

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

Allan Reinapae

**Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorite roll pagaripärmi
(*Saccharomyces cerevisiae*) DNA replikatsiooni regulatsioonis**

Magistritöö

Juhendajad: *PhD* Arnold Kristjuhan
PhD Marko Lõoke

TARTU 2013

Sisukord

Sisukord	2
Kasutatud lühendid	3
Sissejuhatus	4
1. Kirjanduse ülevaade	5
1.1 Replikatsiooni alustamine	5
1.2 Pre-replikatiivse kompleksi moodustumine	6
1.3 Mcm2-7 kompleksi aktivatsioon	8
1.4 Re-replikatsiooni takistamine	10
1.5 Replikatsiooni alguspunktide aktivatsiooni ajastus ja efektiivsus	11
1.6 Kromatiini mõju replikatsiooni initsiatsioonile	11
1.7 Replikatsioonifaktorite limiteeriv hulk	13
1.8 Pagaripärmi Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorid	14
2. Eksperimentaalosa	16
2.1 Töö eesmärgid	16
2.2 Materjal ja meetodika	16
2.2.1 Kasutatud söötmed	16
2.2.2 Tüvede valmistamine	16
2.2.3 Transformatsioon	18
2.2.4 Western Blot	19
2.2.5 Läbivoolutsütomeetria	20
2.2.6 Kromatiini immunosadestamine (CHIP)	20
2.2.6.1 Pärmirakulüsaadi valmistamine	20
2.2.6.2 Immunopretsipitatsioon (IP)	21
2.2.6.3 Kvantitatiivne PCR (qPCR)	22
2.3 Tulemused	23
2.3.1 Epitoobi lisamise kontroll	23
2.3.2 CHIP	24
2.3.2.1 Rakutsükli analüüs	24
2.3.2.2 Forkhead perekonna valkude seondumine positiivsetele kontrollidele	25
2.3.3 Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorite seondumine replikatsiooni alguspunktidega	27
2.4 Arutelu	32
Kokkuvõte	35
Summary	36
Kirjanduse loetelu	38
Lisad	45

Kasutatud lühendid

ACS – ORC-i konsensusjärjestus

ARS – replikatsiooni alguspunkt (*Autonomously replicating sequence*)

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

Cdt1 – *chromatin licensing and DNA replication factor 1*

CMG – Cdc45-MCM-GINS kompleks

Dbf4 – *DumbBell Forming 4*

DDK – *Dbf4-dependent kinase* (Dbf4- sõltuv kinaas)

Dpb11 – *DNA Polymerase B (II)*

Fkh1/2 – Forkhead transkriptsioonifaktorid 1/2

GINS – *Go-Ichi-Ni-San* kompleks (Jaapani keeles 5,1,2,3)

MCM – *Mini Chromosome Maintenance*

Mcm2-7*head-to-head* konformatsioon – Mcm2-7 kompleks ühendatud N terminaalsete osadega

NAT – *Nourseothricin* (anitbioonikum)

ORC – *Origin Recognition Complex* (*origin*'i äratundev kompleks)

Origin – replikatsiooni alguspunkt

Pre-RC – *Pre-replication complex* (pre-replikatiivne kompleks)

Psf – Sld5 partner (*partner of Sld5*)

Replisoom – valgukomplekside kooslus, mis on võimeline autonoomselt DNA-d replitseerima.

Sld2/3 – *Synthetically Lethal with Dpb11-1 2/3*

TF – transkriptsiooni faktor

Wt – metsiktüüpi (*Wild Type*)

Ülereplikatsioon – Replikatsiooni initsieerimine rohkem, kui kord rakutsükli

YNB – *yeast nitrogen base* (pärmilämmastiku alus)

YPD – *yeast extract, peptone, dextrose* (pärmiekstrakt, peptoon, dekstroos)

α -faktor – paardumishormoon (*Mating pheromene*)

Sissejuhatus

DNA replikatsiooniks nimetatakse protsessi, mille abil sünteesitakse ühest DNA molekulist kaks identse nukleotiidses järjestuses molekuli. Seega omab see konserveeritud protsess rakude jagunemisel kesksel rolli. Seoses elu keerukuse kasvuga eukarüootide ilmumisel suurenes ka nende genoomi märkimisväärselt. Et tagada suure genoomi kiire duplitseerumine on DNA replikatsiooni mehhanism arenenud selliseks, et DNA sünteesi alustatakse üle genoomi paljudest piirkondadest. Replikatsiooni alustamine omakorda on jaotunud kahte etappi. Esiteks laetakse võimalikele replikatsiooni alguspunktile valgukompleks, DNA helikaas. Teise etapina leiab aset helikaasi aktiveerimine, mis toimub kinaaside vahendusel. See käivitab funktsionaalse replikatsioonikahvli assambleerumise, mis viib läbi DNA sünteesi.

Replikatsiooni on enim uuritud mudelorganismil *Saccharomyces cerevisiae*, mistõttu on just pagaripärmis kõige rohkem infot replikatsiooniga toimuva osas ja seega on see organism üks sobivamatest mudelitest uurimaks replikatsiooni. Üks ebaselgemaid aspekte DNA sünteesil on kontroll replikatsiooni alustamise ajalise regulatiooni üle. Mis täpselt määrab replikatsiooni algupunkti aktiveerumise ning sünteesi alustamise aja S-faasis ei ole lõplikult teada.

Käesoleva magistritöö teoreetilises osas antakse ülevaade pagaripärmi replikatsiooni alguspunktidest, DNA replikatsiooni initsiatsioonist ning replikatsiooni ajastust ja efektiivsust määravatest teguritest. Eksperimentaalses osas aga uuritakse Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorite *origin*'idele seondumise dünaamikat S-faasis.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Replikatsiooni alustamine

Seoses elu keerukuse kiire kasvuga päristuumsete rakkude ilmumisel, arenes ka eukarüootse raku genoom suurenemaks. Erinevalt prokarüootidest, kus replikatsiooni alustatakse ühelt lookuselt, on eukarüootide genoomis sadu erinevaid replikatsiooni alguspunkte. Selline muutus võimaldab eukarüootidel oma DNA mõistliku ajaga paljundada. Pagaripärmis nimetatakse replikatsiooni alguspunkte (*origin'e*) ka autonoomselt replitseeruvateks järjestusteks (*ARS-autonomously replicating sequence*). Esimene ARS avastati, kui 1400 nukleotiidi pikkune *Saccharomyces cerevisiae* tsentromeeri lähedane genoomne järjestus, mis andis plasmiidile võime autonoomselt replitseeruda pagaripärmis (Struhl et al. 1979). Võrreldes *E. coli* genoomiga asetsevad *origin*'id pärmi kromosoomides 100 korda tihedamalt. See on vajalik kompenseerimaks erinevusi replikatsioonikahvli liikumiskiiruses (Raghuraman et al. 2001; Rivin & Fangman 1980). Replikatsiooni initsieerimiseks ARS-idelt on vajalik erinevate valgukomplekside seondumine nendele järjestustele (Bell & Dutta 2002). Selleks tuleb pagaripärmi 12 miljoni aluspaari suurusest genoomist selekteerida mõnisada lookust, millelt DNA replikatsiooni alustatakse (Goffeau et al. 1996). See saavutatakse evolutsioonis konserveerunud valgukompleksi, ORC kompleksi (*Origin Recognition Complex*), seondumisega ARS järjestustele.

ARS on pagaripärmis keskmiselt 200 aluspaari pikkune järjestus. See sisaldab liigi piires konserveerunud A ehk ACS saiti (*ACS-ARS Consensus Sequence*), mille nukleotiidne järjestus on (T/A)TTTAT(A/G)TTT(T/A). Nimetatud element leiti otsides konserveerunud järjestusi teadaolevatest ARS-idest (Theis & Newlon 1997). Hilisema töö kohaselt on mõlemal pool ACS saiti 3 esimest nukleotiidi olulised, millest lähtuvalt postuleeriti 17 bp pikkune ACS. Kusjuures mõne nukleotiidiline erinevus A saidis ei riku selle funktsionaalsust (Bell & B Stillman 1992). A saidile seondubki evolutsioonis konserveerunud kuue subühikuline ORC kompleks (*Origin Recognition Complex*). Pagaripärmis on ORC-i konsensujärjestuseid ehk ACS saite 12000, kuid efektiivseid replikatsiooni alguspunkte vaid ~400 (Nieduszynski et al. 2006). Arvestades eelnevat peab ORC kompleksi seondumine DNA-le ja sellelt replikatsiooni alustamine olema keerulisem ning eksisteerima lisafaktoreid, mis määravad replikatsiooni initsiatsiooni.

Seetõttu saab väita, et ACS element on hädavajalik, kuid ebapiisav alustamaks replikatsiooni. Lisaks ACS-ile on leitud 3 olulist *cis*- funktsioneerivat B elementi. B1-l on näidatud osalust ORC-i seondumisel (Rowley et al. 1995; Marahrens & Stillman 1992) ja B2 element soodustab DNA dupleksi avamist ARS regioonis (Matsumoto & Ishimi 1994). Lisaks on teada, et transkriptsioonifaktori seandumine B3 elemendile soodustab ARS-i aktiveerimist, kuid selle täpsed mehhanismid on ebaselged. Kusjuures seondatav faktor ei ole määrav. Vahetades B3 elemendi konsensusjärjestuse teise B3 elemendiga, ei mõjuta see muteeritud ARS-i aktivatsiooni (Marahrens & B Stillman 1992). Transkriptsioonifaktorite mõju arvatakse põhinevat asjaolul, et need toovad kohale kromatiini remodelleerivad kompleksid, histooni modifitseerijad või suurendavad valkude ligipääsu ARS-idele teiste teadmata mehhanismide kaudu (Flanagan & Peterson 1999; Venditti et al. 1994). Seda toetab ka töö, kus näidatakse, et kromatiini lahtipakkumine põhjustab initsiatsiooni nihkumist varasemaks (Vogelauer et al. 2002).

Kokkuvõtvalt soodustab ACS-i töötamist replikatsiooni alguspunktina väiksem erinevus heast ORC-i siduvast järjestusest, DNA dupleksi ebastabiilsus ning transkriptsioonifaktori seandumine ARS-ile. Kirjeldatud elementidest on teada konsensusjärjestus ainult ORC-i seandumiseks. B1, B2 ja B3 elementidel ei ole selget konsensusjärjestust ARS-ide vahel ja seega ei ole pagaripärmis ka kahte identset ARS-i, mis tähendab, et iga *origin*'i replikatsiooni algatusvõime on tagatatud kirjeldatud elementide kombinatsiooniga.

1.2 Pre-replikatiivse kompleksi moodustumine

Esimesed ettevalmistused replikatsiooniks tehakse vahetult pärast eelmist DNA sünteesi, mil *origin*'idega seonduvad ORC kompleksid. M/G1 faasi üleminekul lisandub *origin*'idele valgukompleks Mcm2-7. Seda protsessi nimetatakse pre-replikatiivse kompleksi moodustumiseks (pre-RC). Selleks seonduvad *origin*'ile lisaks ORC kompleksile valgud Cdt1 ja Cdc6 ning laadivad DNA-le Mcm2-7 helikaasi. Protsessis on oluline ka ATP sidumine ja hüdroolüüs Cdc6 ja ORC kompleksi poolt. Hiljem, üleminekul S-faasi tuleb replikatsiooni alustamiseks kirjeldatud pre-RC aktiveerida kinaaside vahendusel.

Pre-replikatiivse kompleksi moodustumiseks ehk replikatsiooni alguspunkti litsenseerimiseks peavad ORC ja helikaas seonduma ARS-iga. Replikatsiooni alguspunkte äratundev ORC kompleks koosneb kuuest subühikust (Orc1-Orc6) ning on seotud DNA-ga kogu rakutsükli jooksul, mis tähendab, et ORC seondub vahetult pärast DNA lõigu

duplitseerimist uuesti. (Liang & Stillman 1997; Drury et al. 2000). DNA-l ettenähtud *origin*'ile seondumiseks peab ORC kompleksis olev subühik Orc6 olema seotud ATP-ga, kusjuures tähtis on seose säilimine, mitte sideme hürdolüüs (Bell & Stillman 1992; Klemm et al. 1997). Subühikud (Orc1-Orc5) on vajalikud seondumaks DNA-ga, nendest nelja puhul (Orc1,2,4,5) on näidatud vahetat interaktsiooni DNA-ga (Lee & Bell 1997). Ainuke subühik, mida ORC ei vaja DNA-le seondumiseks on Orc6, kuid seegi on hädavajalik DNA replikatsiooni edukaks toimumiseks (Li & Herskowitz 1993). Lisaks ORC kompleksile on replikatsiooni initsiatsiooniks vajalik ka Cdc6 valk, mis liidetakse ORC-ile siis, kui moodustunud ORC on seondunud *origin* 'ile. Cdc6 lisandumine stabiliseerib ORC-i ja ARS-i vahelist kontakti ja pärsib ORC-i translokeerumist ebaspetsiifilisele DNA-le. Lisaks on Cdc6 assotsiatsioon tähtis järgneva hädavajalikuks Cdt1 seondumiseks ja seega ka edasiseks replikatsiooni initsiatsiooniks (Remus et al. 2009; Donovan et al. 1997; Evrin et al. 2009; Mizushima et al. 2000; Harvey & Newport 2003; Frigola et al. 2013).

Cdc6 ja Cdt1 on mõlemad vajalikud Mcm2-7 helikaasi seondumiseks replikatsiooni alguspunktile. Pagaripärmis moodustavad Mcm2-7 ja Cdt1 stabiilse kompleksi ja värvatakse sellisena ARS-ile, kusjuures oluline on Cdt1 ja Cdc6 vaheline interaktsioon (Chen & Bell 2011). Cdc6 vahendatud ATP hürdolüüs katalüüsib Cdt1-Mcm2-7 kompleksi laadimist ARS-ile, mis põhjustab Cdc6 ja Cdt1 dissotsiatsiooni ARS-ilt (Randell et al. 2006). Lisaks on näidatud, et ORC-iga seotud ATP hürdolüüsimine on vajalik korduvaks Mcm2-7 heksameeri paigutamiseks DNA-le. Helikaasi lisamisega loetakse pre-RC kompleksi valminuks. Seda arvestatakse nii seetõttu, et kompleks on stabiilne ega ole enam eemaldatav tugeva soolalahuse pesuga (Donovan et al. 1997; Frigola et al. 2013).

In vitro elektronmikroskoopia katsed näitavad, et Mcm2-7 laetakse DNA-le kaksik-heksameerse kompleksina. Samuti on leitud, et helikaas eksisteerib *head-to-head* konformatsioonis ning moodustab kompleksi N-terminuste vahendusel. Elektronmikroskoopia katsed näitavad ka, et helikaas laetakse DNA-le nii, et see ümbritseb mõlemat DNA ahelat ning on võimeline piki nukleiinhapet liikuma. Selline liikumisvabadus annab ka võimaliku seletuse, kuidas on võimalik laadida DNA-le rohkem helikaase, kui on genoomis funktsionaalseid replikatsiooni alguspunkte (Remus et al. 2009; Donovan et al. 1997; Evrin et al. 2009).

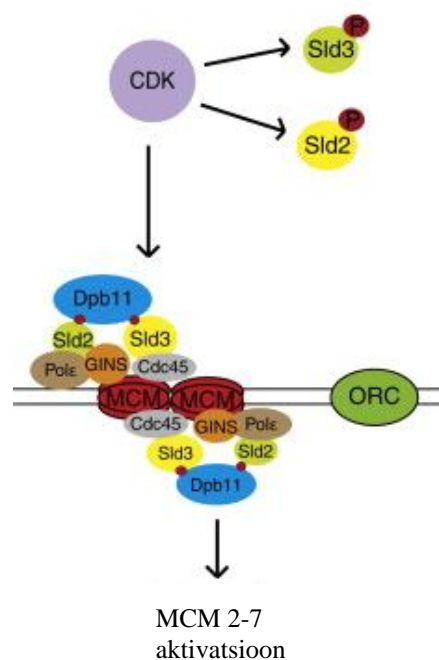
1.3 Mcm2-7 kompleksi aktivatsioon

Replikatsiooni alustamiseks tuleb G1 faasis ARS-ile asetunud Mcm2-7 kompleks S-faasis aktiveerida. Replikatsiooni initsieerimine toimub CDK ja DDK kinaaside vahendusel. DDK kinaasi peamiseks substraadiks on Mcm2-7 kompleks ise ja CDK sõltuvad fosforüleerimised tagavad vajalike lisafaktorite kaasamise replikatsioonikompleksi.

Mcm2-7 kompleks arvatakse olevat replikatiivne helikaas. Selleks veendumuseks on mitmeid põhjuseid. Esiteks liigub Mcm2-7 kompleks ühes replikatsioonikahvliga. Selle eeldatava helikaasi inaktiveerimine põhjustab replisoomi (ensüümkompleks, mis sisaldab ühte funktsionaalset replikatsioonikahvli) peatumise. Samuti näitavad *in vitro* katsed, et puhastatud Mcm2-7 kompleksi valgud ilmutavad nõrku helikaasseid omadusi (Gambus et al. 2006; Aparicio et al. 1997; Pacek & Walter 2004; Labib et al. 2000; Bochman & Schwacha 2008). Siiski on Mcm2-7 kompleksi täielikuks aktivatsiooniks vaja lisafaktorite seondumine. Praegused andmed näitavad, et aktiivne eukarüootne helikaas koosneb vähemalt kolmest komponendist, Cdc45 valgust ning Mcm2-7 ja GINS kompleksidest (Joonis 1). GINS (*Go*-viis, *Ichi*-üks, *Nii*-kaks, *San*-kolm) kompleks koosneb 4 erinevast valgust – Sld5, Psf1, Psf2, Psf3 (*Psf-partner of Sld5*), mis on kõik tugevalt konserveerunud eukarüootsetes rakkudes (Takayama et al. 2003). Aktiivset helikaasi nimetatakse CMG (Cdc45-MCM-GINS) kompleksiks ning see on mitusada korda suurema helikaasse aktiivsusega, kui Mcm2-7 üksi (Ilves et al. 2010; Pacek & Walter 2004; Moyer et al. 2006). CMG kompleksi kõikidel subühikutel on näidatud olulisust mitte ainult replikatsiooni initsiatsioonil, vaid ka elongatsioonil (Tercero et al. 2000; Kanemaki & Labib 2006; Aparicio et al. 1997).

Mcm2-7 kompleksi aktivatsioon toimub G1/S faasi üleminekul, kui aktiveeruvad CDK (*cyclin dependent kinase*) ja DDK-d (*Dbf4 dependent kinase*) kinaasid. Viimase aktivatsiooniks vajaliku partneri (Dbf4) tase tõuseb S faasi alguses (Heller et al. 2011; Ferreira et al. 2000). On leitud, et DDK fosforüleerib eelistatult stabiilselt DNA-l asetsevaid Mcm2-7 kompleksi subühikuid Mcm2, Mcm4 ja Mcm6 (Francis et al. 2009; Sheu & Stillman 2006; Masai et al. 2006). Dbf4 interakteerub mitmete ORC-i subühikutega suunates enda aktiveeritavat kinaasi spetsiifiliselt aktiveerima funktsionaalsel ARS-il olevat pre-RC-d (Varrin et al. 2005; Duncker et al. 2002). Ei ole suudetud täpselt näidata, kuidas DDK aktiveerib helikaasi, kuid usutakse, et post translatsiooniline modifikatsioon indutseerib konformatsioonilise muutuse Mcm2-7 kompleksis, mis võimaldab tal helikaasina käituda.

Lisaks DDK aktivatsioonile on DNA sünteesi alustamiseks vajalik ka CDK aktivatsioon. See toimub Clb5 ja Clb6 seondumisel CDK-le. Aktiveeritud kinaas omakorda fosforüleerib valgud Sld2 ja Sld3 (Zegerman & Diffley 2007) (Joonis 1). Sld3 interakteerub Sld7 ja Cdc45-ga ning kompleks asetseb ARS-il enne helikaasi aktiveerimist (Kamimura et al. 2001; Tanaka et al. 2011). Sld2 fosforüleerimine põhjustab selle seondumise Dbp11-ga. Viimane indutseerib DNA polümeraasi ϵ ja GINS kompleksi assotsieerumist. Kuna Dbp11 seondab ka fosforüleeritud Sld3-e siis CDK aktivatsioon põhjustabki suure valgukompleksi moodustamist ARS-ile (Muramatsu et al. 2010). Replikatsiooni initsiatsioonil Sld2, Sld3 ning Dbp11 dissotsieeruvad ega osale replisoomi moodustamisel ning ARS-ile jäävad seondunuks Cdc45, GINS ja Mcm2-7 valgud ja osalevad ka DNA replikatsiooni elongatsioonil (Muramatsu et al. 2010). Lisaks eelnevatele, on efektiivseks DNA replikatsiooni initsiatsiooniks vajalik ka konserveerunud valk Mcm10, mis osaleb pre-RC konverteerimisel aktiivseks replisoomiks. Mcm10 ülesanne on kompleksi tuua DNA polümeraasi α ning aktiveerida CMG kompleksi (Van Deursen et al. 2012; Watase et al. 2012; Kanke et al. 2012).



Joonis 1. Mcm2-7 kompleksi aktivatsioon. Replikatsiooni initsiatsioonil rakutsükli üleminekul S-faasi aktiveeritakse MCM2-7 helikaasi: pre-RC-ga seonduvad Sld2, Sld3 valgud, mis CDK-de poolt fosforüleeritakse, et need oleksid võimelised seostuma Dpb11-ga. DDK kinaasid fosforüleerivad Mcm2-7 kompleksi ning sellega seonduvad Mcm10, Cdc45 ja GINS kompleks, millest kaks viimast on MCM helikaasi otsesed kofaktorid.

1.4 Re-replikatsiooni takistamine

Pagaripärmi 12 Mbp duplitseerimine peab toimuma kiiresti ja ilma vigadeta. Selle saavutamiseks on eukarüootne organism võtnud kasutusele rohkelt replikatsiooni alguspunkte, mille aktiveerimine on väga täpselt reguleeritud. Ühelt genoomi segmendilt replikatsiooni alustamine rohkem kui üks kord rakutsüklis põhjustab ülereplitseerumist, mis tekitab genoomset ebastabiilsust. Vältimaks kromosomaalseid aberratsioone on eukarüootidel evolutsioneerunud mitmed kaitsestrateegiad, mis takistavad pre-replikatiivse kompleksi moodustumist. S-faasi algul aktiveeruv CDK suunab Cdc6 valgu lagundamisele ja inhibeerib selle ekspressiooni. Samuti eksporditakse tuumast välja Cdt1 koos Mcm2-7 kompleksiga.

Replikatsiooni toimumiseks peab ja tohib ARS-i litsenseerida rakutsüklis vaid üks kord. Rereplikatsiooni vältimiseks tuleb pre-RC moodustumine pärssida juba duplitseeritud DNA-l. On näidatud, et CDK aktivatsioon otseselt inhibeerib pre-RC assambleerumist (Dahmann et al. 1995). Esiteks CDK fosforüleerib Cdc6-te, mis märgib selle ubiquitüleerimisele, mis omakorda tingib järgneva proteosoom vahendatud lagundamise (Drury et al. 1997). Lisaks on demonstreeritud Cdc6 ekspressiooni tsüklilisust, mis saavutab maksimumi M/G1 üleminekuks. G1/S üleminekul CDK pärsib Cdc6 sünteesi ekspordides tuumast Cdc6 sünteesiks vajaliku transkriptsioonifaktori Swi5-e (McInerny et al. 1997; Moll et al. 1991). Kolmandaks, Cdc6 N-terminaalsete saitide fosforüleerimine põhjustab Cdc6 dimeriseerumise CDK-ga, pärssides sellega Cdc6 osalemise pre-RC moodustumises (Mimura et al. 2004). Lisaks Cdc6 sõltuvatele mehhanismidele reguleeritakse ka teisi pre-RC moodustumisega seotud valke. S-faasi algul eksporditakse tuumast Mcm2-7 ning sellega assotsieerunud Cdt1 (Labib et al. 2000; Nguyen et al. 2000; Tanaka & Diffley 2002).

S-faasis aktiveeruv CDK aktiveerib funktsionaalseid *origin*'e ning paralleelselt pärsib uute pre-RC moodustumist, takistades Cdc6 ja Mcm2-7 osalemist uue *origin*'i litsenseerimisel. Kirjeldatud mehhanismid aitavad vältida DNA replikatsiooni initsiatsiooni S ja G2 faasis. Varem arvati, et tegemist on redundantsete kaitsemehhanismidega, kuid selgus, et vaid ühe kirjeldatud mehhanismi kahjustamine põhjustas 1%-list ülereplitseerimist (Green et al. 2006). Seega kõik kirjeldatud kaitsemehhanismid on vajalikud.

1.5 Replikatsiooni alguspunktide aktivatsiooni ajastus ja efektiivsus

Pagaripärmi genoomis on tuvastatud ~ 400 replikatsiooni alguspunkti, mis on jaotunud üle kogu genoomi. Neid on võimalik eristada ajastuse ja efektiivsuse alusel (Nieduszynski et al. 2006). *Origin*'i efektiivsus iseloomustab selle aktiveerumise sagedust rakupopulatsioonis, ajastus aga aktiveerumise aega S-faasis. Teatud piirkondadest alustatakse replikatsiooni pea iga rakujagunemise käigus, kuid samuti leidub ka ARS-e millelt alustatakse DNA sünteesi vaid erandlikel juhtudel (Raghuraman et al. 2001). Enam huvipakkuv omadus on *origin*'ile iseloomuliku replikatsiooni alustamise aeg. Iga aktiveeritav replikatsiooni alguspunkt alustab sünteesi temale iseloomulikul ajahetkel. Näiteks *ARS607* ja *ARS737* aktiveeritakse varakult S-faasi alguses ning neid loetakse varajasteks replikatsiooni alguspunktideks. Seevastu S-faasi lõpupoole aktiveeritavaid *ARS501* ja *ARS609* loetakse hilisteks (Friedman et al. 1997; Raghuraman et al. 2001). Hilised ARS-id osutuvad kasulikeks olukordades, kui kaks replikatsioonikahvlit on peatunud näiteks DNA kahjustuste tõttu. Ilma hiliste *origin*'iteta ei pruugi kahe seiskunud replisoomi vahel DNA replikatsioon võimalikuks osutada, kuid hilise ARS-i aktivatsioon replitseerimata DNA-l võimaldab antud segmendi paljundada.

Replikatsiooni alguspunktide ajastuse ja efektiivsuse vahel ei ole kindlat seost. Mõned hilised alguspunktid võivad olla efektiivsed ning mõned varajased mitte (Friedman et al. 1997). Leidub ka hiliseid alguspunkte, mis on ebaefektiivsed, sest asuvad varajaste alguspunktide läheduses. Viimast saab üldjuhul seletada varakult sünteesi alustanud replikatsioonikahvliga, mis replitseerib ka hilise ARS-i enne, kui see jõuab aktiveeruda (passiivne replikatsioon). Kirjeldatud mehhanism on leidnud ka eksperimentaalset kinnitust katsetes, kus looduslikult hilised ja ebaefektiivsed ARS-id muudeti efektiivseteks, kui nende passiivne replitseerimine takistati (Santocanale et al. 1999). Seega võib replikatsiooni alguspunktide ajastus teatud tingimustel mõjutada nende efektiivsust.

1.6 Kromatiini mõju replikatsiooni initsiatsioonile

Origin'i ajalise aktivatsiooni täpsed regulatsiooni mehhanismid ei ole teada, kuid mitmetes töödes on näidatud, et peamine *origin*'ide ajastust mõjutav faktor on kromatiini

avatus reguleerimine. Pagaripärmis üldiselt kehtiva seaduspärasuse kohaselt aktiveeritakse kromosoomide tsentromeeride lähedal paiknevad ARS-id varem, kui telomeeride lähedal paiknevad replikatsiooni alguspunktid. Ilmselt on see tingitud telomeersetele piirkondadele omasest heterokromatiinist (Ferguson & Fangman 1992). Seega on ilmselt oluline valkude ligipääs DNA-le. Eukarüootses rakus reguleeritakse ligipääsu DNA-le peamiselt histoonide atsetüleerimise ja deatsetüleerimise teel. Lisaks mõjutab ligipääsu DNA-le nukleosoomide paiknemine, mis sõltub DNA nukleotiidses koostisest.

Esmakordselt ilmnis kromatiini mõju replikatsioonile katsetes, kus ebaefektiivne ARS kioneeriti plasmidi, mille tulemusena see alustas replikatsiooni järjepidevalt. Näidati, et see on tingitud replikatsiooni alguspunkti natiivsest lokaliseerimisest heterokromatiinses alas (Vujcic et al. 1999). Selle põhjenduse õigsust kinnitas veelgi eksperiment, kus paigutati efektiivne varajane ARS tugevalt pakkunud genoomi regioonile, mille tulemusena inserteeritud replikatsiooni alguspunkti aktiveerimise efektiivsus vähenes (Sharma et al. 2001).

Pagaripärmis moodustub heterokromatiin kolmes piirkonnas: telomeeridel, ribosomaalsel DNA-l ja paardumistüübi lookustes (HML ja HMR). Selle tekke ja leviku eest vastutavad valgud Sir1, Sir4, Sir2 ja Sir3 (*Silent Information Regulator*), mis toimivad hierarhia alusel, kus üks valk värbab teise (Rusche et al. 2003; Rusché et al. 2002). Mitmetes töödes on näidatud, et SIR valgud reguleerivad replikatsiooni initsiatsiooniga teatud ARS-idel (Zappulla et al. 2002; Raghuraman et al. 2001). Tähelepanek, et kromatiini pakkumine põhjustab ARS-i inaktiveerimist on ooduspärane, et kromatiini lahtipakkumine soodustab replikatsiooni efektiivsemat alustamist.

Kromatiini pakkumist on võimalik muuta histooni modifikatsioonidega. Üheks enim uuritud modifikatsiooniks on histoonide atsetüleerimine, mis lisab atsetüüli jäägi histooni N terminuses olevale lüsiinijäägile. See muudab histooni laengu negatiivsemaks, põhjustades DNA ja histoonide vaheliste kontaktide nõrgenemise ja soodustades nii regulaatorvalkude ligipääsu DNA-le. On näidatud, et globaalne histoonide atsetüleerimine põhjustab replikatsiooni initsiatsiooni nihke varasemaks (Knott et al. 2009; Aparicio et al. 2004). See viitab, et atsetüleerimisest tingitud nõrgem interaktsioon DNA ja histooni oktameeri vahel võimaldab replikatsioonifaktoritel kergemat ligipääsu ARS-ile. Seaduspära kinnitab ka katse, kus minikromosoomi histoonidel kutsuti esile H3 ja H4 deatsetüleeritus (modifikatsioonide deletsiooniga), mis tugevalt pärssis ARS-i aktiveerimist. Kirjeldatud

mehhaism on konserveerunud ning kehtib ka inimese vererakkudes (Goren et al. 2008; Unnikrishnan et al. 2010).

Lisaks DNA pakkumise astmele mõjutab ligipääsu DNA-le ka nukleosoomi paiknemine. Kuna üks histoon seob 147bp pikkust DNA lõiku, mis on enam kui pool keskmisest ARS-ist, võib see takistada replikatsiooni initsiatsiooni. Nukleosoomi paiknemine DNA-l on oluline faktor DNA ligipäasetavusele ja seega ka replikatsioonile. On näidatud, et kui ARS1 paigutata nukleosoomi poolt kaetud DNA piirkonda, siis sellelt regionilt replikatsiooni initsiatsioon halveneb (Simpson 1990). Nukleosoomi seondumist histoonidega mõjutavad DNA tasemel peamiselt kaks näitajat. Esiteks, kuna DNA keeratakse ümber histooni oktameeri, peab ta omama teatud painduvust. On näidatud, et plastilisuseks on oluline A-T paari esinemine iga 10 nukleotiidi tagant. Teiseks, pikad homopolümeersed kordused (A; T; C; G) ei paindu piisavalt ümbritsemaks histoone, pärssides tugevalt histooni oktameeri seondumist nt pikale A nukleotiidi kordusele (Struhl & Segal 2013).

1.7 Replikatsioonifaktorite limiteeriv hulk

Replikatsiooni initsiatsiooniks on vajalik mitmete üksteisest sõltumatute replikatsioonifaktorite seondumine pre-RC-ga. Neist Cdc45, Sld3 ja Sld7 on rakus limiteerivas koguses. Mainitud omadust on võimalik kasutada ARS-ide aktivatsiooniaja reguleerimisel. Nimelt, võimaldatakse initsiatsiooniks vajalike faktorite ligipääsu ARS-idele, mis seovad neid afiinsemalt, soodustades *origin*'i varasemat replikatsiooni alustamist.

Eelnevat toetavad ka eksperimentaalsed tulemused, kus tõsteti rakus replikatsiooniks vajalike limiteerivate valkude (Sld3, Sld7 ja Cdc45) ekspressiooni ning täheldati mitmete tavaolukorras hiliste *origin*'ide muutumist varajasemaks. Selgitati ka Sld3, Sld7 ja Cdc45 koopiaarvud haploidsetes, G1 faasis olevates rakkudes, mis on vastavalt 300, 300 ja 700. Nende valkude kogus ei ole aga piisav kõikide *origin*'ide üheaegseks aktiveerimiseks. Seega Sld3, Sld7 ja Cdc45 käituvad replikatsiooni initsiatsioonil kui limiteerivad faktorid (Tanaka et al. 2011).

Hiljuti avaldatud töös leiti valgud, mis on olulised reguleerimaks replikatsiooni initsiatsiooniks vajaliku Cdc45 ligipääsu. Täheldati, et Forkhead transkriptsioonifaktorid on globaalsed ARS-i aktivatsiooniaja regulaatorid. Ülegenoomne uuring näitas, et deleteerides

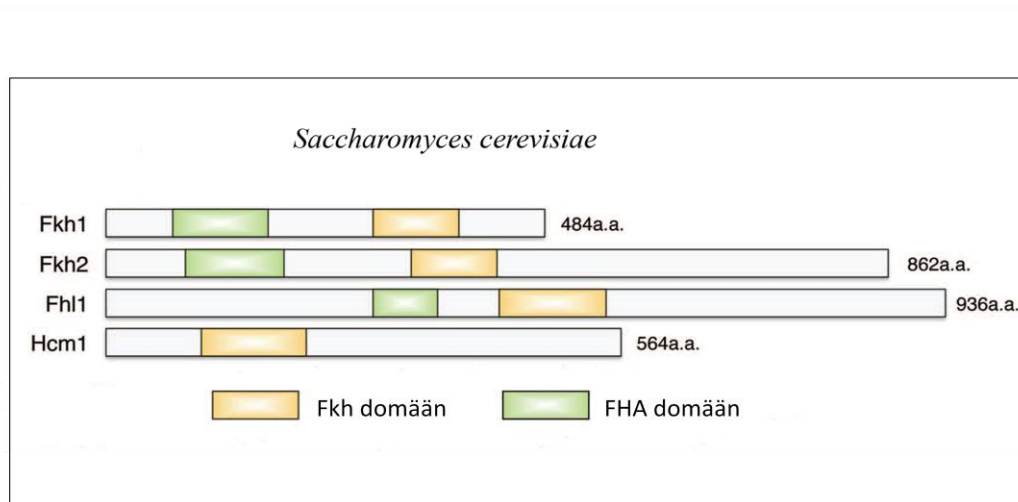
genoomist fkh1 ja fkh2 geenid muutuvad ~30% *origin*'idest hilisemaks ning ~23% alustavad sünteesi varem (Knott et al. 2012). Täheldatud efekti mõistmiseks uuriti erinevate replikatsioonifaktorite seondumist varajastele ARS-idele ning märgati, et fkh1 ja fkh2 deletsiooni tagajärjel ei seo varajased ARS-id enam G1 faasis replikatsiooni alustamiseks vajalikku Cdc45-t. Seega mõjutavad Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorid enam kui pooli replikatsiooni alguspunktide aktivatsiooniaegu, seda tõenäoliselt ebapiisavas hulgas olevate valkude kättesaadavust manipuleerides (Knott et al. 2012).

1.8 Pagaripärmi Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorid

Pagaripärmis on neli Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorit (Joonis 2). Neist Fkh1, Fkh2 ja Hcm1 seonduvad samale konsensusjärjestusele TAAACA ning Fhl1 GACGCA järjestusele (Badis et al. 2008; Pic et al. 2000). Kuigi Fkh1, Fkh2 ning Fhl1 transkriptsioonifaktorite seondumine on kaardistatud üle kogu pagaripärmi genoomi (Harbison et al. 2004), ei pruugu kogu genoomi hõlmavad tööd alati piisava resolutsiooni ja statistilise usaldusväärsusega kõiki seondumisi määrata (Pickrell et al. 2011). Seda kinnitab ka transkriptsioonifaktorite kaardistamise töö võrdlemine CHIP eksperimendiga. Ülegenoomne töö ei tuvastanud Fkh1 seondumist *ARS737*-le, kuid hilisem kromatiini immuunsadestamine näitas selget interaktsiooni Fkh1 ja *ARS737*-e vahel (Harbison et al. 2004; Lööke et al. 2013). Seega ei saa alati teha transkriptsioonifaktorite kaardistamise töö alusel lõplike järeldusi üksikute lookuste kohta.

Hiljuti kaardistati *Saccharomyces cerevisiae* genoomi lokalisatsioon tuumas, mis näitab füüsiliselt lähestikku asuvate lookuste põhjal kogu genoomi 3D konformatsiooni (Duan et al. 2010). Nende andmetest nähtub, et *origin*'id 305 ja 607 asuvad *in vivo* rakutuumas füüsiliselt lähestikku. On näidatud, et kui deleteerida rakust fkh1 ja fkh2 siis *ARS305* ja *ARS607* kaugenevad teineteisest (Knott et al. 2012). Samuti näidati, et mainitud deleteerimiste tagajärjel *ARS305* ja *ARS607* ei seo enam limiteerivaid faktoreid. Lisaks näidati, et *origin*'ide varajaseks aktivatsiooniks on vajalik Fkh1/2 seondumissait, mis viitab, et regulatsioon on tingitud Fkh1/2 seondumisest ARS-ile (Knott et al. 2012). Mainitud tulemused viitavad otseselt sellele, et replikatsiooni alguspunktid klasterduvad Fkh1/2 sõltuvalt rakutuumas ja sellega tagatakse nende efektiivne aktivatsioon. Samas endiselt on selgusetu Fkh perekonna transkriptsioonifaktorite seondumise dünaamika rakutsüklis. Samuti ei ole suudetud eristada

Fkh1 ja Fkh2 ja teiste Forkhead perekonna valkude võimalikku rolli replikatsiooni *origin*'ide aktivatsiooni reguleerimisel.



Joonis 2. *Saccharomyces cerevisiae* Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorite domäänide paigutus ning valkude suurus. Kujutatud on DNA-ga seonduv FKH domään ning fosfopeptiididega seonduv FHA (*Forkhead associated*) domään (Murakami et al. 2010).

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgid:

1. Iseloomustada kõikide *Saccharomyces cerevisiae* Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorite seondumist replikatsiooni alguspunktidele.
2. Selgitada Fkh perekonna transkriptsioonifaktorite seondumise dünaamikat rakutsükli S-faasis.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud söötmed

Saccharomyces cerevisiae tüvesid kasvatati YPD (*yeast extract*, *peptone*, *dextrose*) tard- [agar 20 g/l, glükoos 20 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l (LAB MTM), pärmiekstrakt 10 g/l (LAB MTM)] ja vedelsöötmes [mükoloogiline peptoon 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, glükoos 20 g/l (Applichem)]. Tardsöötmele kasvatati pärmirakke 30° C juures, vedelkultuure aereeriti loksutil samal temperatuuril.

Kolmekordset 3F12 epitoopi sisaldavate tüvede konstrueerimisel kasvatati pärmil transformeerunud rakkude eraldamiseks antibiootikumi *Nourseothricin* [(NAT)(Sigma)] sisaldaval selektiivtassil [YNB (**Y**east **n**itrogen **b**ase, Applichem) 6,7 g/l, glükoos 2% (Medipharma), agar 2% (LAB MTM), aminohapped ja nukleotiidid –Adeniin 40 µl/ml, Uratsiil 40 µl/ml, Leutsiin 80 µl/ml, Trüptofaan 40 µl/ml, Lüsiin 80 µl/ml, Histidiin 80 µl/ml (Serva)].

2.2.2 Tüvede valmistamine

Pagaripärmis on võimalik esile kutsuda rakutsükli seiskumine G1 faasis inkubeerides neid α -faktoriga. Viimane on pagari pärmi sünteesitav valk. Tulenevalt α -faktoriga indutseeritava rakutsükli arresti ning sellest vabastamise iseärasustest, tuli kõik katsed läbi viia A paardumistüüpi tüvega, mis sisaldas *bar1* deletsiooni. Kriteeriumitele vastas meie töögrupi poolt konstrueeritud tüvi AKY687 (W303 MAT A *ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1ade2-1 can1-100, lys2 bar1Δ::hphMX6*).

Võimaldamaks spetsiifilist immunosadestamist liideti tüves AKY687 valkudele Fkh1, Fkh2, Fhl1 ja Hcm1 3F12 C-terminusesse kolmekordne 3F12 epitoop-märgis. Selleks amplifitseeriti plasmiidilt pBS-3x3F12-NATMX6 regioon, mis sisaldas kolmekordset 3F12 epitoopi ja NAT resistentsusgeeni. PCR viidi läbi tabelis 1 esitatud programmiga. Reaktsioonisegu valmistati 50 µl, mis sisaldas praimereid 0,2 µM (Metabion) (Tabel 2), 10x Pfu PCR puhvrit (sisaldab MgSO₄), nukleotiidide segu 0,2 mM, Pfu DNA polümeraasi 2,5 RÜ (Thermo Scientific) ja 10 ng plasmidi. Produkti moodustumist kontrolliti geelelektroforeesil 1% agaros TAE (40 mM Tris-Atsetaat, 1mM EDTA) puhvris. Sünteesitud produktid puhastati transformeerimiseks fenool-kloroform meetodil ja sadestati etanooliga üleöö -20°C juures.

Tabel 1. Amplifikatsioonil kasutatud programm

Toiming	Temperatuur	Kestus	Tsükli arv
Esmane denaturatsioon	95°C	5 minutit	1
Denaturatsioon	95°C	30 sekundit	
Praimerite seondumine	55°C	30 sekundit	30
Elongatsioon	72°C	4 minutit	
Lõplik ekstensioon	72°C	10 minutit	1

Tabel 2. Disainitud praimerid:

Fkh2_tag_F	5' AGGA ACTAATACTAGATACGGATGGTGCAAA GATCAGTATTATCAACA ACTCTAGAGGGGCGGTTAC 3'
Fkh2_tag_R	5' CCATTTCTCATT CATTCTTTAGTCTTAGTGAT TCACCTTGTTCTTGCCAGGAAACAGCTATGACCATG 3'
Fkh2_tag_F_KNTR	5' TAAATCGCAGAATGTCAAAAAGT 3'
Fhl1_tag_F	5' ATATCAACGAGGGTATCACTGAAGTAAATGTAT CCCTTGAGGAAAACTTTCTAGAGGGGCGGTTAC 3'
Fhl1_tag_R	5' AAAGATTTATGCTTCTACTTTCGAATATGCTAAT ACTATTATCGAAATTTTCAGGAAACAGCTATGACCATG 3'
Fhl1_tag_KNTR	5' GATGACGGTAGTGCTAGTGGA 3'
Hcm1_tag_F	5' ATCATCCTTATCATAATCACCCCTTCCAACGATAGC GGTAATGAAAAGAATTCTAGAGGGGCGGTTAC 3'
Hcm1_tag_R	5' TAATTAGTTTTCGGTGAGGAAAAGAAAATGAAAAA AAAAAAAAAAAAAGCAGGAAACAGCTATGACCATG 3'
Hcm1_tag_KNTR	5' TATTTAGAGCTATAGAGACTCCAATCA 3'

2.2.3 Transformatsioon

Tüvi AKY687 kasvatati 25 ml-s YPD vedelsöötmes üleöö 30°C ja 200 rpm-i juures loksutil tiheduseni 10^8 rakku/ml ning koguti tsentrifuugides 400 rcf-iga 5 minutit. Rakud suspendeeriti 10 ml-s LiOAc+TE (100 mM LiOAc; 10 mM TrisHCl pH7,5; 1 mM EDTA) lahuses ning inkubeeriti loksutil (100 rpm) 30°C juures. 45 minuti möödudes lisati DTT (lõppkontsentratsioon 25 mM) ning inkubeeriti rakke identsetes tingimustes. 15 minuti möödudes lisati 40 ml MQ vett ning tsentrifuugiti 400 rcf-iga 5 minutit. Järgnevalt teostati 2 pesu 50 ml jääkülma veega ning 2 pesu 1 ml jääkülma 1 M sorbitooliga. Pesulahus eemaldati ning rakud suspendeeriti 50 µL 1 M sorbitoolis. Valmistatud rakususpensioonist eraldati 35 µl ning segati 10 µl-i eelnevalt puhastatud DNA-ga ning asetati 2 mm küveti (BioRad) ja hoiti jääl. DNA rakkudesse viimiseks kasutati elektroporaatorit (BioRad Gene Pulser X Cell) tingimustel C=25 µF, PC=200 Ω, V=1500. Vahetult pärast elektroporeerimist lisati rakkudele 1 ml 1 M jääkülma sorbitooli. Järgnevalt kanti rakud YPD tassile, mis asetati üleöö 30°C inkubaatorisse. 24 tundi pärast transformatsiooni viidi rakud tempelkülvi meetodil selektiivsöötmele, mis sisaldas NAT-i. Selektiivtassil kasvama läinud kolooniatelt ekstraheeriti nukleiinhapped kontrollimaks inserdi sisestumist ettenähtud positsiooni. DNA eraldati lüüsipuhvriga (0,2 M LiOAc, 1%SDS) inkubeerides 10 minutit 70°C juures. DNA sadestati ning pesti 96% etanooliga ja järgnevalt 70% etanooliga. DNA suspendeeriti MQ vees, rakupuru sadestati ning supernatanti kasutati PCR reaktsioonis (Lõoke et al. 2011). Eraldatud DNA-d analüüsiti PCR-iga, kasutades selleks tabelis 3 esitatud programmi ja 5x Firepol PCR MasterMix-i (Solis Biodyne) ning 1 µl eraldatud DNA-d. Produkti moodustumist jälgiti 1% agarosgeelil. Saadud tüvede tegijad ja tüvede genotüübid on toodud Lisas 2.

Tabel 3. Amplifikatsioonil kasutatud programm

Toiming	Temperatuur	Kestus	Tsüklite arv
Esmane denaturatsioon	95°C	5 minutit	1
Denaturatsioon	95°C	30 sekundit	
Praimerite seondumine	55°C	30 sekundit	30
Elongatsioon	72°C	1 minutit	
Lõplik ekstensioon	72°C	10 minutit	1

2.2.4 Western Blot

Rakud koguti tihedusel 10^7 rakku/ml ning rakukest lagundati 100 μ L-s lüüsi puhvris (1 M sorbitool, 10 mM TrisHCl pH 8, 10 mM EDTA), kuhu lisati 50 μ g zymolüaasi (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) ning inkubeeriti termomikseris (Applied Biosystems) 30°C ja 600 rpm-i juures 30 minutit.

Saadud sferoplastid koguti tsentrifuugides 6000 g juures 1 minut ning supernatant eemaldati ja lisati 2xSDS laadimispuhvrit (0,06 M Tris-Cl pH 6,8, 2% SDS, 5% 2-merkaptotanol, 10% glütserool, 0,002% broomfenoolsinine) ning kuumutati 95°C 10 minutit. Järgnevalt teostati rakusademe eemaldamist kaks korda tsentrifuugides maksimumkiirusel 5 ja 10 minutit. Saadud supernatanti kasutati järgnevates etappides.

Lüsaadi valgud lahutati 10 % SDS-polüakrüülamiidgeelis [1/3 geelist kontsentreeriv: 5% akrüülamiid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% NAPS (naatrium persulfaat); 0,06% TEMED (N,N,N',N' – tetrametüületüendiamiin). 2/3 geelist on eraldav: 10% akrüülamiid, 375 mM Tris-HCl pH8,8; 0,1% SDS; 0,1% NAPS; 0,04% TEMED]. Geeli voolutati SDS-i sisaldavas puhvris (125 mM Tris, 960 mM glütsiin, 0,5% SDS). Geel ja eelnevalt metanoolis (BioTop) märjatud PVDF membraan (Thermo Scientific) inkubeeriti ülekande puhvris (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% Metanool) ning ülekande filtrile teostati Trans-Blot® SD Semi-DryTransfer Cell masinas (Bio-Rad). Ebaspetsiifilise signaali vältimiseks blokeeriti membraani 1 h toatemperatuuril 5% lõssipulbrilahust sisaldavas 0,05% PBS-Tween20 lahuses. Epitoobiga märgistatud valgu detekteerimiseks inkubeeriti membraani primaarse antikehaga [hiire monoklonaalne 5E11 (*Icosagen*) lahjendusega 1:10000, algkontsentratsioon 1 mg/ml] üleöö 4°C juures. Järgnevalt pesti membraani TBST-s 5 korda 7 minutit ning eksponeeriti sekundaarsele antikehale (Thermo Scientific). Järgnevalt pesti membraani 5 korda 7 minutit.

Signaali visualiseerimiseks kasutati *Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate* komplekti (Millipore). Membraanile kanti reaktsioonisegu ning inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Seejärel detekteeriti membraanil olev signaal röntgenfilmiga (Agfa), mis ilmutati ja kinnistati standardlahustega (Agfa).

2.2.5 Lävivoolutsütomeetria

Rakutsükli analüüsimiseks esmalt sonikeeriti 500 µL rakke toatemperatuuril Bioruptoriga (Diagenode) 30 sekundit ning fikseeriti jääkülma 70% etanooliga 40 minutit. Rakud tseentrifuugiti 12000 rcf-i juures 5 minutit ning pesti 1ml 50 mM naatriumatsetaadiga. Järgnevalt tseentrifuugiti rakke maksimum kiirusel 5 minutit ja eemaldati supernatant. Rakud suspendeeriti 1ml 50 mM naatriumatsetaadis, mis sisaldas RNase-i (Sigma) 10 µg ning sonikeeriti 3 korda 30 sekundit, millele järgnes inkubeerimine 37°C juures üleöö. Hommikul lisati rakususpensiooni kaheaahelise DNA-ga seonduv *SYBRGreen* (Molecular Probes) ning hoiti rakke toatemperatuuril pimedas 30 minutit. Rakud sadestati ja eemaldati supernatant. Sade suspendeeriti 50 mM naatriumatsetaadis ja mõõdeti DNA hulka rakkudes läbivoolutsütomeetriga (FACS Calibur).

2.2.6 Kromatiini immunosadestamine (CHIP)

2.2.6.1 Pärimi rakulüsaadi valmistamine

Pärmitüved AKY687, AKY727, AKY779, AKY780, AKY782, AKY795 kasvatati YPD vedelsöötmes. Rakutsükli arrest G1 faasis indutseeriti, inkubeerides rakke 3 h α -faktoriga (GenScript, USA) (lõppkontsentratsioon 100 nM). Rakkude sünkroonne S-faasi minek indutseeriti α -faktori elimineerimisega. Selleks eemaldati sööde tseentrifuugides 1700 rcf-i juures 1 minut ning pesti rakke üks kord 30°C autoklaavitud MQ veega. Järgnevalt suspendeeriti rakud 120 ml-is värskes YPD söötmes, mis sisaldas pronaasi (AppliChem) lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml. Null ajapunkt võeti vahetult enne α -faktori eemaldamist ning järgnevad proovid koguti 20, 35, 50, 65, 80 minutit pärast pronaasiga söötme lisamist. FACS ja CHIP proove koguti parallelselt. CHIP proovid fikseeriti 1%-lises formaldehüüdi (Appllichem) lahuses 13 minuti vältel. Formaldehüüd neutraliseeriti glütsiini lisamisega (lõppkontsentratsioon 200 mM). Kogutud rakke pesti kaks korda 30 ml-i toasooja PBS-ga, tseentrifuugiti 1 minut 1700 g juures. Järgnevalt tõsteti rakud uude tuubi ning teostati pesu 1 ml-i FA-lüüsipuhvriga. Vajadusel säilitati rakke -80° C juures kuni katse jätkumiseni. Rakud resuspendeeriti 500 µl FA-lüüsipuhvril ning lisati klaaskerakesi [0,5 mm *Glass Beads (Soda Lime)* (*BioSpec Products Inc.*)]. Rakke lõhuti klaaskerakestega 15 minutit 4°C juures, kasutades masinat *Disruptor Genie™* (*Scientific Industries*). Rakulüsaadi eraldamiseks tehti nõelaga *Eppendorf*-i põhja auk ning asetati 15 ml tuubi. Järgnes tseentrifuugimine 1 min 2000

rcf-iga ning saadud lüsaadile lisati 1 ml FA-lüüsi puhvrit. Saadud lüsaati sonikeeriti (*Diagenode – Bioruptor™*) 9 minutit (8 x 30 sekundit sonikeerimist, 1 min pausi, 200 W, 0° C juures). Rakulüsaat viidi uude 1,5 ml tuubi, tsentrifuugiti 5 min 4° C juures maksimaalsel kiirusel lauatsentrifuugis. Supernatant viidi uude tuubi ning korrati tsentrifuugimist 15 min 4° C juures. Saadud supernatant on kogu raku ekstrakt (WCE), mida säilitati -80° C kapis.

2.2.6.2 Immunopretsipitatsioon (IP)

Immunopretsipitatsioonil lisati 500 µl-le kogu raku ekstraktile komertsiaalselt hiire IgG tüüpi monoklonaalset antikeha 5E11 [*Quattromed*, lisati proovile 0,5 µl, algkontsentratsioon 1 mg/ml]. Inkubeeriti 5E11 antikehaga üleöö 4° C juures aeglaselt keerutades. Järgnevalt tsentrifuugiti proove 15 min 4° C juures täiskiirusel ning supernatant viidi uude 1,5 ml tuubi. Lisatavatele proteiin-A kerakestele [*ProteinA Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare Bio-Sciences AB)*] teostati eelnevalt kaks pesu 600 µl FA-lüüsi puhvriga ning inkubeeriti 15 minutit FA-BSA-ga [BSA (*Bovine serum albumine, BioTop*, lõppkontsentratsioon 1 mg/ml) + FA-lüüsi puhver] 4° C juures, aeglaselt segades. 20 µl proteiin-A kerakesi ja 30 µl FA-BSA puhvrit lisati eelnevalt tsentrifuugitud IP proovile ning inkubeeriti 1,5 h 4° C juures.

IP reaktsioone tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga 20 sekundit 16000 rcf-i juures ning eemaldati supernatant. Proteiin-A kerakesi pesti järjestikku 1,3 ml FA-lüüsi puhvri, FA500, LiCl ning TES pesulahusega (iga lahusega 1 min, 20° C juures, aeglaselt segades, koostis Lisas 3).

Antigeenid elueeriti 150 µl eluatsioonipuhvriga (koostis LISA1) toatemperatuuril 10 min väristajal (TITERTEK). Proove tsentrifuugiti 20 sekundit 16000 rcf-i juures ning supernatant koguti. Elueerimise etappi korrati. Järgnevalt lõhuti formaldehüüdi tekitatud ristseosed inkubeerides 65° C juures üleöö.

DNA puhastati fenool-kloroform meetodil. Proovile lisati 300 µl fenool-kloroformi (1:1), segati vortexil ning tsentrifuugiti 5 min 16000 rcf-i juures. Saadud vesifaasile lisati 300 µl veega küllastunud kloroformi. Segati vortexil ja tsentrifuugiti 5 min 16000 rcf-iga. Vesifaas tõsteti uude 1,5 ml tuubi ning lisati 30 µl NH₄OAc (algkontsentratsioon 7,5 M), 3 µl glükogeeni (algkontsentratsioon 20 mg/ml) ja 990 µl 96% EtOH. Proove sadestati üleöö -80° C juures. DNA-d tsentrifuugiti 20 min 4° C ja 21000 rcf-juures. Teostati soolade pesu 1 ml 70% EtOH-iga ning korrati tsentrifuugimist samadel tingimustel. DNA lahustati 300 µl-s nukleasivabas vees (Thermo Scientific).

2.2.6.3 Kvantitatiivne PCR (qPCR)

Kromatiini immunosadestamisel eraldatud DNA-d analüüsiti qPCR-iga (*7900 HT Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems*). Reaktsioon viidi läbi 10 µl-s [DNA 5 µl, qPCR-i segu (2x, *SYBRGreen® qPCR ROX Mix, Solis BioDyne*) 4,5 µl; praimerid 0,5 µl (10 pmol/µl)].

qPCR-i tsükkel on näidatud tabelis 4.

Kõik praimerid disainiti sulamistemperatuuriga 60 +/- 1,5 °C (*Metabion, Proligo*). Tulemuste normaliseerimiseks kasutati *Saccharomyces cerevisiae* kordusjärjestust PAU2.

qPCR-il kasutati programmi: absoluutne kvantifitseerimine (*absolute quantification, standard curve*), standardrežiim (Ct väärtuse *threshold* 0,2, automaatne lähtetaseme (*baseline*) määramine. Tulemuste analüüsimiseks kasutati programmi SDS (*Sequence Detection Systems*) versioon 2.2.2 ning arvutiprogrammi *Microsoft Excel*.

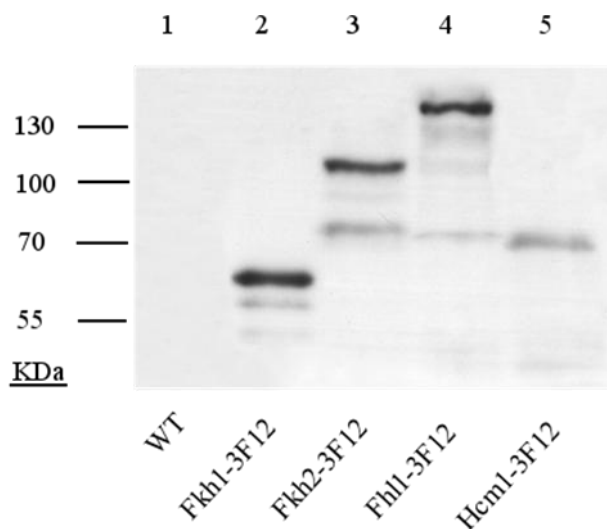
Tabel 4. qPCR-i tsüklid

Toiming	Temperatuur	Kestus	Tsüklite arv
Ensüümi aktivatsioon	95°C	15 minutit	1
Denaturatsioon	95°C	15 sekundit	
Praimerite seondumine ja	60°C	1 minut	40
Elongatsioon	72°C		
Dissotsiatsiooni	95° C	15 sekundit	1
mõõtmine	60° C	15 sekundit	
	95° C	15 sekundit	

2.3 Tulemused

2.3.1 Epitoobi lisamise kontroll

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorite seondumist replikatsiooni *origin*'ide järjestustele kasutades kromatiini immuunosadestamist. Valkude seondumise jälgimiseks kasutati C-terminaalset 3F12 epitoop *tagi*. Märgis amplifitseeriti koos selektiivsusmarkeriga plasmiidilt ja elektroporeeriti pärmis ning võimaldati rikkal tardsöötmeel kasvades segment genoomi integreerida. Inerti sisaldavad kolooniad selekteeriti kandes nad üle selektiivsöötmele, mis sisaldas NAT-i. Selektiivtassil kasvanud kolooniad kontrolliti PCR-iga. Produkti moodustumise alusel selekteeriti vajalikud tüved. Et välistada CHIP-i valenegatiivsete tulemuste saamine, kontrolliti asünkroonselt rakukultuurist valmistatud rakulüsaadis epitoobi ja antikeha seondumist Western Blot'iga. Negatiivse kontrollina kasutati esialgset tüve, millel Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorid tagiti. Jooniselt 3 nähtub, et valkude suurused vastavad nende massile ja on kooskõlas varem avaldatuga (Rodriguez-Colman et al. 2010). Seega on Forkhead perekonna transkriptsioonivalkude *tag*'imine õnnestunud.

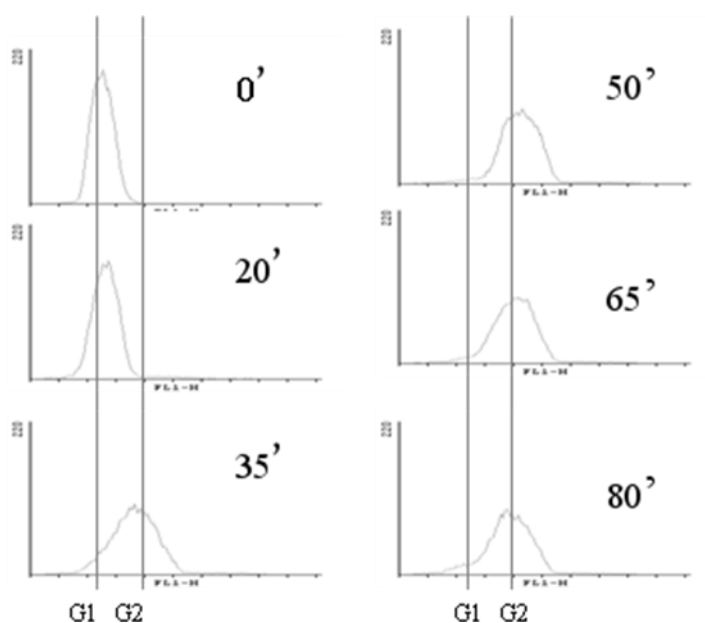


Joonis 3. Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorite *tag*'imise kontroll Western Blot analüüsiga. Rakulüsaadid on tehtud asünkroonselt rakupopulatsioonist. Rada 1) metsiktüüpi algtüvi (negatiivne kontroll); 2) Fkh1-3x3F12; 3) Fkh2-3x3F12, 4) Fhl1-3x3F12, 5) Hcm1-3x3F12. Võrreldes radasid 1 ja 2, 3, 4, 5 järeldub, et antikeha 5E11 seondub spetsiifiliselt Forkhead perekonna transkriptsioonifaktoritele.

2.3.2 CHIP

2.3.2.1 Rakutsükli analüüs

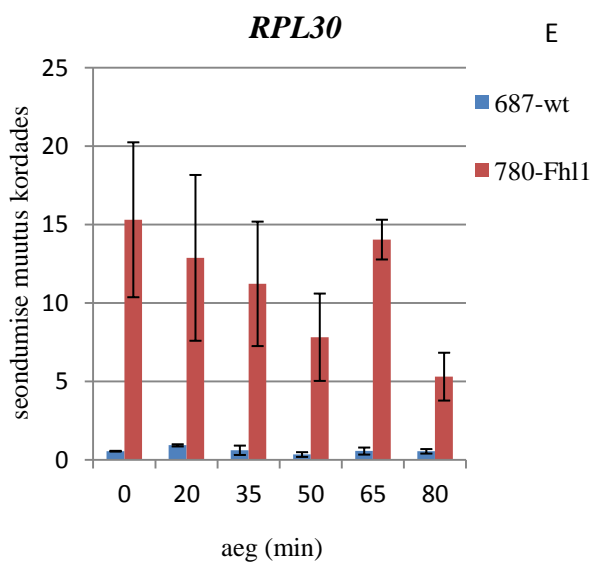
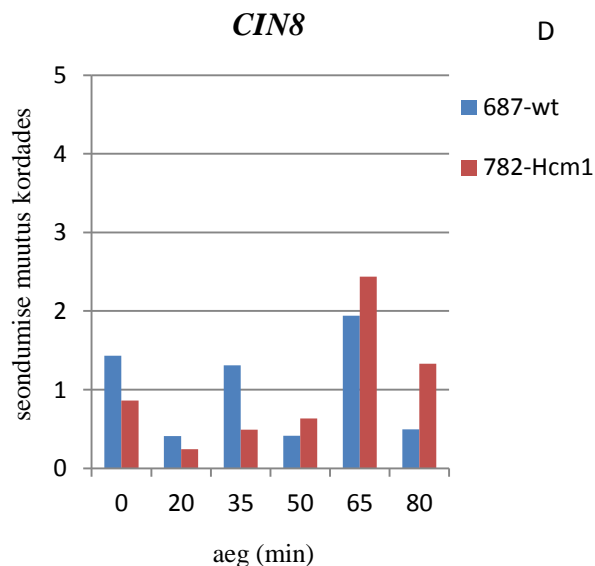
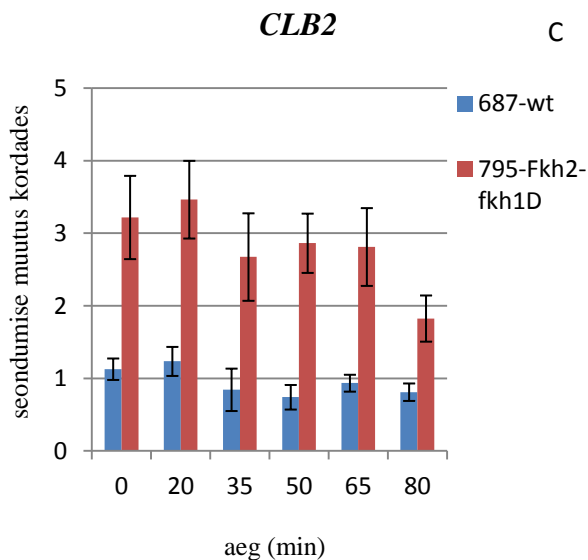
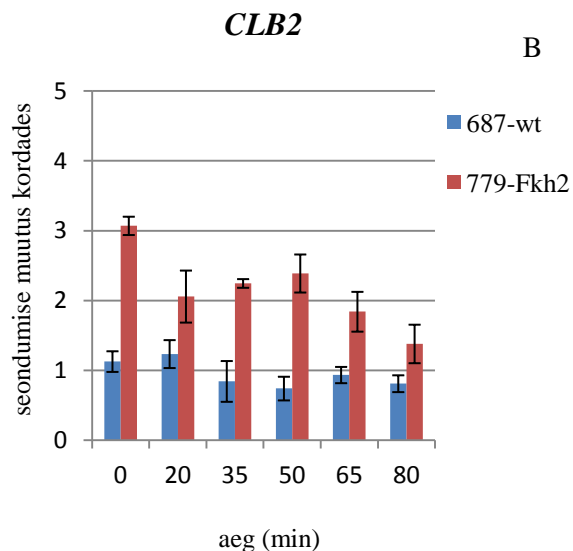
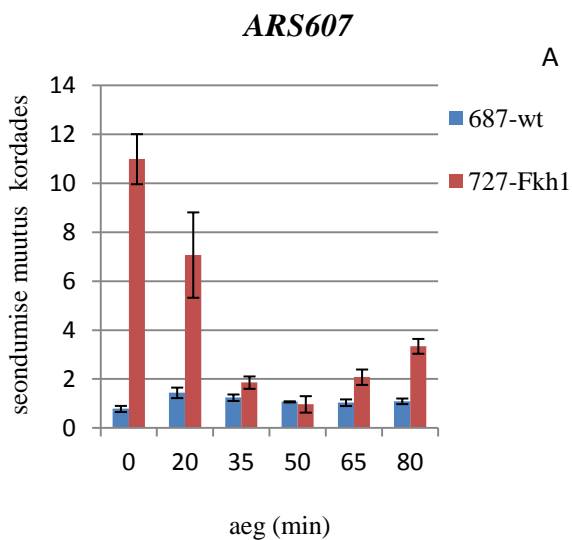
Töö üheks eesmärgiks oli selgitada trans-faktorite ja DNA interaktsiooni dünaamikat S-faasis. Selle eesmärgi saavutamiseks sünkroniseeriti rakud esmalt α -faktoriga ja vabastati sünkroonselt S-faasi. Jälgimaks rakutsükli kulgu analüüsiti iga ajapunkti DNA hulka läbivoolutsütomeetrial FACS Calibur. Jooniselt 4 ning Lisast 4 järeldub, et kõikide proovide arrestumine ning sünkroonne replikatsiooni alustamine töötab.



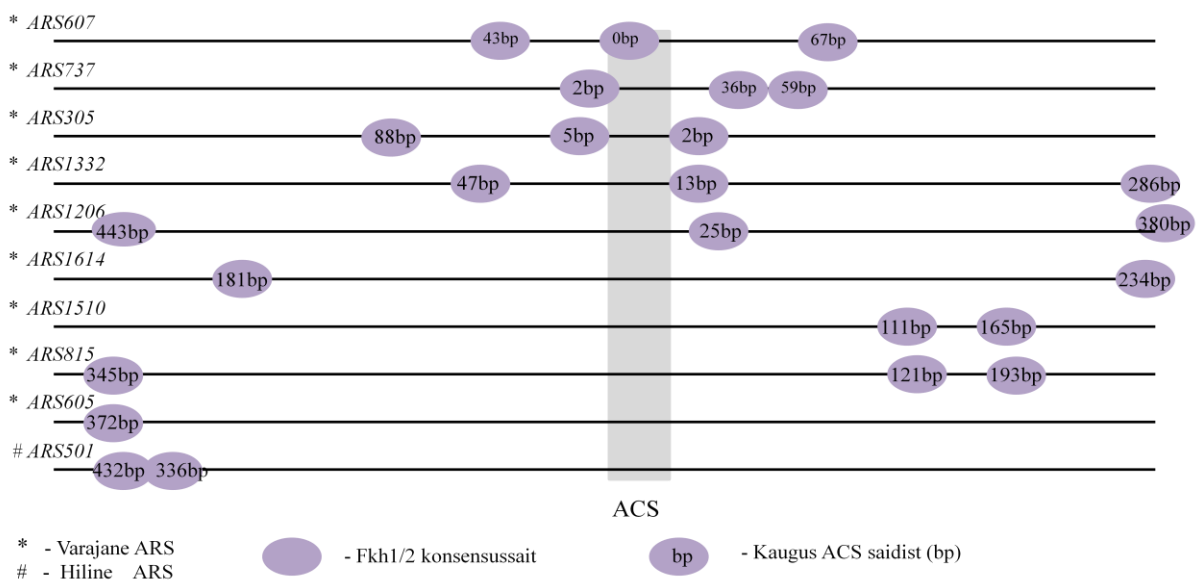
Joonis 4. Rakutsükli analüüs läbivoolutsütomeetrial (FACS Calibur). Tüve AKY727 (Fkh1-3x3F12) rakutsükli graafiline kujutis kogutud ajapunktide (0,20,35,50,65,80 minutit) lõikes. Graafikult nähtub, et rakutsükli arrestumine α -faktoriga ning vabastamine S-faasi töötab ligi 100% efektiivsusega.

2.3.2.2 Forkhead perekonna valkude seondumine positiivsetele kontrollidele

Epitooop märgistamine võib rikkuda valkude töö. Vältimaks töötamist kahjustatud valkudega otsustati kontrollida *tag*'itud valkude võimekust seonduda nende positiivsete kontrollidega. Kirjandusest leiti promootoralad kuhu on eelnevalt näidatud Forkhead transkriptsioonifaktori seondumist. Fkh1 assotsieerub *ARS607*-le (Lõoke et al. 2013), Fkh2 *CLB2* promootoralale (Kumar et al. 2000), Fhl1 *RPL30*-le (Rudra et al. 2005) ning Hcm1 seondub *CIN8*-le (Pramila et al. 2006). Toodud valkude ja DNA järjestuste vahel vaadeldi seondumist kromatiini immunosadestamisega. Jooniselt 5 on näha, et Fkh1, Fkh2 ja Fhl1 seonduvad oma positiivse kontrolliga, kuid Hcm1 puhul seda detekteerida ei õnnestunud. Hcm1 puhul uuriti ka alternatiivseid kontrolljärjestusi: NDD1, SPC111, WHI5 (Pramila et al. 2006; Zhu & Davis 1998). Kuna ei suudetud näidata Hcm1 seondumist DNA-le, jäeti see edasistest katsetustest välja. Seevastu täheldati aga pilootuuringute (tulemused ei ole näidatud) käigus, et Fkh2 paistab seonduvat Fkh1 spetsiifiliste ARS-idega. Võimaliku Fkh1 ja Fkh2 vahelise konkureeriva iseloomu selgitamiseks otsustati valmistada tüvi, kus Fkh2 on märgistatud ja fkh1 deleteeritud ning kaasata see tüvi uurimistöösse. Joonisel 5 on näha, et ka selles tüves Fkh2 seondub oma positiivsele kontrollile.



Joonis 5. CHIP. α -faktoriga arrestitud ning S-faasi vabastatud tüvedes Fkh1 (A), Fkh2 (B), Fkh2 (ja fkh1 deleteeritud) (C), Hcm1 (D) ja Fhl1 (E) seondumine nende positiivsetele kontrollidele. Tulpdiagrammide legendis indikeeritud wt on negatiivne kontroll.

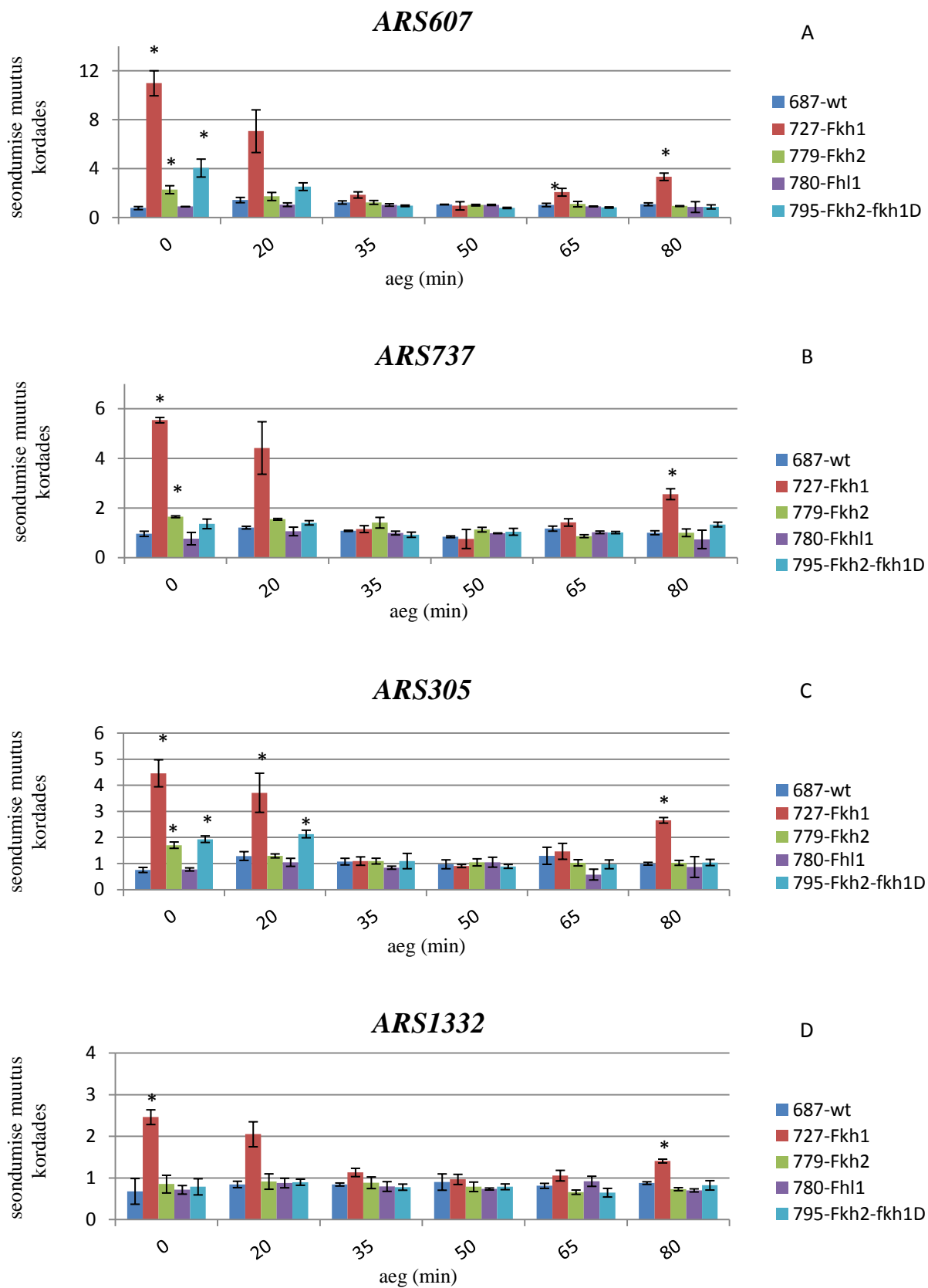


Joonis 6 Fkh1/2 konsensus-saitide paigutus. Joonisel näidatud ülevalt alla töös kasutatud ARS-id ning nendel asuvate Fkh1/2 konsensus-saitide kaugused ACS-ist aluspaarides. Fkh1/2 konsensuseks on võetud järjestus RYMAAYA.

2.3.3 Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorite seondumine replikatsiooni alguspunktidega

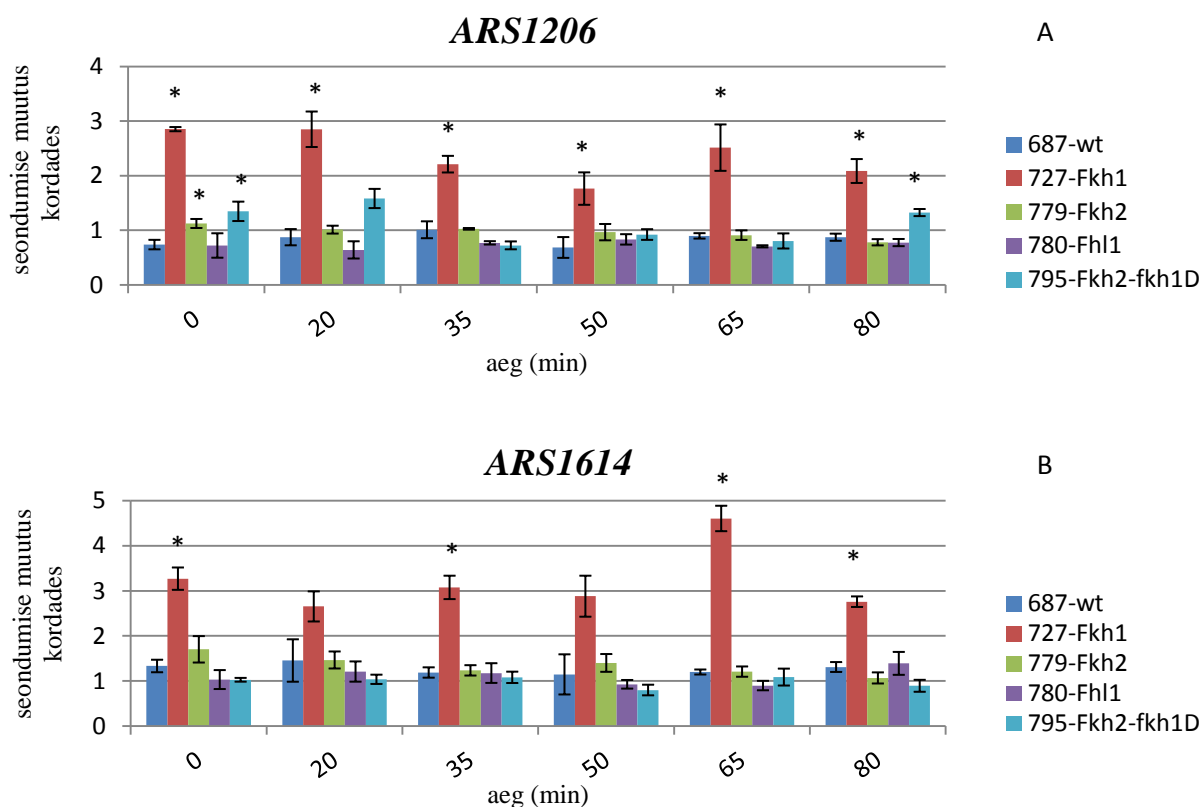
Käesoleva magistritöö üks eesmärkidest oli selgitada Forkhead transkriptsioonifaktorite dünaamikat seondumisel replikatsiooni initsiatsiooni saitidele. Selleks konstrueeriti eksperiment, kus oleks võimalik jälgida sünkroonselt S-faasi alustavas rakupopulatsioonis huvipakkuvate valkude seondumist spetsiifilistele DNA järjestustele, mis valiti konsensus-saitide alusel. Kõikide töös kasutatud ARS-ide ja nende proksimaalsete Fkh1/2 seondumise saitide vahelised kaugused on toodud Joonisel 6.

Töö tulemusena leiti, et Fkh1 seondub efektiivselt kõikide varajaste replikatsiooni alguspunktidega, mis sisaldavad vähemalt kahte Fkh1/2 konsensusjärjestust ACS-i vahetus läheduses (Joonis 7 a-d). Fkh1 seondumine ARS607, ARS737, ARS305 ja ARS1332-ga on tugevaim rakutsükli G1 faasis ning nõrgeneb 20 minuti ajapunktiks. 35-ndaks minutiks ei ole Fkh1 assotsiatsioon nende *origin*'idega enam täheldatav (Joonis 7 a-d). Tõenäoliselt on selle põhjuseks replikatsiooni aktivatsioon, mis viib Fkh1 eemaldamisele DNA-lt. Jälgides rakutsükli graafikut Joonisel 4 on nendes ajapunktides nähtav DNA hulga suurenemine. 80-ndal minutil täheldatav Fkh1 reassotsieerumine (Joonis 7 a-d) on tõenäoliselt seotud rakkude jõudmisega järgmise G1 faasi. Kokkuvõtvalt tähendab see, et Fkh1 seondub nendele replikatsiooni alguspunktidele tsükliliselt: seodumine on täheldatav rakutsükli G1 faasis, kuid rakkude sisenemisel S faasi eemaldatakse Fkh1 *origin*'idelt.

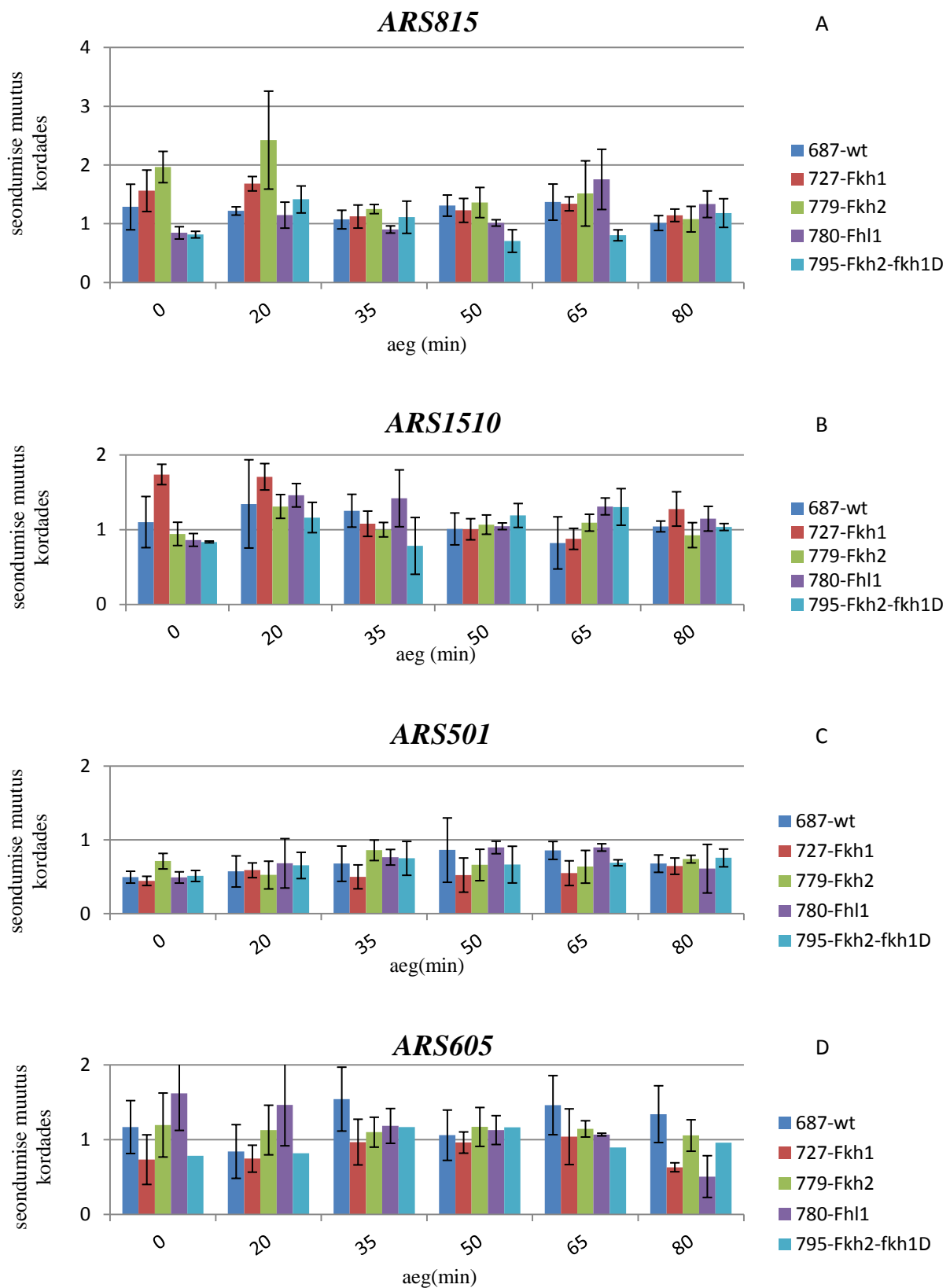


Joonis 7. Kromatiini immunosadestamine. Toodud tüvede negatiivne kontroll (wt), Fkh1, Fkh2, Fhl1 ja Fkh2 (tüves fkh1D) seondumine replikatsiooni alguspunktidele A (*ARS607*), B (*ARS305*), C (*ARS737*), D (*ARS1332*). * $p < 0,05$ indikeeritud sama ajapunkti metsiktüüpi tüve suhtes. Tulemused põhinevad kolmel sõltumatul katsel.

Fkh1 tsükliline seondumine ei ole reegel. Varajased *origin*'id *ARS1206* ja *ARS1510*, mis sisaldavad Fkh1/2 sidumiseks vajalikke järjestusi on assotsieerunud Fkh1-ga kogu rakutsükli vältel (Joonis 8. a,b). See viitab, et Fkh1 seondumine nendele *origin*'idele ei ole rakutsüklist sõltuv. Põhjused, miks Fkh1 seondub osadele *ARS*-idele kogu rakutsükli vältel, aga teistele ainult G1 faasis, pole veel selged ning vajavad edasist uurimist.



Joonis 8. Kromatiini immunosadestamine. Toodud tüvede negatiivne kontroll (wt), Fkh1, Fkh2, Fhl1 ja Fkh2 (tüves fkh1) seondumine replikatsiooni alguspunktidele A (*ARS1206*) ja B (*ARS1614*) * $p < 0,05$ indikeeritud sama ajapunkti metsiktüüpi tüve suhtes. Tulemused põhinevad kolmel sõltumatul katsel.



Joonis 9. Kromatiini immunosadestamine. Toodud tüvede negatiivne kontroll (wt), Fkh1, Fkh2, Fhl1 ja Fkh2 (tüves fkh1) seondumine replikatsiooni alguspunktidele A (*ARS815*), B (*ARS1510*), C (*ARS501*) ja D (*ARS605*). Tulemused põhinevad kolmel sõltumatu katsel.

Käesolevast tööst järeldus, et Fkh1 ei seonu kõikidele varajastele ARS-idele, mis sisaldavad selleks vajalikke järjestusi. Näiteks ei täheldatud tulemustes Fkh1-te *ARS815* ja *ARS1510* proksimaalses alas, kuigi nendes *origin*'ides on olemas Fkh1/2 konsensusjärjestused (Joonis 9 a, b). Tõenäoliselt on need seandumiskohad kromatiini poolt maskeeritud ning ei ole seetõttu Forkhead valkudele ligipääsetavad. Ootuspäraselt ei täheldatud Fkh1 interaktsiooni *ARS605*-ga (varajane ARS) ega *ARS501*-ga (hiline ARS), milles mõlemas Fkh1/2 konsensusjärjestused puuduvad (Joonis 9 c-d).

Teadaolevalt seonduvad Fkh1 ja Fkh2 mõlemad samadele konsensusjärjestustele. Uurides Forkhead faktorite seandumist replikatsiooni alguspunktidega selgus, et Fkh2 seonduv uuritavatest *origin*'idest *ARS607*, *ARS737*, *ARS305* ja *ARS1332*-ga, kuid kõikidel juhtudel jäi tema seandumine oluliselt nõrgemaks kui Fkh1 puhul (Joonis 7 a-d). Selle üheks põhjuseks võib olla, et Fkh1 ja Fkh2 konkureerivad rakkudes samadele seandumiskohtadele ning seega võib Fkh1 takistada Fkh2 seandumist. Selle hüpoteesi testimiseks tehti tüvi, kus FKH1 geen oli deleteeritud ning vaadati, kas sellisel juhul muutub Fkh2 seandumine replikatsiooni alguspunktidega tugevamaks. Katse tulemused näitasid, et FKH1 deleteermine ei muuda oluliselt Fkh2 seandumist ARS-idega. Järelikult pole Fkh2 seandumine replikatsiooni alguspunktidega sõltuvuses Fkh1 valgu olemasolust rakkudes ning tema seandumine *origin*'idega ongi nõrgem kui Fkh1 valgul.

Kirjandusest pärinev info ei viita Fhl1 ega Hcm1 osalemisele replikatsiooni aktiveerimisel. See on kooskõlas antud uurimustööga, mille kohaselt Fhl1 ei seondu töö kasutatud replikatsiooni alguspunktidega (Joonised 7-9). Hcm1 interaktsioonide kohta käesolev töö informatsiooni ei anna, kuna ei suudetud kinnitada interaktsiooni tema positiivse kontrolliga.

2.4 Arutelu

Saccharomyces cerevisiae's autonoomselt replitseeruva järjestuse (ARS) avastamine pani aluse kromosomaalse DNA replikatsiooni mehhanismide uurimisele eukarüootsetes rakkudes. Võrrelduna imetajatega on pagaripärmil erinevad *origin*'ide järjestusspetsiifikad, kuid mõlemal on tugevalt konserveerunud replikatsioonimehhanismid nii molekulaarsel, kui ka rakulisel tasemel (Bell & Dutta 2002). Ilmselt nende omaduste tõttu ongi pagaripärm olnud väga pikalt replikatsiooni uurimisel mudelorganismiks. On ilmsiks tulnud, et päristuumne rakk suudab replitseerida oma DNA mõistliku ajaga, kuna tema genoom sisaldab sadu või koguni tuhandeid vähem või rohkem konserveerunud saite, millelt alustatakse DNA sünteesi. Duplikatsiooni alguse ajastamine on aga oluliselt keerulisem, kui ruumiline kontroll. On teada erinevad faktorid, mis omavad mõju aktivatsiooni ajastusele nagu näiteks DNA ligipääsetavus, transkriptsioon ja DNA replikatsiooni initsiatsiooniks vajalike valkude limitatsioon. Viimane on tõenäoliselt üks olulisematest mõjuritest, mis takistab enamiku ARS-ide aktiveerimist lühikeses ajavahemikus. Praeguseks on loodud replikatsiooni initsiatsiooni kontrolli kirjeldav mudel. Esmalt märgati, et histoonidelt negatiivse laengu eemaldamine deatsetülaasiga Rpd3L põhjustab *origin*'ide aktivatsiooni hilinemist (Knott et al. 2009). Järgnevalt otsiti ARS-e, mida Rpd3L ei deatsetüleeri ning neist regioonidest uuriti potentsiaalsete regulaatorvalkude seondumist. Nii leiti Forkhead transkriptsioonifaktorid, millel täheldati globaalne mõju replikatsiooni initsiatsiooni ajastusele. Fkh1 ja Fkh2 deleteerimine põhjustas rohkem kui pooltel replikatsiooni alguspunktidel initsiatsiooni ajastuse muutuse. Järgnevalt uuriti, kuidas täheldatud regulatsiooni mehhanism töötab. Täheldati, et Fkh1 on vajalik limiteerivas koguses oleva Cdc45 seondumiseks varajastele ARS-idele. Lisaks leiti, et Fkh2 on vajalik *origin*'ide ARS607 ning ARS305 klasterdumiseks. Tulemusena esitati mudel, mille kohaselt Fkh1/2 põhjustavad enese poolt aktiveeritavate ARS-ide klasterdumise piirkonda tuumas, milles on rohkem replikatsiooniks vajalikke valke.

Pea kõikide replikatsiooni alustamiseks vajalike valkude ja DNA vaheliste interaktsioonide kulgemine ajas on teada, kuid hiljuti leitud globaalsete regulaatorite dünaamika kohta puudub info. Pagaripärmis on olemas neli Forkhead transkriptsioonifaktorite perekonna liiget (Fkh1, Fkh2, Fhl1 ja Hcm1), kuid nende kõigi osalust DNA replikatsiooni regulatsioonil pole seni analüüsitud. Selgusetuks on jäänud erinevate Forkhead faktorite seondumise efektiivsus ja dünaamika DNA replikatsiooni *origin*'idele. Lähtuvalt eelmainitud infotühimikest proovibki käesolev magistritöö neid auke täita.

Töö eesmärkide täitmiseks tuli esmalt valmistada uued tüved. Selleks valiti pärmitüvi, mida on võimalik efektiivselt arrestida G1 faasis ning sünkroonselt suunata S-faasi. Selles tüves lisati erinevatele Forkhead perekonna valkudele C-terminaalne epitoop-märkis ning seejärel kontrolliti saadud tüvedes Forkhead perekonna valkude ekspressiooni. Töö tulemusena saadi erinevad tüved, mis sisaldasid ühte märgistatud Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorit.

Esmalt näidati, et valmistatud tüvedes märgiga valgud assotsieeruks oma reguleeritavatele aladele, kinnitades valgu funktsionaalsust. Seda õnnestus näidata kõikide valkude puhul peale Hcm1-i. Ebaõnnestumine võis olla tingitud tõesti rikutud funktsionaalsusest, kuid see on vähe usutav, kuna Hcm1 DNA-ga interakteeruv domään asub valgu N-terminuses, kuid epitoop lisati valgu C-terminusse. Seondumise mittenägemine võis olla tingitud vähesest ekspressioonist ning võimalik, et ka kehvast afiinsusest kontrollitavate regioonide suhtes. Mõlemad nimetatud põhjused muudavad interaktsiooni detekteerimist raskemaks. *Clb2* promootorilt võis täheldada nii Fkh1 kui ka Fkh2 seondumist, mis viitas konkurentsile seondumisel. Ka pilootkatsetel ilmutas Fkh2 vähest seondumise tendentsi Fkh1 seondatavaile *origini*'dele. Lähtuvalt sellest koostati konkurentsivaatlemiseks täiendav tüvi, kus oli Fkh2 *tag*'itud ning fkh1 deleteeritud.

Saamaks infot trans-faktorite seondumise dünaamikast, uuriti Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorite seostumist kogu rakutsükli vältel. Käesolevas töös esitatud tulemustest (joonis 7 a-d) selgus, et Fkh1 interakteerub tsükliliselt varajaste *origin*'idega *ARS607*, *ARS737*, *ARS305* ja *ARS1332*. Assotsiatsioon DNA-ga toimub G1 faasis. Rakkude sisenemisel S-faasi on täheldatav mõningane interaktsiooni nõrgenemine 20 minuti möödumisel ning täiendava 15 minuti möödumisel ei ole interaktsioon detekteeritav. Täheldatud seostumise kadu on tõenäoliselt tingitud uuritava ARS-i aktivatsioonist, mis tingib DNA-ga seotud valkude eemaldamise. Ei ole teada, mis põhjusel Fkh1 uuesti ei seondu, võimalik et Fkh1 transporditakse tuumast välja nagu Hcm1 (Rodriguez-Colman et al. 2010). 80-ndal minutil täheldatav Fkh1 seondumine on arvatavasti tingitud rakkude jõudmisest järgmisse G1 faasi.

Antud töös kasutatud varajased *origin*'id *ARS1206* ja *ARS1614* sidusid Fkh1-te kogu rakujagunemise jooksul ning *origin*'id *ARS815* ja *ARS1510* ei näidanud seondumist, kuigi kõik sisaldasid Fkh1/2 konsensusjärjestust. Selgitamaks põhjust, miks ühe ARS-i puhul Fkh1 seondub tsükliliselt, teisel juhul on seotud konstantselt ning kolmanadal juhul ei interakteeru DNA-ga, analüüsiti Fkh1/2 konsensusaitide paiknemist. Näidati, et tsükliliselt käituvatel

ARS-del on vähemalt kaks Fkh1/2 seandumiseks vajalikku järjestust, mis mõlemad asuvad ORC-i seandumissaidile lähemal kui 67 bp. Konstantsena seondatud ARS-idel on aga nelja lähima Fkh1/2 konsensussaidi keskmine kaugus 220 bp ning mitteseonduvatel ARS-idel keskmine kaugus 290 bp. Seega Fkh1 tsüklilisele iseloomule on omane seonduda ORC-i lähedale, mida soodustab ACS saiti ümbritsev ~125 bp pikkune nukleosoomivaba piirkond. Viimane on tingitud ACS-i ümbritsevast nukleotiidsest ehitusest (Eaton et al. 2010). Käesolevast tööst aga ei, selgu miks ARS1206 ja ARS1614 seovad Fkh1-te kogu rakutsükli jooksul.

Üldjuhul replikatsioonkahvel eemaldab DNA-lt kõik valgud ning seega tõenäoliselt Fkh1 seondub ARS1206 ja ARS1614 proksimaalsetele aladele uuesti vahetult pärast replikatsioonikahvli möödumist, kuid samasugune mehhanism ei toimi teiste *origin*'ide puhul. Fkh1 interaktsioon replikatsiooni alguspunktidega ARS607, ARS737, ARS305 ja ARS1332 toimub alles järgmises rakutsükli, vahetult enne replikatsiooni initsiatsiooni. Siit võib järeldada, et Fkh1 seandumine viimati toodud *origin*'idele on ilmselt inhibeeritud G2/M faasis teadmata mehhanismide kaudu.

Käesolevas töös uuriti Fkh1, Fkh2 ja Fhl1 seandumise dünaamikat varajastele replikatsiooni alguspunktidele, ning täheldati Fkh1seandumise tsüklilisust. Samuti näidati Fkh2 marginaalset seandumist varajastele ARS-idele ning ka seda, et Fkh1 ja Fkh2 ei konkureeri samadele konsensusjärjestustele. Lisaks näidati, et Fhl1 ei seostu rakutsükli üheski etapis varajastele *origin*'itele.

Kokkuvõte

Eukarüootsed replikatsiooni *origin*'id aktiveeruvad rakutsükli S-faasis erinevatel hetkedel ning erineva efektiivsusega. Replikatsiooni initsiatsioon ning selle ajastus on mitmete erinevate regulatsiooni mehhanismide mõju tulemus. Tähtsaimaks peetakse kromatiini efekti, kuna viimane suudab muuta varajase ARS-i hiliseks ja hilise varajaseks. Hiljuti aga näidati Fkh1/2 valkudel võimekust muuta ARS varajaseks olenemata kromatiini pakkumisest.

Näidatud Fkh1/2 efekti üksikasjad ei ole veel selgunud. Sellest lähtuvalt oli käesoleva magistritöö eesmärgiks selgitada kõikide Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorite seondumist huvipakkuvatele *origin*'idele. Eelkõige taheti uurida Fkh1/2 interaktsiooni kogu rakutsükli vältel selgitamiseks transkriptsioonifaktori dünaamikat. Selleks konstrueeriti pagaripärmi tüved, mis sisaldasid antikehaga detekteeritavaid Forkhead perekonna transkriptsioonivalke.

Töö põhimeetod oli kromatiini immunosadestamine, mis kinnitas Fkh1 ja Fkh2 seondumist *origin*'idele ja näitas, et Fhl1 ei seonu varajastele replikatsiooni alguspunktidele. Eelnevalt oli teada, et Fkh1/2 seonduvad samale DNA konsensusjärjestusele, mis annab alust arvata, et Fkh1/2 konkureerivad vabade seondumissaitide pärast. Käesolevas töös näidati, et fkh1 deletsioon ei suurenda Fkh2 seondumist. See näitab, et Fkh2 nõrk interaktsioon varajaste *origin*'idega ei ole tingitud seondumissaitide hõivatusest.

Lisaks õnnestus töös näidata Fkh1 tsüklilist interaktsiooni DNA-ga, kus seondumine toimub M/G1 või G1 faasis ning interaktsioon kaob peale replikatsiooni toimumist. Tõenäoliselt on see tingitud replikatsioonikahvlist, mis eemaldab replitseerudes DNA-lt kõik valgud. Tsükliline interaktsioonitüüp ei olnud ainus, mis leiti. Näidati, et Fkh1 võib olla saitidele seondunud ka kogu rakutsükli vältel. Antud nähtuse põhjus on hetkel teadmata ning vajab täiendavat uurimist.

The role of Forkhead transcription factors in DNA replication of *Saccharomyces cerevisiae*

Summary

In order for a cell to divide one must replicate its DNA first. In eukaryotes the basic concepts of this mechanism are heavily conserved making research on model organisms very informational. *Saccharomyces cerevisiae* contains 400 functional origins that are distinguished by their efficiency and initiation timing. The latter is governed mostly by DNA accessibility, which is also regulated by numerous factors such as acetylation, nucleosome positioning and the properties of the ARS itself. It has been shown that Fkh1/2 are global regulators of DNA replication initiation timing. To date, it is unknown whether any of the other transcription members bind the early firing origins. In addition the binding properties of Fkh1/2 have yet not been shown.

In the present study the main objectives were to find out the binding properties of all Forkhead transcription factors in Budding yeast. For that purpose new yeast strains were constructed, in which one could precipitate specifically the desired tagged protein.

Results revealed that Fkh1 binds to *ARS607* ja *ARS737* more efficiently than Fkh2. A possible competition between Fkh1 and Fkh2 in binding to early origins was examined. Yet no such results were witnessed.

CHIP analysis showed that Fkh1 binds to origins *ARS607*, *ARS737*, *ARS305* and *ARS1332* in a transient manner. Binding takes place in G1 phase and Fkh1 is depleted from studied origins as the bulk replication occurs, which indicates that replication fork progression over the examined locus removes the transcription factor. Fkh1 does not bind to *ARS607*, *ARS737*, *ARS305* and *ARS1332* until the onset of the next replication, indicating that reassociation takes place in G1. In addition we observed that in some origins, such as *ARS1206* and *ARS1614*, Fkh1 does not leave the DNA during the cell cycle. This means that Fkh1 can bind to DNA very quickly after replication fork has duplicated the locus. This implies that Fkh1 does not bind to *ARS607*, *ARS737*, *ARS305* and *ARS1332* in S/G2 and possibly M phase because the binding is inhibited by unknown mechanisms.

Further studies should be carried out to elucidate the role of constant Fkh1 binding to ARS1206 and ARS1614 or their proximal regions and to seek out the mechanisms keeping Fkh1 from quickly binding to duplicated *ARS607*, *ARS737*, *ARS305* and *ARS1332*.

Kirjanduse loetelu

- Aparicio, J.G. et al., 2004. The Rpd3-Sin3 histone deacetylase regulates replication timing and enables intra-S origin control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 24(11), pp.4769–80.
- Aparicio, O M, Weinstein, D.M. & Bell, S P, 1997. Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell*, 91(1), pp.59–69.
- Badis, G. et al., 2008. A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Molecular cell*, 32(6), pp.878–87.
- Bell, S P & Stillman, B, 1992. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, 357(6374), pp.128–34.
- Bell, Stephen P & Dutta, A., 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry*, 71, pp.333–74.
- Bochman, M.L. & Schwacha, A., 2008. The Mcm2-7 complex has in vitro helicase activity. *Molecular cell*, 31(2), pp.287–93.
- Chen, S. & Bell, Stephen P, 2011. CDK prevents Mcm2-7 helicase loading by inhibiting Cdt1 interaction with Orc6. *Genes & development*, 25(4), pp.363–72.
- Dahmann, C., Diffley, John F.X. & Nasmyth, K.A., 1995. S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Current Biology*, 5(11), pp.1257–1269.
- Van Deursen, F. et al., 2012. Mcm10 associates with the loaded DNA helicase at replication origins and defines a novel step in its activation. *The EMBO journal*, 31(9), pp.2195–206.
- Donovan, S. et al., 1997. Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(11), pp.5611–6.
- Drury, L.S., Perkins, G. & Diffley, J.F., 1997. The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *The EMBO journal*, 16(19), pp.5966–76.
- Drury, L.S., Perkins, G. & Diffley, J.F., 2000. The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle. *Current biology*: CB, 10(5), pp.231–40.
- Duan, Z. et al., 2010. A three-dimensional model of the yeast genome. *Nature*, 465(7296), pp.363–7.
- Duncker, B.P. et al., 2002. An N-terminal domain of Dbf4p mediates interaction with both origin recognition complex (ORC) and Rad53p and can deregulate late origin firing.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(25), pp.16087–92.

- Eaton, M.L. et al., 2010. Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes & development*, 24(8), pp.748–53.
- Evrin, C. et al., 2009. A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), pp.20240–5.
- Ferguson, B.M. & Fangman, W.L., 1992. A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell*, 68(2), pp.333–9.
- Ferreira, M.F. et al., 2000. Dbf4p, an essential S phase-promoting factor, is targeted for degradation by the anaphase-promoting complex. *Molecular and cellular biology*, 20(1), pp.242–8.
- Flanagan, J.F. & Peterson, C.L., 1999. A role for the yeast SWI/SNF complex in DNA replication. *Nucleic Acids Research*, 27(9), pp.2022–2028.
- Francis, L.I. et al., 2009. Incorporation into the prereplicative complex activates the Mcm2-7 helicase for Cdc7-Dbf4 phosphorylation. *Genes & development*, 23(5), pp.643–54.
- Friedman, K.L., Brewer, B J & Fangman, W.L., 1997. Replication profile of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VI. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 2(11), pp.667–78.
- Frigola, J. et al., 2013. ATPase-dependent quality control of DNA replication origin licensing. *Nature*, 495(7441), pp.339–43.
- Gambus, A. et al., 2006. GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nature cell biology*, 8(4), pp.358–66.
- Goffeau, A. et al., 1996. Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5287), pp.546, 563–7.
- Goren, A. et al., 2008. DNA replication timing of the human beta-globin domain is controlled by histone modification at the origin. *Genes & development*, 22(10), pp.1319–24.
- Green, B.M. et al., 2006. Genome-wide mapping of DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* reveals that mechanisms preventing reinitiation of DNA replication are not redundant. *Molecular biology of the cell*, 17(5), pp.2401–14.
- Harbison, C.T. et al., 2004. Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature*, 431(7004), pp.99–104.
- Harvey, K.J. & Newport, J., 2003. Metazoan origin selection: origin recognition complex chromatin binding is regulated by CDC6 recruitment and ATP hydrolysis. *The Journal of biological chemistry*, 278(49), pp.48524–8.

- Heller, R.C. et al., 2011. Eukaryotic origin-dependent DNA replication in vitro reveals sequential action of DDK and S-CDK kinases. *Cell*, 146(1), pp.80–91.
- Ilves, I. et al., 2010. Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Molecular cell*, 37(2), pp.247–58.
- Kamimura, Y et al., 2001. Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 20(8), pp.2097–107.
- Kanemaki, M. & Labib, Karim, 2006. Distinct roles for Sld3 and GINS during establishment and progression of eukaryotic DNA replication forks. *The EMBO journal*, 25(8), pp.1753–63.
- Kanke, M. et al., 2012. Mcm10 plays an essential role in origin DNA unwinding after loading of the CMG components. *The EMBO journal*, 31(9), pp.2182–94.
- Klemm, R.D., Austin, R.J. & Bell, Stephen P, 1997. Coordinate Binding of ATP and Origin DNA Regulates the ATPase Activity of the Origin Recognition Complex. *Cell*, 88(4), pp.493–502.
- Knott, S.R. V et al., 2012. Forkhead transcription factors establish origin timing and long-range clustering in *S. cerevisiae*. *Cell*, 148(1-2), pp.99–111.
- Knott, S.R. V et al., 2009. Genome-wide replication profiles indicate an expansive role for Rpd3L in regulating replication initiation timing or efficiency, and reveal genomic loci of Rpd3 function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 23(9), pp.1077–90.
- Kumar, R. et al., 2000. Forkhead transcription factors, Fkh1p and Fkh2p, collaborate with Mcm1p to control transcription required for M-phase. *Current biology*: CB, 10(15), pp.896–906.
- Labib, K, Tercero, J.A. & Diffley, J.F., 2000. Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5471), pp.1643–7.
- Lee, D.G. & Bell, S P, 1997. Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Molecular and cellular biology*, 17(12), pp.7159–68.
- Li, J J & Herskowitz, I., 1993. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5141), pp.1870–4.
- Liang, C. & Stillman, B., 1997. Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes & Development*, 11(24), pp.3375–3386.
- Löoke, M. et al., 2013. Chromatin-dependent and -independent regulation of DNA replication origin activation in budding yeast. *EMBO reports*, 14(2), pp.191–8.
- Löoke, M., Kristjuhan, K. & Kristjuhan, A., 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*, 50(5), pp.325–8.

- Marahrens, Y. & Stillman, B., 1992. A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science (New York, N.Y.)*, 255(5046), pp.817–23.
- Masai, H. et al., 2006. Phosphorylation of MCM4 by Cdc7 kinase facilitates its interaction with Cdc45 on the chromatin. *The Journal of biological chemistry*, 281(51), pp.39249–61.
- Matsumoto, K. & Ishimi, Y., 1994. Single-stranded-DNA-binding protein-dependent DNA unwinding of the yeast ARS1 region. *Mol. Cell. Biol.*, 14(7), pp.4624–4632.
- McInerny, C.J. et al., 1997. A novel Mcm1-dependent element in the SWI4, CLN3, CDC6, and CDC47 promoters activates M/G1-specific transcription. *Genes & development*, 11(10), pp.1277–88.
- Mimura, S. et al., 2004. Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. *Nature*, 431(7012), pp.1118–23.
- Mizushima, T., Takahashi, N. & Stillman, B., 2000. Cdc6p modulates the structure and DNA binding activity of the origin recognition complex in vitro. *Genes & development*, 14(13), pp.1631–41.
- Moll, T. et al., 1991. The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell*, 66(4), pp.743–58.
- Moyer, S.E., Lewis, P.W. & Botchan, M.R., 2006. Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), pp.10236–41.
- Murakami, H. et al., 2010. Regulation of yeast forkhead transcription factors and FoxM1 by cyclin-dependent and polo-like kinases. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(16), pp.3233–42.
- Muramatsu, S. et al., 2010. CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol (epsilon), and GINS in budding yeast. *Genes & development*, 24(6), pp.602–12.
- Nguyen, V.Q. et al., 2000. Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Current biology*: CB, 10(4), pp.195–205.
- Nieduszynski, C.A., Knox, Y. & Donaldson, A.D., 2006. Genome-wide identification of replication origins in yeast by comparative genomics. *Genes & development*, 20(14), pp.1874–9.
- Pacek, M. & Walter, J.C., 2004. A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *The EMBO journal*, 23(18), pp.3667–76.
- Pic, A. et al., 2000. The forkhead protein Fkh2 is a component of the yeast cell cycle transcription factor SFF. *The EMBO journal*, 19(14), pp.3750–61.

- Pickrell, J.K. et al., 2011. False positive peaks in ChIP-seq and other sequencing-based functional assays caused by unannotated high copy number regions. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(15), pp.2144–6.
- Pramila, T. et al., 2006. The Forkhead transcription factor Hcm1 regulates chromosome segregation genes and fills the S-phase gap in the transcriptional circuitry of the cell cycle. *Genes & development*, 20(16), pp.2266–78.
- Raghuraman, M.K. et al., 2001. Replication dynamics of the yeast genome. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5540), pp.115–21.
- Randell, J.C.W. et al., 2006. Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Molecular cell*, 21(1), pp.29–39.
- Remus, D. et al., 2009. Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell*, 139(4), pp.719–30.
- Rivin, C.J. & Fangman, W.L., 1980. Replication fork rate and origin activation during the S phase of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*, 85(1), pp.108–15.
- Rodriguez-Colman, M.J. et al., 2010. The forkhead transcription factor Hcm1 promotes mitochondrial biogenesis and stress resistance in yeast. *The Journal of biological chemistry*, 285(47), pp.37092–101.
- Rowley, A. et al., 1995. Initiation complex assembly at budding yeast replication origins begins with the recognition of a bipartite sequence by limiting amounts of the initiator, ORC. *The EMBO journal*, 14(11), pp.2631–41.
- Rudra, D., Zhao, Y. & Warner, J.R., 2005. Central role of Ifh1p-Fhl1p interaction in the synthesis of yeast ribosomal proteins. *The EMBO journal*, 24(3), pp.533–42.
- Rusche, L.N., Kirchmaier, A.L. & Rine, J., 2003. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of biochemistry*, 72, pp.481–516.
- Rusché, L.N., Kirchmaier, A.L. & Rine, J., 2002. Ordered nucleation and spreading of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 13(7), pp.2207–22.
- Santocanale, C., Sharma, K. & Diffley, J.F., 1999. Activation of dormant origins of DNA replication in budding yeast. *Genes & development*, 13(18), pp.2360–4.
- Sharma, K., Weinberger, M. & Huberman, J.A., 2001. Roles for internal and flanking sequences in regulating the activity of mating-type-silencer-associated replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 159(1), pp.35–45.
- Sheu, Y.-J. & Stillman, Bruce, 2006. Cdc7-Dbf4 phosphorylates MCM proteins via a docking site-mediated mechanism to promote S phase progression. *Molecular cell*, 24(1), pp.101–13.
- Simpson, R.T., 1990. Nucleosome positioning can affect the function of a cis-acting DNA element in vivo. *Nature*, 343(6256), pp.387–9.

- Struhl, K et al., 1979. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(3), pp.1035–9.
- Struhl, Kevin & Segal, E., 2013. Determinants of nucleosome positioning. *Nature structural & molecular biology*, 20(3), pp.267–73.
- Zappulla, D.C., Sternglanz, R. & Leatherwood, J., 2002. Control of Replication Timing by a Transcriptional Silencer. *Current Biology*, 12(11), pp.869–875.
- Zegerman, P. & Diffley, John F X, 2007. Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature*, 445(7125), pp.281–5.
- Zhu, G. & Davis, T.N., 1998. The fork head transcription factor Hcm1p participates in the regulation of SPC110, which encodes the calmodulin-binding protein in the yeast spindle pole body. *Biochimica et biophysica acta*, 1448(2), pp.236–44.
- Takayama, Y. et al., 2003. GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Genes & development*, 17(9), pp.1153–65.
- Tanaka, S. et al., 2011. Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing. *Current biology*: CB, 21(24), pp.2055–63.
- Tanaka, S. & Diffley, John F X, 2002. Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nature cell biology*, 4(3), pp.198–207.
- Tercero, J.A., Labib, K & Diffley, J.F., 2000. DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p. *The EMBO journal*, 19(9), pp.2082–93.
- Theis, J.F. & Newlon, C.S., 1997. The ARS309 chromosomal replicator of *Saccharomyces cerevisiae* depends on an exceptional ARS consensus sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), pp.10786–91.
- Unnikrishnan, A., Gafken, P.R. & Tsukiyama, T., 2010. Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication. *Nature structural & molecular biology*, 17(4), pp.430–7.
- Varrin, A.E. et al., 2005. A mutation in Dbf4 motif M impairs interactions with DNA replication factors and confers increased resistance to genotoxic agents. *Molecular and cellular biology*, 25(17), pp.7494–504.
- Watase, G., Takisawa, H. & Kanemaki, M.T., 2012. Mcm10 plays a role in functioning of the eukaryotic replicative DNA helicase, Cdc45-Mcm-GINS. *Current biology*: CB, 22(4), pp.343–9.
- Venditti, P. et al., 1994. ABFI contributes to the chromatin organization of *Saccharomyces cerevisiae* ARS1 B-domain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1219(3), pp.677–689.
- Vogelauer, M. et al., 2002. Histone Acetylation Regulates the Time of Replication Origin Firing. *Molecular Cell*, 10(5), pp.1223–1233.

Vujcic, M., Miller, C.A. & Kowalski, D., 1999. Activation of silent replication origins at autonomously replicating sequence elements near the HML locus in budding yeast. *Molecular and cellular biology*, 19(9), pp.6098–109.

Lisad

Lisa 1

qPCR-il kasutatud praimerite nukleotiidsed järjestused

1206_NAT_F	AAAGTCCACTGGACGTCAAATCT
1206_NAT_R	CCCGTATTCTAATAATGGACCAATC
1614_NAT_F	CTCAATATCAGTTCACCTTTGAGAGTC
1614_NAT_R	GCTCTACATGTATATATAAACGGCAAG
1510_NAT_F	CTCCAATCAGAAAGTTCCAATACTATT
1510_NAT_R	ACCACATTTTCCCTTAACTGCAC
1332_NAT_F	AGAGCGCGTAAGGTATGTAGAGC
1332_NAT_R	AGCAGGAATTTTCCAACAGCA
815_NAT_F	GCACAGCCACGGGGAAT
815_NAT_R	GTGACCCATACCCACCGAAG
ARS 737NAT_F	TGCTTATTAAGGGTCTAGGACATTT
ARS 737NAT_R	ACTTTTGCTTAAGCGGCAGAAT
ARS 501NAT_F	TGAAGATGACATTGCTCCTTTATTA
ARS 501NAT_R	GCTCAATTTTATATACGCATATGCA
ARS 305NAT_F	TTAAAGTAACTTACACGGGGGCT
ARS 305NAT_R	TGGTAGCACTTTGATGAGGTCTCTA
ARS 605_NATI_F	AAAAGCCCATTGGAATCACTTT
ARS 605_NATI_R	CCGTTTAATTAGCGAGACCAAA
PAU2-F	TCAACTTGGTTGAATTGGGTGT
PAU2-R	GTAGTTGAAAACGGCTTCAGCA
VPSq 8.5kV	TGAGAGACACTATACGACCCAGT
VPSq 8.5kP	TTCTTGAGGCCTATCATTCATCATGT
ARS 607_NAT_F	GAGACTTACACATTATTCGGCACA
ARS 607_NAT_R	TTCGGTACGACACAAAAACAAT

Lisa 2

Töös kasutatud pärimistüvede genotüübid ja tüvede valmistaja

Tüvi	Genotüüp	Kontrüeeritud
AKY687	W303 MAT A, ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2 bar1Δ::hphMX6	Kersti.K
AKY727	W303 MAT A, FKH1-3x5E11tag::natMX6 bar1Δ::hphMX6	Marko.L
AKY779	W303 MAT A, FKH2-3x5E11tag::natMX6 bar1Δ::hphMX6	Allan.R
AKY780	W303 MAT A, FHL1-3x5E11tag::natMX6 bar1Δ::hphMX6	Allan.R
AKY782	W303 MAT A, Hcm1-3x5E11tag::natMX6 bar1Δ::hphMX6	Allan.R
AKY795	W303 MAT A, FKH1-3x5E11tag::natMX6 bar1Δ::hphMX6 fkh1Δ::kanMX	Kersti.K

Lisa 3

Kromatiin immunopretsipitatsiooni puhvrid:

PBS (10x, pH 7,4) 1000 ml

2 g KCl

80 g NaCl

17,8 g Na₂HPO₄·2H₂O

2,4 g KH₂PO₄

FA-lüüsipuhver

50 mM Hepes-KOH pH 7,5

140 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X-100

0,1% Na deoksühoohape

FA500

50 mM Hepes-KOH pH 7,5

500 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X-100

0,1% Na deoksühoohape

LiCl pesulahu

10 mM Tris-HCl pH 8

250 mM LiCl (M_w 42,39)

0,5% NP-40

0,5% Na deoksühoohape

1 mM EDTA55

TES

10 mM Tris-HCl pH 7,5

1 mM EDTA

100 mM NaCl

Elueerimispuhver

100 mM tris pH 7,8

10 mM EDTA

1% SDS

400 mM NaCl

Elueerimispuhver

100mM Tris-HCl PH 7,8

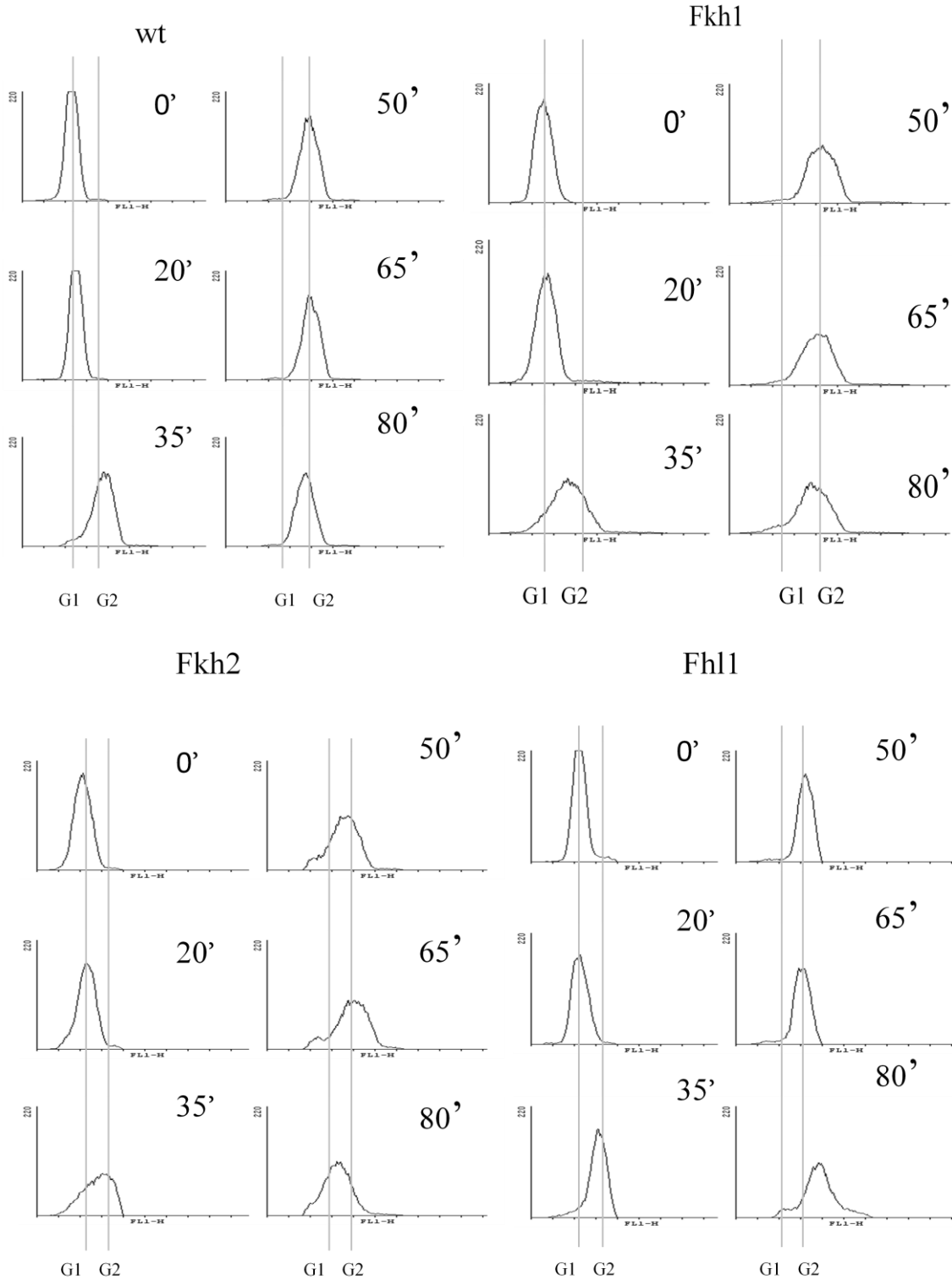
10mM EDTA

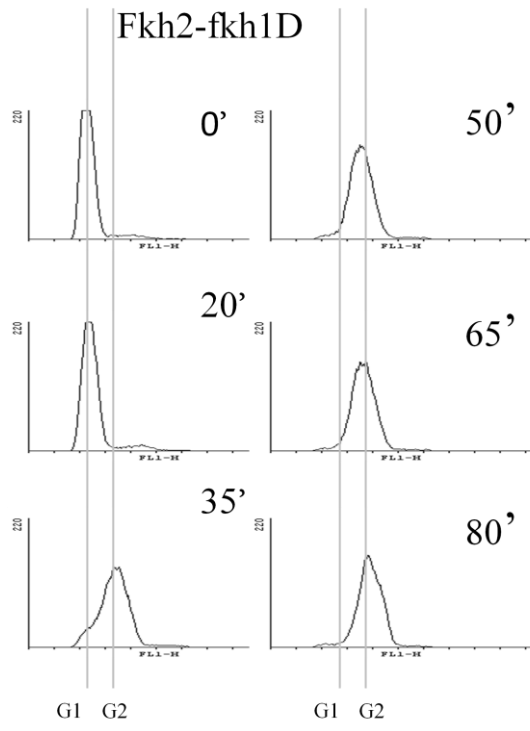
1% SDS

200mM NaCl

Lisa 4

CHIP-il kasutatud rakupopulatsioonide rakutsükli histogrammid. Esitatud on ühe korduse kõikide tüvede ning ajapunktide histogrammid





Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, _____ Allan Reinapae _____
(*autori nimi*)
(sünnikuupäev: _____ 14.02.1987 _____)

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorite roll pagaripärmi
(*Saccharomyces cerevisiae*) DNA replikatsiooni regulatsioonil
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on _____ Marko Lõoke _____,
(*juhendaja nimi*)

- 1.1. Reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. Üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 27.05.2016 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013 (*kuupäev*)