon on PLA meetodiga tuvastatav, vaadeldi esmalt töötlemata rakke. On näha, et KEAP1 ja MCM3 interaktsioon on tuvastatav ja seda ainult raku sees lokaliseeruvate signaalidena (joonis 9A). Kuna MCM3 ja KEAP1 vahel on biokeemiliste meetoditega interaktsioon kinnitatud (Ilves, publitseerimata andmed) võib nende PLA-ga tuvastatud lähedust pidada interaktsiooniks. Lisaks analüüsiti negatiivseks

kontrolliks PLA meetodil rakke, millele ei lisatud primaarseid antikehi, kuid ülejäänud PLA protokoll viidi läbi tavalistel tingimustel. Negatiivsel kontrollil ei ilmunud PLA signaale. Selline tulemus kinnitab, et kasutatud PLA reagentid ei anna ebaspetsiifilisi signaale (joonis 9B).



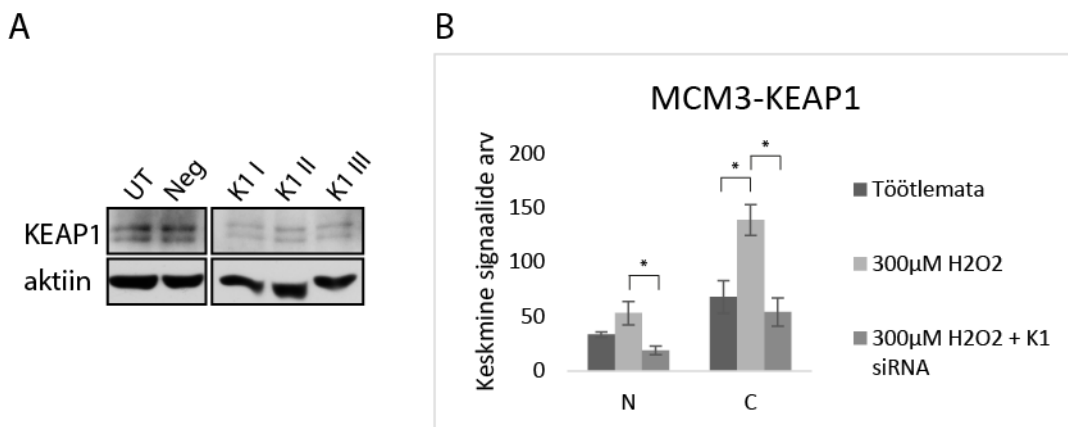
**Joonis 9. KEAP1 ja MCM3 interaktsioonisignaalid on PLA meetodil tuvastatavad rakkude sees.** A) Fikseeritud ja permeabiliseeritud rakkude PLA analüüs MCM3 ja KEAP1 spetsiifiliste primaarsete antikehadega, PLA sekundaarsete antikehade ja PLA reagentidega. Raku piirjooni edasi andvad aktiini filamendid on visualiseeritud Alexa-488 konjugeeritud falloidiiniga ning tuumad DAPI-ga. B) Ilma primaarsete antikehadeta negatiivsel kontrollil PLA signaalid puuduvad. Mõlemal pildidl on 10 µm mõõtjoon.

Edasi võrreldi PLA signaalide arvu töötlemata rakkudes ning 6 h 300 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga töödeldud rakkudes. MCM3 ja KEAP1 interaktsioonisignaalide hulk oli viimastes oluliselt suurem (joonis 10A). Täpsemalt on MCM3 ja KEAP1 interaktsioonisignaalide arv H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötlusega rakkudes võrreldes töötlemata rakkudega tuumades 1,4 ning tsütoplasmas 3 korda suurem (joonis 10B).



**Joonis 10. 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  toimel suureneb MCM3 ja KEAP1 interaktsioonide hulk.** A) Töötlemata ja 6h 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga töödeldud rakkude PLA analüüs. Rakud on fikseeritud, permeabiliseeritud ning töödeldud MCM3 ja KEAP1 spetsiifiliste primaarsete antikehadega, PLA sekundaarsete antikehade ja PLA reagentidega. MCM3 ja KEAP1 interaktsiooni PLA signaalid on punaste täppidena ning tuumad värvitud DAPI-ga (sinine). Mõõtjoon 10  $\mu\text{m}$ . B) Tuuma (N) ja tsütoplasma (C) keskmine MCM3 ja KEAP1 PLA interaktsioonisignaali hulk töötlemata ja 6h 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga töödeldud rakkudes. Keskmine PLA signaalide hulk tuumas ja tsütoplasmas leiti kahe katse korduse 10-11 pildi põhjal ImageJ programmiga. Keskvärtuse hajuvust iseloomustab standardviga, \* tähistab p-väärtust < 0,05.

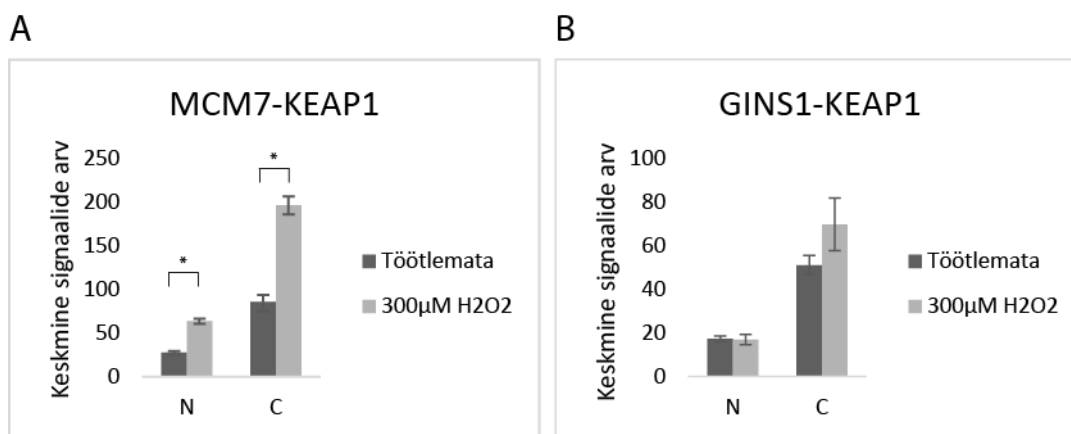
PLA-ga tuvastatud KEAP1 ja MCM3 interaktsioonide hulga suurenemine  $\text{H}_2\text{O}_2$  töötlusega küll juba vihjab spetsiifilisele interaktsioonile, kuid selle interaktsiooni spetsiifilisuse kontrollimiseks kasutati ka KEAP1 valgu taseme alandamist RNA interferentsiga. Esmalt võrreldi kolme erineva KEAP1 siRNA efekti. Kõik kasutatud siRNAd vähendasid KEAP1 valgu hulka hinnanguliselt 50% võrra (Joonis 11A). Neist valiti PLA katseks I KEAP1 siRNA. PLA-ga tehtavate reaktsioonide hulga vähendamiseks võrreldi  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga töödeldud rakkudes signaalide arvu siRNA töötlusega ja ilma. Ainult  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga töödeldud rakke võrreldi, sest seal on PLA signaalide hulk suurem kui töötlemata rakkudes. KEAP1 siRNaga transfekteeritud ja  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga mõjutatud proovis oli KEAP1 MCM3 interaktsioonisignaale üle 2,5 korda vähem kui ainult  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga mõjutatud proovis (Joonis 11B). Seega kuna KEAP1 siRNA vähendab valgu hulka, siis väheneb KEAP1 MCM3 interaktsioonisignaali arv ja tegu on spetsiifilise interaktsiooniga. Selles katses võrreldi samuti  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga töötlemata rakke ja ilma siRNA-ta 6 h 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  töödeldud rakke. MCM3 ja KEAP1 interaktsioonisignaali arv suurenes  $\text{H}_2\text{O}_2$  toimel tuumas 1,4 ning tsütoplasmas 2 korda (Joonis 11B).



**Joonis 11. A) KEAP1 siRNA-d vähendavad KEAP1 valgu ja B) KEAP1 ja MCM3 interaktsioonidele vastavate PLA signaalide hulka 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötamise puhul. A) Töötlemata (UT), negatiivse kontrolli siRNA-ga töödeldud (Neg) ja kolme eri KEAP1 siRNA-ga (K1 I, K1 II ja K1 III) töödeldud rakkude lüsaatide immunoblot analüüs KEAP1 ja aktiini vastaste antikehadega. Aktiini *Western blot* on materjali hulga kontrollina. Pildid on pärit samalt filmilt. Tulemused olid samad katse teisel kordusel. B) Tuuma (N) ja tsütoplasma (C) keskmine MCM3 ja KEAP1 interaktsiooni PLA signaalide hulk töötlemata, 6h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga töödeldud ning 6h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töödeldud KEAP1 siRNA-ga rakkudes. Keskmine PLA signaalide hulk tuumas ja tsütoplasmas saadi ühe katse korduse iga proovi 5 erineva vaatevälja pildi põhjal ImageJ programmiga. Keskväärtuse hajuvust iseloomustab standardviga, \* tähistab p-väärtust < 0,025.**

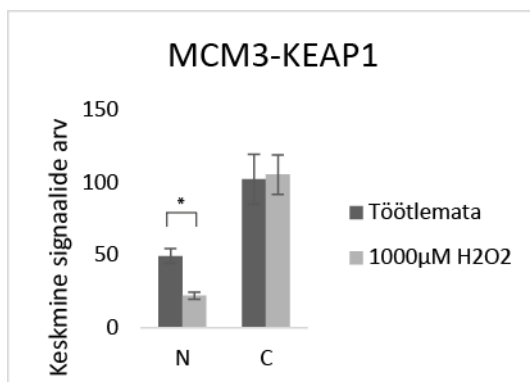
Fraktsioneerimise katsest selgus, et MCM7 ja MCM6 käitusid MCM3-ga sarnaselt ehk liikusid tuuma lahustuvast fraktsioonist tsütoskeletile. Seetõttu uuriti KEAP1 lähedust lisaks MCM3-le ka teiste MCM2-7 helikaasi subühikutega PLA meetodil. Selgus, et 6 h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suurendab KEAP1 lähedust ka MCM7-ga. Kuna MCM7 on samuti biokeemiliselt kinnitatud KEAP1 interaktsioonipartner (Ilves, publitseerimata andmed) võib ka MCM7 ja KEAP1 lähedust pidada interaktsiooniks (Joonis 12A). Samas läheduse suurenemine teiste uuritud MCM-idega ei olnud nii silmapaistev (Lisa 2, joonis 1). Samuti ei muutu KEAP1 lähedus GINS kompleksi subühiku GINS1-ga (inimese GINS valke nimetatakse GINS1, GINS2, GINS3 ja GINS4<sup>1</sup>), mis on MCM2-7-ga seotud ainult peale aktiivse replikatiivse helikaasi CMG moodustumist (Joonis 12B).

<sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9837#reference-sequences>



**Joonis 12. A) 6 h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suurendab KEAP1 interaktsiooni MCM7-ga ning B) ei suurenda KEAP1 lähedust GINS1-ga.** A) Tuuma (N) ja tsütoplasma (C) keskmine MCM7 ja KEAP1 interaktsioonide PLA signaalide hulk töötlemata ja 6 h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga töödeldud rakkudes. B) Tuuma (N) ja tsütoplasma (C) keskmine GINS1 ja KEAP1 PLA signaalide hulk töötlemata ja 6h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga töödeldud rakkudes. Keskmine PLA signaalide hulk tuumas ja tsütoplasmas saadi nii MCM7 KEAP1 kui GINS1 KEAP1 läheduse analüüsil ühe katse korduse proovide 5 erineva vaatevälja pildi põhjal ImageJ programmiga. Keskväärtuse hajuvust iseloomustab standardviga, \* tähistab p-väärtust < 0,05.

Eelnevatest katsetes selgus, et 1000 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötlusel on võrreldes 300 μM töötusega sarnase iseloomuga ning isegi tugevam efekt. Lahustuva (S) ja sadenenud (P) fraktsiooni uurimisel ilmnis 1000 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötuse mõjul P fraktsiooni kuhjumine varem kui 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puhul. Samuti näitas immunofluorestsentsanalüüs, et võrreldes 300 μM töötusega tekib 6 h H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mõjuaja puhul 1000 μM töötlusel rohkem neid rakke, kus MCM3-lt pärit signaali tugevus tuumas on langenud. Seega oli üllatav, et 1000 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötlusel erineb PLA meetodil määratud MCM3 ja KEAP1 interaktsioonisignaali dünaamika täielikult 6 h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötuse puhul nähtust. Uurides MCM3 interaktsiooni KEAP1-ga 6 h 1000 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> töötusega ei muutu KEAP1 MCM3 interaktsioonide arv tsütoplasmas ning tuumas on interaktsiooni iseloomustavaid signaale 2,25 korda vähem kui töötlemata rakkudes (joonis 13). Samas oli ootuspärane see, et madalama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontsentratsiooni (120 μM) juures, kus rakkude fraktsioneerimisel ei ilmnenud efekti MCM3 jaotumisele rakus, oli KEAP1 ja MCM3 interaktsioonisignaali arvu kasv pärast 6 h töötlust märkimisväärselt nõrgem (Lisa 1 Joonis 2).



**Joonis 13. 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vähendab tuumas KEAP1-MCM3 interaktsioonide arvu.** Tuuma (N) ja tsütoplasma (C) keskmine MCM3 ja KEAP1 interaktsioonide PLA signaalide hulk töötlemata ja 6h 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga töödeldud rakkudes. Keskmine PLA signaalide hulk tuumas ja tsütoplasmas saadi kahe katse korduse proovide 8 erineva vaatevälja pildi põhjal ImageJ programmiga. Keskväärtuse hajuvust iseloomustab standardviga, \* tähistab p-väärtust < 0,05.

## 2.4. Arutelu

Käesolevas töös püüti vastata küsimusele, kas MCM3 ja MCM7 interaktsioon KEAP1-ga on osa molekulaarsetest mehhanismidest, millega rakk reguleerib genoomi replikatsiooni oksüdatiivse stressi tingimustes. Uurides replikatiivse helikaasi kompleksi MCM2-7 subühikute lokaliseerimist normaalses ja oksüdatiivse stressi all olevates inimese primaarsetes epidermaalsetes keratinotsüütides (HPEK) selgus, et MCM2-7 liigub püsivalt rakkude kasvu peatumist indutseeriva  $H_2O_2$  kontsentratsiooni toimet tsütoskeletile. Lisaks leiti, et samadel tingimustel suureneb KEAP1 interaktsioon nii MCM3 kui MCM7-ga.

MCM2-7 subühik MCM3 koguneb rakkudes  $300 \mu M H_2O_2$  (ja  $1000 \mu M$  puhul, andmeid pole esitatud) toimet tsütoskeleti fraktsiooni ning samal ajal langeb MCM3 tase tuuma lahustuvate valkude fraktsioonis. Sealjuures ei muutu MCM3 tase kromatiini fraktsioonis. MCM3 tuumast välja liikumist  $H_2O_2$  poolt indutseeritud oksüdatiivse stressiga kinnitab ka MCM3 lokaliseerimise analüüs fluorestsentsmikroskoobiga. Seega reguleeritakse kas tuumas paikneva kromatiinile laadimata MCM3 lokaliseerimist tsütoskeletile või takistatakse uue MCM3 transporti tuuma, sidudes seda tsütoskeletiga. Sarnaselt MCM3-le, muutub  $300 \mu M H_2O_2$  oksüdatiivse stressi toimet ka MCM6 ja MCM7 subühikute lokaliseerimine, vihjates sellele, et oksüdatiivse stressi puhul reguleeritakse korrigeeritult kogu heksameeri lokaliseerimist. See on kooskõlas varasemate uurimistöödega, kus näidatakse, et enamik MCM-idest on raku heksameeri kompleksina (Prokhorova & Blow, 2000; Fujita, 2006; Kimura *et al.*, 1996).

Kui  $H_2O_2$  kontsentratsioon raku ületab normaalse taseme, võib see tekitada DNA ja teiste biomolekulide kahjustusi (Henle & Linn, 1997; Mello Filho *et al.*, 1984; Katsube *et al.*, 2014). Käesolevas töös näidati, et DNA kahjustusele viitava molekulaarse markeri  $\gamma$ -H2A.X tase raku suureneb  $300 \mu M H_2O_2$  töötamise järgselt. MCM-ide lokaliseerimise muutus  $H_2O_2$  toimet võib seega viidata regulatsiooni mehhanismile, mis takistab DNA litsentseerimist tingimustes, kus DNA on saanud kahjustada. Selle edasiseks uurimiseks oleks vaja testida ka teisi DNA-d kahjustavaid aineid ning MCM-ide lokaliseerimise muutust nende toimet. Samas näidati, et lühiajalise mõjutuse korral ei põhjusta  $300 \mu M H_2O_2$  HPEK rakkude apoptoosi. MCM3 kuhjub  $300 \mu M H_2O_2$  töötamise puhul sadenenud valkude ja tsütoskeleti fraktsioonidesse juba alates 1 h mõjuajast ning seega on MCM3 kuhjumine tsütoskeleti fraktsiooni apoptoosist sõltumatu. Huvitav on, see et  $300 \mu M H_2O_2$  toimet koguneb kaspaas-3 aktiveerimata vorm sadenenud valkude fraktsiooni (täpsemalt tsütoskeletile, andmeid pole esitatud). Kuna aktiivne kaspaas-3 on apoptootiline proteaas, mille substraadiks on muuhulgas

ka MCM3 (Schwab *et al.*, 1998), võib aktiveerimata kaspaas-3 kuhjuda tsütoskeletile selleks, et rakk oleks vajadusel valmis 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  põhjustatud kahjustuste tõttu apoptootilise valkude proteolüüsi käivitama. Selle teooria paikapidavust peaks kinnitama lisauuringutega.

Kui rakule tekkinud kahjustusi ei suudeta parandada, siseneb rakk vastavalt kahjustuste ulatusele *senescence*'i või apoptoosi (Ciccia & Elledge, 2010). Pöördumatu kasvu peatumine ehk *senescence* on rakkude enneaegne vananemine, kus rakke iseloomustab metaboolne aktiivsus, kuid nende jagunemine on takistatud. Praeguseks on tõestatud, et *senescence*'i puhul on tegu ühe kaitsemehhanismiga, mis takistab rakkudel muutuda kasvajakelisteks (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Varasemalt on 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kontsentratsioonil kirjeldatud imetajate rakkudele pöördumatut kasvu inhibitsiooni esile kutsuv toime (Wiese *et al.*, 1995), mis võiks vastata *senescence*'ile. Ka käesolevas töös leiti, et 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  tekitab HPEK rakkudes DNA kahjustusi, kuid mitte apoptoosi ning on võimalik, et rakud suunatakse 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  toimel hoopis *senescence*'i. Viimast ideed toetab ka see, et MCM3 lokalisatsioon ei pöördu tagasi normaalseks 6 h 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  stressist taastumise järel, vaid MCM3 kaob 24 h pärast taastumist tsütoplasmaatilisest, tuuma lahustuvast ja kromatiinile seondunud fraktsioonist ja 48 h pärast taastumist ka tsütoskeleti fraktsioonist. MCM2-7 kompleksi valkude taseme langus on iseloomulik *senescence*'is rakkudele (Stoeber *et al.*, 2001). Kuigi mitmed uuringud on varasemalt  $\text{H}_2\text{O}_2$  *senescence*'i indutseerivat mõju kinnitanud (Sasaki *et al.*, 2014; Ido *et al.*, 2012), oleks ka käesolevas töös kasutatud katseskeemis vaja eraldi määrata *senescence*'iga seotud spetsiifilisi markereid, nagu  $\beta$ -galakotosidaasi aktiivsus (Lawless *et al.*, 2010).

MCM3 ja KEAP1 interaktsioon (Hast *et al.*, 2013; Ilves publitseerimata andmed) kinnitati käesolevas töös ka PLA meetodil. Normaalses tingimustes annab KEAP1 signaale MCM3 valguga ning samuti MCM7, MCM2, MCM6 ja GINS1-ga nii tuumas kui tsütoplasmas. See võib viidata võimalusele, et mingi osa MCM2-7 heksameerist ja võib-olla ka aktiveeritud CMG kompleksist, on normaalses rakus KEAP1 läheduses või sellega seotud. Ilmselt on ülejäänud MCM2-7 subühikud KEAP1-ga seotud MCM3 ja MCM7 vahendusel, sest need on ainsad, millega on biokeemiliselt KEAP1-ga interaktsioon tuvastatud. Seda toetab ka fakt, et MCM2-7 kompleksi diameeter on ligikaudu 15 nm (Remus *et al.*, 2009) ja PLA tuvastab kahe valguga läheduse, kui need on 40 nm kaugusel.

NRF2 taseme suurenemine 300 ja 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  toimel kinnitab seda, et KEAP1 tajub rakkudes  $\text{H}_2\text{O}_2$  taseme tõusu, nagu varasemalt näidatud (Fourquet *et al.*, 2010). Kuna 300 ja

1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  töötlus tingib ka MCM-ide lokalisatsiooni tsütoskeletile, on ahvatlev mõte, et MCM3 ja MCM7-ga interakteeruv KEAP1 võiks seda protsessi  $\text{H}_2\text{O}_2$  stressi tingimustes juhtida. Seda mõtet toetab ka teadmine, et MCM3 ja MCM7 interaktsioonipartner KEAP1 on rakkudes aktiini tsütoskeleti külge ankurdatud (Kang *et al.*, 2004). Lisaks suureneb KEAP1 hulk 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  toimet mõnevõrra tsütoplasmaatilises ja tsütoskeleti fraktsioonides. 6 h 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  töötlusel suureneb võrreldes töötlemata rakkudega KEAP1 interaktsioon MCM3-ga. Samas ei suurene MCM3 ja KEAP1 interaktsioonisignaali hulk 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  puhul. Järelikult 6 tundi peale 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga mõjutamist pole MCM-ide tsütoskeletil hoidmiseks KEAP1 interaktsioon MCM3-ga vajalik. Kuna 300 ja 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  töötlustel on varem imetaja rakkudele kirjeldatud erinev toime (Wiese *et al.*, 1995), käivituvad rakkudes  $\text{H}_2\text{O}_2$  töötamise järgselt ilmselt erinevad regulatiivsed rajad. 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  puhul võib olla tegu tingimustega, kus KEAP1 interaktsioon MCM3-ga on vajalik, kuid 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  puhul mitte. 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  töötamisega suureneb tsütoskeleti fraktsioonis lisaks MCM3 ja MCM7 tasemele ka MCM6 tase. PLA-ga uurides suureneb 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  töötlusel KEAP1 interaktsioon MCM3 ja MCM7-ga, kuid teiste uuritud MCM2-7 subühikutega ei ole PLA signaalide hulga suurenemine nii selge. Kui oksüdatiivse stressi puhul interakteerub KEAP1 MCM3 ja MCM7-ga, siis kui heksameer on veel intaktne, võiks KEAP1 PLA signaalide hulk suurenedagi sama palju ka MCM2 ja MCM6 subühikutega. Seda siiski ei täheldatud. Samas kui MCM2-7 heksameer on avatud konformatsioonis võivad MCM2 ja MCM6 olla liiga kaugel, et PLA signaal tekkida saaks. Sellisel juhul võib 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  töötlusel kogu heksameer olla seotud KEAP1-ga MCM3 ja MCM7 vahendusel. KEAP1 interaktsioonide uurimine MCM2-7 kompleksi valgudega PLA meetodil 300 ja 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kontsentratsioonidega ei vastanud üheselt küsimusele, kas MCM2-7 valgud võiksid liikuda tsütoskeleti fraktsiooni KEAP1 sõltuvalt. Seda on edasistes katsetes vaja täpsustada ning selleks peab uurima KEAP1 siRNA-ga töödeldud või KEAP1 puudulikke rakke ning MCM2-7 subühikute lokalisatsiooni nendes oksüdatiivse stressi toimet.

Kuigi eelnevatest katsetest ei selgunud, kas MCM2-7 kompleksi tsütoskeletile kuhjumine oksüdatiivse stressi tõttu sõltub KEAP1-st, on märkimisväärne see, et MCM3 ja MCM7 interaktsioon KEAP1-ga suureneb 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  stressi puhul üle kahe korra. Meie laboris on näidatud, et KEAP1 interakteerub MCM3-ga ETGE motiivi vahendusel ja MCM7-ga VSGE motiivi vahendusel (Ilves, publitseerimata andmed). Seega võiks KEAP1 takistada oksüdatiivse stressi tingimustes MCM3 ja MCM7 subühikutel oma funktsiooni täitmast, interakteerudes korruga MCM3 ETGE motiivi ning MCM7 VSGE motiiviga. Üks võimalus

on, et toimub KEAP1 sõltuv MCM3 ja MCM7 lagundamine. Seda sarnaselt NRF2 regulatsioonile, kus NRF2 lagundamiseks on vajalik selle ETGE ja DLG motiivide üheaegne interaktsioon KEAP1 dimeeriga (Kobayashi *et al.*, 2004). MCM3 ning MCM7 ubikvitineerimist ja lagundamist KEAP1 sõltuvalt uuritakse samuti meie laboris osana uurimisprojektist, mis käsitleb KEAP1 rolli DNA replikatsiooni regulatsioonis. Seda, et MCM3 lagundatakse peale 6 h 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  töötlust on näha 24 h peale stressist taastumist tsütoplasma, lahustuva tuuma ja kromatiini fraktsioonidest ning 48 h peale stressi tsütoskeleti fraktsioonist kadumise põhjal. Võimalik, et MCM2-7 heksameer viiakse ka 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  stressi korral tsütoskeletile MCM3 lagundamiseks, kuid seda KEAP1 sõltumatult. Varasemalt on kirjeldatud, et 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kontsentratsioon viib rakud apoptoosi (Wiese *et al.*, 1995). Apoptoosile on iseloomulik proteolüütiliste kaspasid aktiveerimine. Nende hulgas aktiveerub ka kaspas-3 (Porter & Jänicke, 1999), mis lagundab selektiivselt MCM2-7 kompleksi MCM3 subühikut (Schwab *et al.*, 1998). Eeldades, et rakud liiguvad 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  stressi puhul *senescence*'i, võimaldaks KEAP1 sõltuv MCM3 degradatsioon seega vältida proteolüütiliste kaspasid mõju teistele raku elutegevuseks vajalikele valkudele. Kuna MCM3 on raku normaalse elutegevuse käigus oluline heksameeri lokaliseerimise määramises (Kimura *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1997; Takei & Tsujimoto, 1998; Liku *et al.*, 2005; Chuang *et al.*, 2012) ning kromatiinile laadimises (Chuang *et al.*, 2012; Frigola *et al.*, 2013), on igati loogiline, et MCM2-7 heksameeri võidakse kontrollida just MCM3 subühiku vahendusel nii *senescence*'i kui apoptoosi korral, kui replikatsiooni initsiatsioon kahjustaks rakku.

300  $\mu\text{M}$  on  $\text{H}_2\text{O}_2$  kontsentratsioon, mille toimel muutub MCM2-7 subühikute lokaliseerimine ning suureneb ka KEAP1 interaktsioon MCM3 ja MCM7-ga. Lisaks põhjustab see rakkudes DNA kahjustusi, aga mitte apoptoosi ning võiks rakud suunata hoopis *senescence*'i. Kui DNA kahjustuse korral ATM ja ATR kinaasid aktiveeritakse, võiks nende põhjustatud CDK-de inhibitsioon suurendada juba käivitatud replikatsiooni algussaitide uuesti litsentseerimist. Seni on näidatud, et DNA kahjustuse korral on litsentseerimine takistatud Cdt1 lagundamise tõttu (Higa *et al.*, 2003; Ralph *et al.*, 2006). Käesoleva töö tulemused näitavad, et MCM2-7 subühikute lokaliseerimise muutus võiks olla veel üks kaitsemehhanism litsentseerimise takistamiseks oksüdatiivse stressi puhul, mis tekitab DNA kahjustusi. Lisaks näitab MCM3 ja MCM7 interaktsioonide hulga suurenemine KEAP1-ga 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  toimel seda, et KEAP1 võiks oksüdatiivse stressi poolt indutseeritud *senescence*'i korral reguleerida MCM3 ja MCM7 subühikute aktiivsust. See võib olla vajalik tsütoskeletile liikunud MCM2-7 komplekside inhibeerimiseks. Kuna oksüdatiivse stressi tekitatud DNA kahjustused võivad soodustada

kasvajate teket (Hoeijmakers, 2001; Negrini *et al.*, 2010) ning samuti võivad kasvajate tekkes rolli mängida replikatsiooni litsentseerimise häired (Blow & Gillespie, 2008), võiks selline kaitsemehhanism olla üks *senescence*'i vastuseid, mis kaitseb rakke kasvajaliseks muutumise eest.

Uurimistöö edasised plaanid on kontrollida, kas MCM-ide lokaliseerimise muutus  $H_2O_2$  toimel on põhjustatud DNA kahjustusest ja KEAP1 interaktsioonist MCM3 ja MCM7-ga. Selleks on vaja uurida MCM2-7 subühikute lokaliseerimise muutusi teiste DNA-d kahjustavate ainete mõjul. Samal ajal on oluline täpsustada, kas KEAP1 põhjustab MCM2-7 lokaliseerimise muutust läbi interaktsiooni MCM3 ja MCM7-ga, kasutades interaktsiooni rikkuvaid mutatsioone ning KEAP1 puudulikke rakke. Lisaks on vaja uurida kas  $300 \mu M H_2O_2$  suunab rakud tõepoolest *senescence*'i.  $H_2O_2$  efekti MCM2-7 kompleksi subühikutele peaks uurima ka teistes rakuliinides, eelkõige transformeerunud rakkudes, ning võrdlema tulemusi HPEK rakkudes saadud tulemustega.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva uurimistöö eesmärk oli uurida, kas oksüdatiivne stress mõjutab replikatiivse helikaasi subühikute MCM3 ja MCM7 lokaliseerimist rakus ning interaktsiooni oksüdatiivse stressi sensori KEAP1-ga. Tegu on osaga suuremast projektist, mis uurib kas KEAP1 interaktsioon MCM3 ja MCM7-ga on seotud molekulaarsete radadega, mis reguleerivad replikatsiooni oksüdatiivse stressi tingimustes. DNA replikatsioon on hädavajalik geneetilise informatsiooni edasi kandumiseks ning selle regulatsiooni uurimine oksüdatiivse stressi tingimustes, kus võivad esineda DNA kahjustused, on seega äärmiselt oluline. Seda eriti seetõttu, et oksüdatiivne stress on seotud vananemise ja mitmete haiguste, sealhulgas kasvaja, tekkega (Balaban *et al.*, 2005).

Töös kasutatud oksüdatiivse stressi tekitaja vesinikperoksiid ( $H_2O_2$ ) põhjustab 300  $\mu M$  kontsentratsioonil 1 h kuni 8 h töötuse järgselt MCM2-7 subühikute taseme languse tuuma lahustuvast fraktsioonist ning taseme tõusu tsütoskeleti fraktsioonis. Lühiajaline 300  $\mu M$   $H_2O_2$  töötus tekitab inimese primaarsetes epidermaalsetes keratinotsüütides DNA kahjustusi, aga mitte apoptoosi. Wiese ja kaasautorite töö põhjal (Wiese *et al.*, 1995) võib arvata, et selline  $H_2O_2$  töötus võiks rakud hoopis *senescence*'i suunata. Ka MCM3 taseme langemine peale 6 h 300  $\mu M$   $H_2O_2$  stressist taastumist on iseloomulik *senescence*'is rakkudele. Olulise tulemusena näitavad PLA meetodil läbi viidud katsed, et 6 h 300  $\mu M$   $H_2O_2$  töötusel suureneb võrreldes töötlemata rakkudega KEAP1 interaktsioon MCM3 ja MCM7-ga. Üllatavalt aga ei suurenenud 6 h 1000  $\mu M$   $H_2O_2$  töötuse järgselt MCM3 interaktsioon KEAP1-ga, kuigi selline töötus muutis sarnaselt 300  $\mu M$   $H_2O_2$  toimele MCM3 lokaliseerimist.

Need tulemused viitavad sellele, et oksüdatiivse stressi tingimustes reguleeritakse MCM2-7 kompleksi valkude lokaliseerimist, viidates esmakordselt, sellele et MCM2-7 võiks olla oksüdatiivse stressi reguleerivate radade sihtmärgiks. Kas lokaliseerimise muutus on seotud oksüdatiivse stressi sensorvalgu KEAP1 interaktsiooniga MCM3 ja MCM7 subühikutega, vajab täpsustamist. Siiski viitab 300  $\mu M$   $H_2O_2$  töötuse järel suurenenud KEAP1 interaktsioon MCM3 ja MCM7-ga sellele, et vähemalt need MCM2-7 kompleksi subühikud võivad olla otseselt KEAP1 poolt reguleeritud. KEAP1 suurenenud interaktsioon MCM3 ja MCM7-ga võib näiteks vahendada nende subühikute kontrollitud lagundamist DNA kahjustusi tekitava ning *senescence*'i suunava oksüdatiivse stressi korral. Kuna MCM3 on varem kirjeldatud kui subühik, mis reguleerib MCM2-7 kompleksi lokaliseerimist ning kromatiinile laadimist, võiks

selle KEAP1 sõltuv regulatsioon kaitsta rakke DNA-d litsentseerimast tingimustes, kus see võib rakkudele kahjulik olla.

## **Changes in the Localization of Replicative Helicase Subunits MCM3 and MCM7 and their Interaction with Sensor Protein KEAP1 in Response to Oxidative Stress**

Siret Somarokov

### **SUMMARY**

The correct execution of the genome replication process is crucial for the cell in order to duplicate itself. Therefore, many of the cellular regulatory pathways target replication both in normal cells and in cells subjected to stress. It is especially important to control DNA replication in circumstances where DNA has been damaged to prevent cancerous or fatal flaws in the next generation. Reactive oxygen species (ROS) can cause DNA damage and activate different cellular systems which protect cells from potential damage or repair damage that has already been done. When DNA is damaged due to oxidative stress, the replication of DNA is halted. Whether the replicative helicase motor complex MCM2-7 is involved in the regulation of replication during oxidative stress or not is not known. During the initiation of replication, the MCM2-7 complex is loaded onto the chromatin where it plays a crucial role in origin firing and replication elongation. MCM2-7 is the core of the active replicative DNA helicase responsible for unwinding the DNA double helix in front of the replication machinery. It has recently been discovered that the MCM2-7 subunit protein MCM3 and also MCM7 are interacting with the stress sensor molecule KEAP1 (Hast *et al.*, 2013; Ilves, unpublished data). The aim of this study was to investigate whether this interaction could facilitate the regulation of replication when cells are exposed to oxidative stress.

The results of this study showed that at 300  $\mu\text{M}$  concentration the endogenous reactive oxygen species hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) directs the decrease of MCM2-7 proteins in the soluble nuclear fraction and causes them to accumulate to the cytoskeleton cellular fraction. This level of  $\text{H}_2\text{O}_2$  caused DNA damage to cells but did not result in cellular apoptosis. In regard to the previous work of Wiese *et al.* (1995), this indicates that cells could be directed to senescence instead. The decreasing level of MCM3 protein after recovery from 6 h 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment is also characteristic to senescent cells. Notably, proximity ligation assay (PLA) indicates that the interaction of KEAP1 increases both with MCM3 and MCM7 proteins after 6 h of 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment. Surprisingly, the interaction of KEAP1 and MCM3 did not increase after 6 h of 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment whereas this treatment did change the localization of MCM3 similar to 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

These results suggest that the localization of MCM2-7 subunits is regulated during oxidative stress, indicating for the first time that the MCM2-7 complex could be a direct target for regulation during oxidative stress. Whether the change in the MCM2-7 subunits' localization is dependent on KEAP1 needs to be further investigated. Nevertheless, the increased interaction of MCM3 and MCM7 with KEAP1 after 6 h of 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment indicates that at least these two subunits could be directly regulated by the oxidative stress sensor KEAP1. The increased interaction of KEAP1 with MCM3 and MCM7 could facilitate the controlled degradation of MCM3 and/or MCM7 in response to stress that causes DNA damage and directs cells to senescence. As MCM3 is previously described as the subunit regulating MCM2-7 localization and loading onto the chromatin, regulating it through KEAP1 could protect the cells from licensing the chromatin when it is harmful to the cell.

## TÄNUSÕNAD

Täna oma juhendajat Ivar Ilvest heade nõuannete ja toetuse eest ning võimaluse eest tegeleda väga huvitava uurimistööga. Suured tänud ka teistele meie uurimisgrupi inimestele, kes andsid väärt nõuandeid.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Arias, E.E. & Walter, J.C. (2006). PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication. *Nat. Cell Biol.* 8:84–90.
- Baird, L., Swift, S., Llères, D. & Dinkova-Kostova, A.T. (2014). Monitoring Keap1-Nrf2 interactions in single live cells. *Biotechnol. Adv.* 32:1133–1144.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 120:483–495.
- Balestrini, A., Cosentino, C., Errico, A. & Garner, E. (2010). UKPMC Funders Group GEMC1 is a TopBP1 interacting protein required for chromosomal DNA replication. *Cell.* 12:484–491.
- Bell, S.D. & Botchan, M.R. (2013). The minichromosome maintenance replicative helicase. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:1–12.
- Berquist, B.R. & Wilson, D.M. (2012). Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. *Cancer Lett.* 327:61–72.
- Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M.C., Tassani, S., Piva, F., Perez-Amodio, S., Strippoli, P. & Canaider, S. (2013). An estimation of the number of cells in the human body. *Ann. Hum. Biol.* 40:463–71.
- Blow, J.J. & Dutta, A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:476–86.
- Blow, J.J. & Gillespie, P.J. (2008). UKPMC Funders Group Replication Licensing and Cancer - a Fatal Entanglement? *Regulation.* 8:799–806.
- Bochman, M.L., Bell, S.P. & Schwacha, A. (2008). Subunit organization of Mcm2-7 and the unequal role of active sites in ATP hydrolysis and viability. *Mol. Cell. Biol.* 28:5865–5873.
- Bochman, M.L. & Schwacha, A. (2009). The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73:652–683.
- De Bont, R. & van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: A review of quantitative data. *Mutagenesis.* 19:169–185.
- Boos, D., Frigola, J. & Diffley, J.F.X. (2012). Activation of the replicative DNA helicase: Breaking up is hard to do. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24:423–430.
- Boos, D., Sanchez-Pulido, L., Rappas, M., Pearl, L.H., Oliver, A.W., Ponting, C.P. & Diffley, J.F.X. (2011). Regulation of DNA Replication through Sld3-Dpb11 Interaction Is Conserved from Yeast to Humans. *Curr. Biol.* 21:1152–1157.
- Boos, D., Yekezare, M. & Diffley, J.F.X. (2013). Identification of a heteromeric complex that promotes DNA replication origin firing in human cells. *Science.* 340:981–4.
- Burkhardt, R., Schulte, D., Hu, B., Musahl, C., Gohring, F. & Knippers, R. (1995). Interactions of Human Nuclear Proteins P1Mcm3 and P1Cdc46. *Eur. J. Biochem.* 228:431–438.
- Campisi, J. & d’Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:729–740.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, a (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59:527–605.

- Chen, S. & Bell, S.P. (2011). CDK prevents Mcm2-7 helicase loading by inhibiting Cdt1 interaction with Orc6. *Genes Dev.* 25:363–372.
- Chowdhury, a, Liu, G., Kemp, M., Chen, X., Katrangi, N., Myers, S., Ghosh, M., Yao, J., Gao, Y., Bubulya, P. & Leffak, M. (2010). The DNA unwinding element binding protein DUE-B interacts with Cdc45 in preinitiation complex formation. *Mol. Cell. Biol.* 30:1495–1507.
- Chuang, C.H., Wallace, M.D., Abratte, C., Southard, T. & Schimenti, J.C. (2010). Incremental genetic perturbations to MCM2-7 expression and subcellular distribution reveal exquisite sensitivity of mice to DNA replication stress. *PLoS Genet.* 6.:
- Chuang, C.H., Yang, D., Bai, G., Freeland, A., Pruitt, S.C. & Schimenti, J.C. (2012). Post-transcriptional homeostasis and regulation of MCM2-7 in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 40:4914–4924.
- Ciccia, A. & Elledge, S.J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell.* 40:179–204.
- Collart, C., Allen, G.E., Bradshaw, C.R., Smith, J.C. & Zegerman, P. (2013). Titration of four replication factors is essential for the *Xenopus laevis* midblastula transition. *Science.* 341:893–6.
- Costa, A., Ilves, I., Tamberg, N., Petojevic, T., Nogales, E., Botchan, M.R. & Berger, J.M. (2011). The structural basis for MCM2-7 helicase activation by GINS and Cdc45. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:471–477.
- Costanzo, V., Robertson, K., Ying, C.Y., Kim, E., Avvedimento, E., Gottesman, M., Grieco, D. & Gautier, J. (2000). Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage. *Mol. Cell.* 6:649–59.
- Crevel, G., Ivetic, a, Ohno, K., Yamaguchi, M. & Cotterill, S. (2001). Nearest neighbour analysis of MCM protein complexes in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 29:4834–4842.
- Diffley, J.F.X. (2004). Regulation of early events in chromosome replication. *Curr. Biol.* 14:778–786.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. & Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:11908–11913.
- Donovan, S., Harwood, J., Drury, L.S. & Diffley, J.F. (1997). Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:5611–6.
- Elsasser, S., Chi, Y., Yang, P. & Campbell, J.L. (1999). Phosphorylation controls timing of Cdc6p destruction: A biochemical analysis. *Mol. Biol. Cell.* 10:3263–77.
- Evrin, C., Clarke, P., Zech, J., Lurz, R., Sun, J., Uhle, S., Li, H., Stillman, B. & Speck, C. (2009). A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:20240–20245.
- Forsburg, S.L. (2004). Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:109–131.

- Fourquet, S., Guerois, R., Biard, D. & Toledano, M.B. (2010). Activation of NRF2 by nitrosative agents and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves KEAP1 disulfide formation. *J. Biol. Chem.* 285:8463–8471.
- Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gústafsdóttir, S.M., Ostman, A. & Landegren, U. (2002). Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat. Biotechnol.* 20:473–7.
- Frigola, J., Remus, D., Mehanna, A. & Diffley, J.F.X. (2013). ATPase-dependent quality control of DNA replication origin licensing. *Nature.* 495:339–43.
- Fu, Y.V., Yardimci, H., Long, D.T., Guainazzi, A., Bermudez, V.P., Hurwitz, J., van Oijen, A., Schärer, O.D. & Walter, J.C. (2011). Selective Bypass of a Lagging Strand Roadblock by the Eukaryotic Replicative DNA Helicase. *Cell.* 146:931–941.
- Fujita, M. (2006). Cdt1 revisited: complex and tight regulation during the cell cycle and consequences of deregulation in mammalian cells. *Cell Div.* 1:22.
- Gambus, A., Khoudoli, G. a., Jones, R.C. & Blow, J.J. (2011). MCM2-7 form double hexamers at licensed origins in *Xenopus* egg extract. *J. Biol. Chem.* 286:11855–11864.
- Georgescu, R.E., Schauer, G.D., Yao, N.Y., Langston, L.D., Yurieva, O., Zhang, D., Finkelstein, J. & O'Donnell, M.E. (2015). Reconstitution of a eukaryotic replisome reveals suppression mechanisms that define leading/lagging strand operation. *Elife.* 4.:
- Gonzalez, M.A., Tachibana, K.K., Laskey, R.A. & Coleman, N. (2005). Control of DNA replication and its potential clinical exploitation. *Nat. Rev. Cancer.* 5:135–41.
- Graham, B.W., Schauer, G.D., Leuba, S.H. & Trakselis, M.A. (2011). Steric exclusion and wrapping of the excluded DNA strand occurs along discrete external binding paths during MCM helicase unwinding. *Nucleic Acids Res.* 39:6585–95.
- Green, M. R., Sambrook, J., 2012. SDS-PAGE of Proteins, p. 1692. In *Molecular cloning : a laboratory manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Gülden, M., Jess, A., Kammann, J., Maser, E. & Seibert, H. (2010). Cytotoxic potency of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time. *Free Radic. Biol. Med.* 49:1298–1305.
- Hammerman, P.S., Lawrence, M.S., Voet, D., Jing, R., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Stojanov, P., McKenna, A., Lander, E.S., Gabriel, S., Getz, G., Sougnez, C., Imielinski, M., Helman, E., Hernandez, B. *et al.* (2012). Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature.* 489:519–525.
- Hast, B.E., Goldfarb, D., Mulvaney, K.M., Hast, M. a., Siesser, P.F., Yan, F., Hayes, D.N. & Major, M.B. (2013). Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination. *Cancer Res.* 73:2199–2210.
- Heffernan, T.P., Unsal-Kaçmaz, K., Heinloth, A.N., Simpson, D.A., Paules, R.S., Sancar, A., Cordeiro-Stone, M. & Kaufmann, W.K. (2007). Cdc7-Dbf4 and the human S checkpoint response to UVC. *J. Biol. Chem.* 282:9458–68.
- Henle, E.S. & Linn, S. (1997). Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 272:19095–19098.
- Hensley, K., Robinson, K. a, Gabbita, S.P., Salsman, S. & Floyd, R. a (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1456–1462.

- Higa, L.A. a, Mihaylov, I.S., Banks, D.P., Zheng, J. & Zhang, H. (2003). Radiation-mediated proteolysis of CDT1 by CUL4-ROC1 and CSN complexes constitutes a new checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 5:1008–1015.
- Hoeijmakers, J.H.J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 361:1475–85.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 411:366–374.
- Hook, S.S., Lin, J.J. & Dutta, A. (2007). Mechanisms to control rereplication and implications for cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19:663–71.
- Hourihan, J.M., Kenna, J.G. & Hayes, J.D. (2013). The gasotransmitter hydrogen sulfide induces nrf2-target genes by inactivating the keap1 ubiquitin ligase substrate adaptor through formation of a disulfide bond between cys-226 and cys-613. *Antioxid. Redox Signal.* 19:465–81.
- Hu, J. (2006). An Evolutionarily Conserved Function of Proliferating Cell Nuclear Antigen for Cdt1 Degradation by the Cul4-Ddb1 Ubiquitin Ligase in Response to DNA Damage. *J. Biol. Chem.* 281:3753–3756.
- Ibarra, A., Schwob, E. & Méndez, J. (2008). Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:8956–8961.
- Ido, Y., Duranton, A., Lan, F., Cacicedo, J.M., Chen, T.C., Breton, L. & Ruderman, N.B. (2012). Acute Activation of AMP-Activated Protein Kinase Prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Premature Senescence in Primary Human Keratinocytes. *PLoS One.* 7:e35092.
- Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J.J. & Botchan, M.R. (2010). Activation of the MCM2-7 Helicase by Association with Cdc45 and GINS Proteins. *Mol. Cell.* 37:247–258.
- Ilves, I., Tamberg, N. & Botchan, M.R. (2012). Inaugural Article: Checkpoint kinase 2 (Chk2) inhibits the activity of the Cdc45/MCM2-7/GINS (CMG) replicative helicase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:13163–13170.
- Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., Arai, K.I. & Masai, H. (2001). Biochemical Activities Associated with Mouse Mcm2 Protein. *J. Biol. Chem.* 276:42744–42752.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D. & Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13:76–86.
- Jaramillo, M.C. & Zhang, D.D. (2013). The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev.* 27:2179–2191.
- Jenkinson, E.R. & Chong, J.P.J. (2006). Minichromosome maintenance helicase activity is controlled by N- and C-terminal motifs and requires the ATPase domain helix-2 insert. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:7613–7618.
- Kang, M.-I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.-G. & Yamamoto, M. (2004). Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:2046–2051.
- Kansanen, E., Kuosmanen, S.M., Leinonen, H. & Levonenn, A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1:45–49.

- Katsube, T., Mori, M., Tsuji, H., Shiomi, T., Wang, B., Liu, Q., Neno, M. & Onoda, M. (2014). Most hydrogen peroxide-induced histone H2AX phosphorylation is mediated by ATR and is not dependent on DNA double-strand breaks. *J. Biochem.* 156:85–95.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N. & Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47:89–116.
- Kimura, H., Ohtomo, T., Yamaguchi, M., Ishii, a & Sugimoto, K. (1996). Mouse MCM proteins: complex formation and transportation to the nucleus. *Genes Cells.* 1:977–993.
- Kobayashi, A., Kang, M., Okawa, H., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K. & Ohtsuji, M. (2004). Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 24:7130–7139.
- Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., Nakayama, Y., Eguchi, M., Wada, Y., Kumagai, Y. & Yamamoto, M. (2009). The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol. Cell. Biol.* 29:493–502.
- Kunkel, T.A. & Burgers, P.M. (2008). Dividing the workload at a eukaryotic replication fork. *Trends Cell Biol.* 18:521–7.
- Labib, K., Diffley, J.F. & Kearsey, S.E. (1999). G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus. *Nat. Cell Biol.* 1:415–22.
- Labib, K., Kearsey, S.E. & Diffley, J.F. (2001). MCM2-7 proteins are essential components of prereplicative complexes that accumulate cooperatively in the nucleus during G1-phase and are required to establish, but not maintain, the S-phase checkpoint. *Mol. Biol. Cell.* 12:3658–3667.
- Lau, A., Tian, W., Whitman, S.A. & Zhang, D.D. (2013). The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not. *Antioxid. Redox Signal.* 18:91–3.
- Lavin, M.F. (2008). Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:759–69.
- Lawless, C., Wang, C., Jurk, D., Merz, A., Zglinicki, T. Von & Passos, J.F. (2010). Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp. Gerontol.* 45:772–778.
- Lee, K.Y., Bang, S.W., Yoon, S.W., Lee, S.-H., Yoon, J.-B. & Hwang, D.S. (2012). Phosphorylation of ORC2 Protein Dissociates Origin Recognition Complex from Chromatin and Replication Origins. *J. Biol. Chem.* 287:11891–11898.
- Leonard, A.C. & Méchali, M. (2013). DNA replication origins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:a010116.
- Liku, M.E., Nguyen, V.Q., Rosales, A.W., Irie, K. & Li, J.J. (2005). CDK phosphorylation of a novel NLS-NES module distributed between two subunits of the Mcm2-7 complex prevents chromosomal rereplication. *Mol. Biol. Cell.* 16:5026–39.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L.A. & Elledge, S.J. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 14:1448–59.

- Liu, E., Li, X., Yan, F., Zhao, Q. & Wu, X. (2004). Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation. *J. Biol. Chem.* 279:17283–8.
- Lo, S.C. & Hannink, M. (2006). PGAM5, a Bcl-XL-interacting protein, is a novel substrate for the redox-regulated Keap1-dependent ubiquitin ligase complex. *J. Biol. Chem.* 281:37893–37903.
- Ma, Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53:401–26.
- Ma, Q. (2010). Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. *Pharmacol. Ther.* 125:376–393.
- Mahbubani, H.M., Chong, J.P., Chevalier, S., Thömmes, P. & Blow, J.J. (1997). Cell cycle regulation of the replication licensing system: involvement of a Cdk-dependent inhibitor. *J. Cell Biol.* 136:125–35.
- Maine, G.T., Sinha, P. & Tye, B.W. (1984). Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics.* 106:365–385.
- Maric, M., Maculins, T., De Piccoli, G. & Labib, K. (2014). Cdc48 and a ubiquitin ligase drive disassembly of the CMG helicase at the end of DNA replication. *Science* (80-. ). 346:1253596–1253596.
- Martindale, J.L. & Holbrook, N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192:1–15.
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N. & Oda, M. (2010). Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu. Rev. Biochem.* 79:89–130.
- Mello Filho, a C., Hoffmann, M.E. & Meneghini, R. (1984). Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem. J.* 218:273–275.
- Méndez, J. & Stillman, B. (2000). Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 20:8602–8612.
- Méndez, J., Zou-Yang, X.H., Kim, S.-Y., Hidaka, M., Tansey, W.P. & Stillman, B. (2002). Human Origin Recognition Complex Large Subunit Is Degraded by Ubiquitin-Mediated Proteolysis after Initiation of DNA Replication. *Mol. Cell.* 9:481–491.
- Moreno, S.P., Bailey, R., Campion, N., Herron, S. & Gambus, A. (2014). Polyubiquitylation drives replisome disassembly at the termination of DNA replication. *Science.* 346:477–81.
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G. & Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:220–228.
- Nguyen, V.Q., Co, C., Irie, K. & Li, J.J. (2000). Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Curr. Biol.* 10:195–205.
- Nguyen, V.Q., Co, C. & Li, J.J. (2001). Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature.* 411:1068–1073.
- Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C.B. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 284:13291–13295.
- O'Donnell, M., Langston, L. & Stillman, B. (2013). Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.:

- Ogura, T., Tong, K.I., Mio, K., Maruyama, Y., Kurokawa, H., Sato, C. & Yamamoto, M. (2010). Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:2842–2847.
- Pasion, S.G. & Forsburg, S.L. (1999). Nuclear localization of *Schizosaccharomyces pombe* Mcm2/Cdc19p requires MCM complex assembly. *Mol. Biol. Cell.* 10:4043–4057.
- Pickart, C.M. (2001). Ubiquitin Enters the New Millennium. *Mol. Cell.* 8:499–504.
- Porter, a G. & Jänicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6:99–104.
- Prokhorova, T.A. & Blow, J.J. (2000). Sequential MCM/P1 Subcomplex Assembly Is Required to Form a Heterohexamer with Replication Licensing Activity. *J. Biol. Chem.* 275:2491–2498.
- Pruitt, S.C., Bailey, K.J. & Freeland, A. (2007). Reduced Mcm2 expression results in severe stem/progenitor cell deficiency and cancer. *Stem Cells.* 25:3121–3132.
- Ralph, E., Boye, E. & Kearsley, S.E. (2006). DNA damage induces Cdt1 proteolysis in fission yeast through a pathway dependent on Cdt2 and Ddb1. *EMBO Rep.* 7:1134–1139.
- Randell, J.C.W., Bowers, J.L., Rodríguez, H.K. & Bell, S.P. (2006). Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Mol. Cell.* 21:29–39.
- Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J.D., Morris, E.P. & Diffley, J.F.X. (2009). Concerted Loading of Mcm2-7 Double Hexamers around DNA during DNA Replication Origin Licensing. *Cell.* 139:719–730.
- Saha, T., Ghosh, S., Vassilev, A. & DePamphilis, M.L. (2006). Ubiquitylation, phosphorylation and Orc2 modulate the subcellular location of Orc1 and prevent it from inducing apoptosis. *J. Cell Sci.* 119:1371–82.
- Samel, S.A., Fernández-Cid, A., Sun, J., Riera, A., Tognetti, S., Herrera, M.C., Li, H. & Speck, C. (2014). A unique DNA entry gate serves for regulated loading of the eukaryotic replicative helicase MCM2-7 onto DNA. *Genes Dev.* 28:1653–66.
- Sanchez, Y. (1997). Conservation of the Chk1 Checkpoint Pathway in Mammals: Linkage of DNA Damage to Cdk Regulation Through Cdc25. *Science (80-. ).* 277:1497–1501.
- Sasaki, M., Kajiya, H., Ozeki, S., Okabe, K. & Ikebe, T. (2014). Reactive oxygen species promotes cellular senescence in normal human epidermal keratinocytes through epigenetic regulation of p16INK4a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452:622–628.
- Schulte, D., Burkhart, R., Musahl, C., Hu, B., Schlatterer, C., Hameister, H. & Knippers, R. (1995). Expression, phosphorylation and nuclear localization of the human P1 protein, a homologue of the yeast Mcm 3 replication protein. *J. Cell Sci.* 108 ( Pt 4:1381–1389.
- Schwab, B.L., Leist, M., Knippers, R. & Nicotera, P. (1998). Selective proteolysis of the nuclear replication factor MCM3 in apoptosis. *Exp. Cell Res.* 238:415–421.
- Shima, N., Alcaraz, A., Liachko, I., Buske, T.R., Andrews, C. a, Munroe, R.J., Hartford, S. a, Tye, B.K. & Schimenti, J.C. (2007). A viable allele of Mcm4 causes chromosome instability and mammary adenocarcinomas in mice. *Nat. Genet.* 39:93–98.
- Siddiqui, K., On, K.F. & Diffley, J.F.X. (2013). Regulating DNA replication in Eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.:

- Sørensen, C.S., Syljuåsen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Rönstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.-B., Bartek, J. & Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell*. 3:247–258.
- Speck, C., Chen, Z., Li, H. & Stillman, B. (2005). ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:965–71.
- Speck, C. & Stillman, B. (2007). Cdc6 ATPase Activity Regulates ORC{middle dot}Cdc6 Stability and the Selection of Specific DNA Sequences as Origins of DNA Replication. *J. Biol. Chem.* 282:11705–11714.
- Stoeber, K., Tlsty, T.D., Happerfield, L., Thomas, G. a, Romanov, S., Bobrow, L., Williams, E.D. & Williams, G.H. (2001). DNA replication licensing and human cell proliferation. *J. Cell Sci.* 114:2027–2041.
- Sugimoto, N., Tatsumi, Y., Tsurumi, T., Matsukage, A., Kiyono, T., Nishitani, H. & Fujita, M. (2004). Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding. *J. Biol. Chem.* 279:19691–7.
- Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.-J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.-G. & Landegren, U. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat. Methods*. 3:995–1000.
- Symeonidou, I.-E., Kotsantis, P., Roukos, V., Rapsomaniki, M.-A., Grecco, H.E., Bastiaens, P., Taraviras, S. & Lygerou, Z. (2013). Multi-step loading of human minichromosome maintenance proteins in live human cells. *J. Biol. Chem.* 288:35852–67.
- Zegerman, P. & Diffley, J.F.X. (2010). Checkpoint-dependent inhibition of DNA replication initiation by Sld3 and Dbf4 phosphorylation. *Nature*. 467:474–478.
- Zeman, M.K. & Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nat. Cell Biol.* 16:2–9.
- Takei, Y. & Tsujimoto, G. (1998). Identification of a novel MCM3-associated protein that facilitates MCM3 nuclear localization. *J. Biol. Chem.* 273:22177–22180.
- Tognetti, S., Riera, A. & Speck, C. (2014). Switch on the engine: how the eukaryotic replicative helicase MCM2–7 becomes activated. *Chromosoma*. 124:13–26.
- Tong, K.I., Kobayashi, A., Katsuoka, F. & Yamamoto, M. (2006). Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: A hinge and latch mechanism. *Biol. Chem.* 387:1311–1320.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W. & Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:2040–2045.
- Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D.R., Harada, T., Engel, J.D. & Yamamoto, M. (2003). Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat. Genet.* 35:238–245.
- Wiese, A.G., Pacifici, R.E. & Davies, K.J. (1995). Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 318:231–40.

- Williams, G.H., Romanowski, P., Morris, L., Madine, M., Mills, A.D., Stoeber, K., Marr, J., Laskey, R.A. & Coleman, N. (1998). Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:14932–7.
- Williams, G.H. & Stoeber, K. (2007). Cell cycle markers in clinical oncology. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19:672–9.
- Wilmes, G.M., Archambault, V., Austin, R.J., Jacobson, M.D., Bell, S.P. & Cross, F.R. (2004). Interaction of the S-phase cyclin Clb5 with an “RXL” docking sequence in the initiator protein Orc6 provides an origin-localized replication control switch. *Genes Dev.* 18:981–91.
- Wohlschlegel, J. a, Dwyer, B.T., Dhar, S.K., Cvetic, C., Walter, J.C. & Dutta, a (2000). Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science.* 290:2309–2312.
- Woodward, A.M., Göhler, T., Luciani, M.G., Oehlmann, M., Ge, X., Gartner, A., Jackson, D. a. & Blow, J.J. (2006). Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *J. Cell Biol.* 173:673–683.
- Yamaguchi, R. & Newport, J. (2003). A role for Ran-GTP and Crm1 in blocking re-replication. *Cell.* 113:115–125.
- Yeeles, J.T.P., Deegan, T.D., Janska, A., Early, A. & Diffley, J.F.X. (2015). Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature.* .
- Yekezare, M., Gómez-González, B. & Diffley, J.F.X. (2013). Controlling DNA replication origins in response to DNA damage - inhibit globally, activate locally. *J. Cell Sci.* 126:1297–1306.
- Young, M.R., Suzuki, K., Yan, H., Gibson, S. & Tye, B.K. (1997). Nuclear accumulation of *Saccharomyces cerevisiae* Mcm3 is dependent on its nuclear localization sequence. *Genes Cells.* 2:631–643.

## VEEBIAADRESSID

Inimese GINS valkude nimetamine:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9837#reference-sequences> (kuupäev 13.05.15)

Tausta suhtes korrigeeritud MCM3 fluorestsentsignaali intensiivsuse arvutamine tuumas:

<http://sciencetechblog.com/2011/05/24/measuring-cell-fluorescence-using-imagej/> (kuupäev 13.05.15)

# LISAD

## Lisa 1

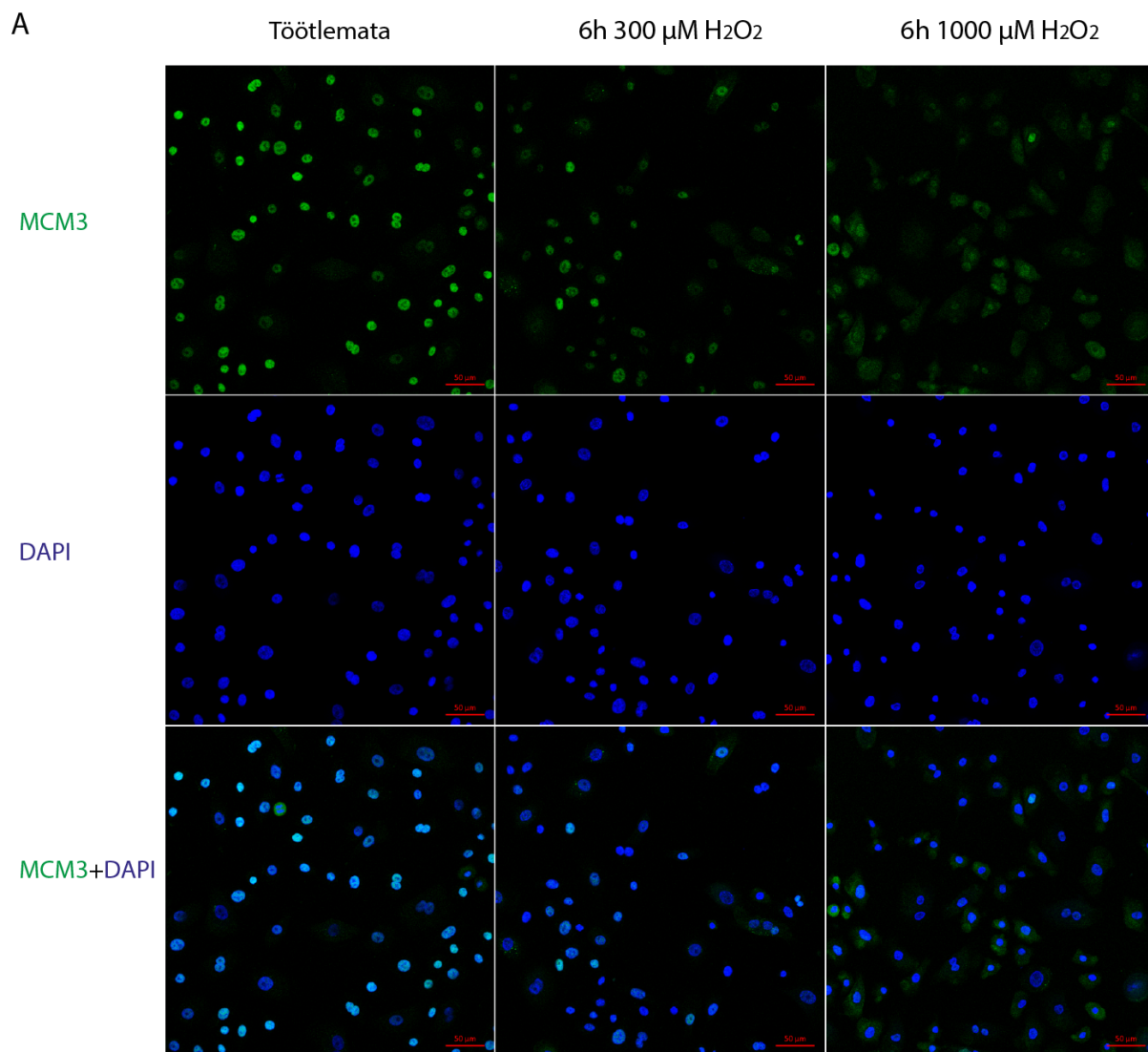
### Immunofluorestsentsanalüüsi eksperimentaalne kirjeldus

Kaks päeva enne rakkude fikseerimist, külvati immunofluorestsentsanalüüsiks 24 auguga plaadi augu põhjas olevale katteklaasile 60 tuhat rakku. Vajadusel lisati rakkudele 6 h enne fikseerimist 300  $\mu\text{M}$  või 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  lõppkontsentratsiooni saamiseks 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  lahust PBS-is. Enne fikseerimist pesti katteklaasile kinnitunud rakke PBS-iga ja fikseeriti 4% paraformaldehüüdiga 20 min. Edasi pesti katteklaase kolm korda 5 min jääkülma PBS-iga ning permeabiliseeriti 5 min 0,1% Triton-X PBS lahuses. Seejärel pesti katteklaase kolm korda 5 min PBS-is. Antikeha ebaspetsiifilise seondumise ärahoidmiseks blokeeriti rakke 37°C juures niisutuskambris 45 min blokeerimislahusega (1% BSA, 0,1% Tween 20, 22,54 mg/ml glütsiin PBS-is). Peale blokeerimist inkubeeriti rakke 1 tund toatemperatuuril 1:50 lahjendusega primaarse MCM3 antikeha (Santa Cruz Biotechnology) lahuses (1% BSA, 0,1% Tween 20 PBS-is). Peale seda pesti rakke 3x5 min PBS-is. Edasi lisati katteklaasidele Alexa Fluor-488 konjugeeritud eesli sekundaarse IgG antikeha (Thermo Fisher Scientific) 1:1000 lahjendusega lahus (1% BSA, 0,1% Tween 20 PBS-is) ning inkubeeriti 40 min toatemperatuuril. Sekundaarse antikeha lahus pesti maha 3x5 min PBS-iga. Katteklaasid kuivatati toatemperatuuril ning asetati koos DAPI-t sisaldava sulunduslahusega (*Duolink In Situ Mounting Medium*, Sigma Aldrich) alusklaasile. Preparaatide jäädvustamiseks kasutati Zeiss LSM 710 konfokaalmikroskoopi. Piltide analüüsil kasutati ImageJ programmi, kus vaatevälja kohta jäädvustatud kihid liideti ja tuuma piirkonnast mõõdeti MCM3 signaali intensiivsus. Iga pildi taustalt mõõdeti ka 6 tausta fluorestsentsi intensiivsuse väärtust. Andmeid analüüsiti Microsoft Excelis kirjeldatud meetodil<sup>2</sup>. Tausta suhtes parandatud MCM3 tuuma fluorestsentssignaali intensiivsuse graafik koostati GraphPad Prism (GraphPad Software, Ameerika Ühendriigid) tarkvaraga. Esitatud tulemused on pärit kahest katse kordusest.

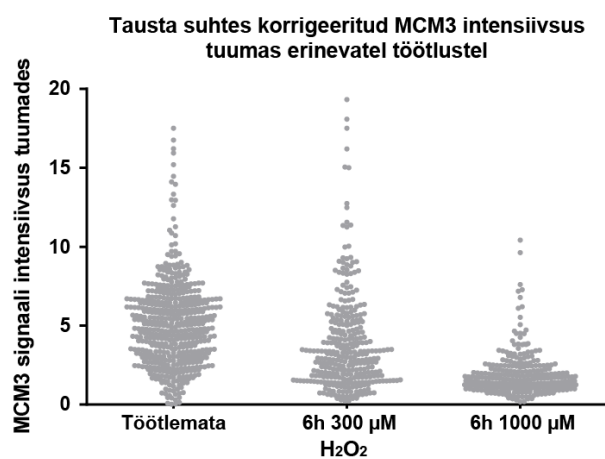
---

<sup>2</sup> <http://sciencetechblog.com/2011/05/24/measuring-cell-fluorescence-using-imagej/>

## Immunofluorestsentsanalüüsi tulemused

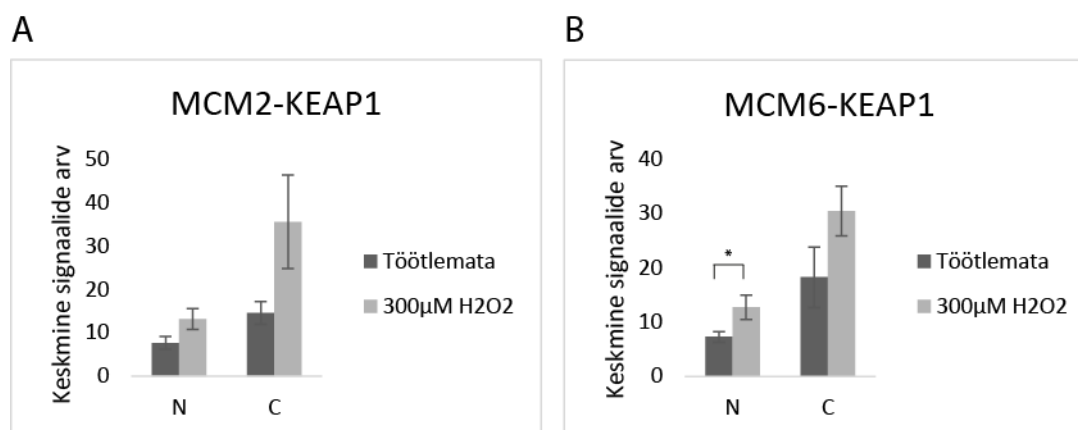


B

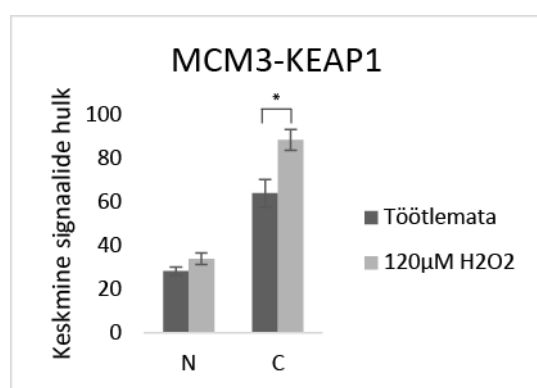


**Joonis 1. 300 ja 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga mõjutamisel väheneb MCM3 tase tuumades.** A) Fikseeritud ja permeabiliseeritud rakkude immunofluorestsentsanalüüs MCM3 spetsiifilise primaarse ning vastava Alexa-488 konjugeeritud sekundaarse antkehaga (roheline). 6h 300 või 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga töödeldud rakke võrreldi töötlemata rakkudega MCM3 lokalisatsiooni suhtes. DAPI (sinine) visualiseerib rakkude tuumad. Mõõtjoon on 50  $\mu\text{m}$ . B) Tuumadest pärit MCM3 signaalide intensiivsused töötlemata ning 6h 300 või 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -ga töödeldud rakkudes. Tulemused on saadud kahe katse korduse 2-3 pildi põhjal.

## Lisa 2



**Joonis 1. A) 6 h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ei mõjuta KEAP1 lähedust MCM2 ning B) MCM6-ga märkimisväärselt.** A) Tuuma (N) ja tsütoplasma (C) keskmine MCM2 ja KEAP1 läheduse PLA signaalide hulk töötlemata ja 6 h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga töödeldud rakkudes. B) Tuuma (N) ja tsütoplasma (C) keskmine MCM6 ja KEAP1 läheduse PLA signaalide hulk töötlemata ja 6 h 300 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga töödeldud rakkudes. Keskmine PLA signaalide hulk tuumas ja tsütoplasmas saadi nii MCM2 ja KEAP1 kui MCM6 ja KEAP1 läheduse analüüsil ühe katse korduse proovide 5-6 pildi põhjal ImageJ programmiga. Keskvärtuse hajuvust iseloomustab standardviga, \* tähistab p-väärtust < 0,05.



**Joonis 2. 6 h 120 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ei muuda KEAP1 ja MCM3 interaktsioonide arvu märkimisväärselt.** Tuuma (N) ja tsütoplasma (C) keskmine MCM3 ja KEAP1 interaktsioonide PLA signaalide hulk töötlemata ja 6 h 120 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga töödeldud rakkudes. Keskmine PLA signaalide hulk tuumas ja tsütoplasmas saadi ühe katse korduse proovide 5 pildi põhjal ImageJ programmiga. Keskvärtuse hajuvust iseloomustab standardviga, \* tähistab p-väärtust < 0,05.

## LIHTLITSENTS

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Siret Somarokov (sünnikuupäev: 15.11.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Muutused replikaativse helikaasi subühikute MCM3 ja MCM7 lokaliseerimise ning interaktsioonis sensorvalguga KEAP1 vastusena oksüdatiivsele stressile“, mille juhendaja on Ivar Ilves,
  - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 1.07.2017 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, 26.5.15