

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIA INSTITUUT

Kristjan Madissoo

**Inimese replikatiivse CMG helikaasi *subühikuid* ekspresseerivate vektorite
konstrueerimine**

Bakalaureusetöö

Juhendajad PhD Ivar Ilves

MSc Sandra Koit

TARTU 2013

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1 SISSEJUHATUS REPLIKATSIOONI INITSIAATSIOONI	5
1.1.1 Replikatsiooni originid.....	5
1.1.2 Originide litsentseerimine.....	6
1.1.3 <i>pre-RC-de aktiveerimine ja origini „käivitamine“</i>	7
1.2 CMG KOMPLEKSI KOMPONENDID JA STRUKTUUR	8
1.2.1 MCM 2-7 heksameer – replikatiivse helikaasi „mootor“	8
1.2.2 GINS 1-4 ja Cdc45 – replikatiivse helikaasikompleksi aktiveerimiseks vajalikud lisafaktorid	11
1.2.3 CMG kompleks – Cdc45L- Mcm2-7-Gins1-4 kompleks.....	11
1.3 EUKARÜOOTIDE GENOOMI REPLIKATSIOONI REGULATSIOON REPLIKATIIVSE HELIKAASI AKTIIVSUSE MÕJUTAMISE KAUDU	12
1.3.1 Rakutsükli faktorite mõju replikatiivse helikaasi kompleksile	12
1.3.1.1 Replikatsiooni aktivatsioon.....	12
1.3.1.2 Rereplikatsiooni tõkestamine	13
1.3.2 Replikatsiooni regulatsioon DNA kahjustuste korral	14
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	15
2.1 TÖÖ EESMÄRGID	15
2.2 MATERJALID JA METOODIKA.....	16
2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid.....	16
2.2.2 Kasutatud söötmed ja rakuliinid	17
2.2.3 Kloneerimine	17
2.2.4 Ekspressioonikontroll <i>E.coli</i> BL21 rakuliinis	20
2.3 TULEMUSED JA ARUTELU	21
2.3.1 Bakuloviirusvektoritel põhinevate inimese CMG ekspressioonikonstruktide konstrueerimine.....	21
2.3.1.1 Bac-to-Bac® bakuloviiruse ekspressioonisüsteem	21
2.3.1.2 Inimese CMG kompleksi subühikute cDNAde amplifitseerimine PCR-i abil	23
2.3.1.3 PCR-i fragmentide restrikteerimine ning ligeerimine pFastBac vektorisse	24
2.3.1.4 Korreksete rekombinantsete plasmiidikloonide selekteerimine	25
2.3.2 Inimese MCM3 ja MCM4 subühikute ekspresseerimine bakteris.....	27
2.3.2.1 Põhjused bakteriekspressioonikonstruktide valikuks.....	27
2.3.2.2 Inimese MCM3, MCM4 ja MCM4dN152 cDNAde amplifitseerimine PCR-i abil....	28
2.3.2.3 Inimese MCM3, MCM4 ja MCM4dN152 cDNAde PCR-i fragmentide restrikteerimine ja ligeerimine pET28-His-Trx-Tev ekspressioonivektorisse	28
2.3.2.4 pET28-His-Trx-Tev ekspressioonivektorite ligatsioonisegude transformatsioon DH5α rakkudesse ja saadud vektorikloonide kontrollrestriksioon.....	30
2.3.2.5 pET28His-Trx-Tev ekspressioonivektorite transformatsioon <i>E.coli</i> BL21 rakkudesse ja esmane ekspressiooni kontroll	32
KOKKUVÕTE	34
SUMMARY.....	35
KIRJANDUSE LOETELU.....	36
KASUTATUD INTERNETI LEHEKÜLJED	38
TÄNUAVALDUSED.....	39

KASUTATUD LÜHENDID

AAA+ - *ATPases Associated with various cellular Activities* (erinevate rakuliste aktiivsustega ATPaasid)

ARS – *autonomously replicating sequence* (autonoomselt replitseeruv järjestus)

APC- *Anaphase Promoting Complex* (anafaasi soodustav kompleks)

BRCT1- *Breast Cancer Gene 1 C Terminal repeats*; (rinnavähi geen 1 C-terminaalsed kordusjärjestused)

Cdc6/45 – *Cell Division Cycle 6/45*

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

Cdt1 - *chromatin licensing and DNA replication factor 1*

CMG- Cdc45L- MCM2-7-GINS1-4 kompleks, replikatiivne helikaas

Dbf4 - *DumbBell Forming 4*

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

Dpb11 - *DNA Polymerase B (II)*

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

MCM – *Mini Chromosome Maintenance*

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

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

Pre-IC - *pre- initiation complex* (pre- initsiatsiooni kompleks)

Sld2/3/5/7 - *Synthetically Lethal with Dpb11-1 2/3/5/7*

SISSEJUHATUS

DNA replikatsioon on protsess, mille käigus ettevalmistusena rakkude jagunemiseks kahekordistatakse kogu genoomne DNA. See on konserveerunud protsess, mille käigus kasutatakse üldjoontes sarnaseid ensümaatilisi aktiivsusi ja etappe kõigis elusorganismides.

Replikatsioon algab DNA järjestustelt, mida nimetatakse replikatsiooni alguspunktideks või ka *originideks*. Nendele järjestustele seonduvad replikatsiooni initsiatsioonil kindlas järjekorras replikatsiooni algatamiseks vajalikud valgud. Replikatsiooni initsiatsioon on jagatud kahte etappi, esiteks litsentseerimise etapp, kus replikatsiooni alguspunktidele laetakse inaktiivses vormis replikatiivse helikaasi MCM2-7 „mootor“ ning teiseks aktivatsiooni etapp, kus *originidele* laetud helikaasi „mootorid“ aktiveeritakse kofaktorite GINS ja Cdc45 sidumise abil. Need kaks protsessi on teineteist välistavad ja seeläbi tagatakse genoomi ühekordne replikatsioon ühe rakutsükli jooksul.

Eukarüootides toimub suur osa genoomse DNA replikatsiooni regulatsioonist replikatiivse helikaasi CMG kompleksi kaudu. Oluline roll on sealjuures erinevatel rakutsükli kontrollkinaasidel, mis fosforüülivad helikaasi kompleksil paiknevaid kindlaid märklaudpiirkondi, mille tulemusel helikaasi omadused ja funktsionaalsus muutub.

Käesoleva töö eesmärgiks oli konstrueerida kahte tüüpi rekombinantseid ekspressioonivektoreid, mille abil oleks võimalik ekspresseerida ja puhastada inimese replikatiivse helikaasi kompleksi üksikuid *subühikuid* või CMG kompleksi tervikuna. kaugemaks eesmärgiks on kaardistada fosforüülimissaidid replikatiivse helikaasi subühikutes ning uurida millist mõju avaldavad kompleksile vastavate saitide fosforüülimised rakuliste kontrollkinaasidega ATM, ATR, Chk1 ja Chk2.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Sissejuhatus replikatsiooni initsiatsiooni

Genoomse DNA replikatsiooni initsiatsioon on rangelt reguleeritud protsess, mis läbib üldjoontes sarnaseid etappe kõigis elavates organismides. Esimeses etapis seonduvad replikatsiooni alguspunktidele ehk *originidele* initsiaator valgud, mis teevad võimalikuks teiste replikatsioonis osalevate faktorite seondumise, viies lõpuks replisoomi assembleerumiseni ning DNA replikatsioonikahvli moodustumiseni. (Kornberg & Baker, 1992).

Replikatsiooni initsiatsioonis on kriitilise tähtsusega roll replikatiivsel DNA helikaasikompleksil. Replikatiivne helikaas on kompleks, mis kasutades ATP energiat liigub replikatsioonikahvli ees ning keerab lahti kaheaheelalist genoomset DNA-d, mis omakorda lubab DNA polümeraasil kasutada neid ahelaid matriitsina uute tütarahelate sünteesiks. (Enemark *et al.*, 2008). Replikatiivse helikaasi korrektne ja õigeaegne *originile* laadimine ja aktiveerimine on initsiatsiooni alustaladeks. See protsess on reguleeritud läbi rakutsükli signaalide, mis määravad DNA sünteesi õigeaegse toimumise ja tagavad kogu genoomi duplitseerimise vaid üks kord rakutsükli jooksul.

1.1.1 Replikatsiooni *originid*

DNA sünteesi alustatakse spetsiifilistelt replikatsiooni alguspunktidelt, mida nimetatakse *origin*'ideks. Eukarüootne genoom sisaldab oma suuruse tõttu tavaliselt sadu kuni kümneid tuhandeid *origine*. Need on DNA järjestused, kuhu seonduvad replikatsiooni käivitamiseks vajalikud valgud. DNA süntees kulgeb mõlemasuunaliselt replikatsiooni alguspunktist eemale, luues kaks eri suunas liikuvat aktiivset replikatsioonikahvli. Prokarüootide ja pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* puhul on replikatsiooni originid teatud konserveerunud järjestuselementidest koosnevad lühikesed järjestused. *S. cerevisiae* originid ehk ARS elemendid (*Autonomously Replicating Sequence*) näiteks on umbes 200 nukleotiidi pikad.

Kõrgemate eukarüootide replikatsiooni aluspiirkonnad on samas pikad, ulatudes tuhandete aluspaarideni ja ei oma DNA järjestuse tasemel selgeid konserveerunud elemente (Dijkwel &

Hamlin, 2002). Samas võib leida teatud järjestuse sarnasusi, näiteks on originipiirkonnad kõrgemates eukariootides tihti A-T rikkad (Kong et al., 2003).

Erinevalt bakteri kromosoomist, kus on vaid üks replikatsiooni origin, on eukariooti kromosoomidel mitmeid replikatsiooni alguspunkte ning need aktiveeruvad eri aegadel rakutsükli S-faasis. (Barberis *et al.*, 2010). Arvukad replikatsiooni alguspunktid eukariootide genoomis lubavad mööda vaadata DNA molekuli suuruse ja replikatsiooni kompleksi limiteeritud kiiruse seatud piirangutest, kuna iga kromosoomi replikatsiooniks kasutatakse üheahelselt teatud vahemaade tagant paiknevaid mitmeid erinevaid *origine*. Siinkohal on väga oluline koordineerida erinevate *originide* aktivatsiooni nii, et iga segment kogu genoomsest DNA'st saaks täpselt paljundatud ning, et see juhtuks vaid ühe korra rakutsükli jooksul (Sun & Kong, 2010).

Kõrgemates eukariootides ei määrata replikatsiooni alguspunkti pelgalt DNA järjestuse alusel, vaid selles mängivad rolli ka teised faktorid nagu kromatiini struktuur ja transkribeeritavate geenide muster, mis erinevad eri tüüpi rakkudes ning võivad seega tugevalt mõjutada *originide* valikut. Kromatiini kontekst mõjutab ka *originide* aktivatsiooni ajastust – varajases S-faasis aktiveeritavad *originid* paiknevad enamasti aktiivselt transkribeeritavates eukromatiini piirkondades ja hilised *originid* tihti kompaktsemalt pakitud heterokromatiini piirkondades (Aggarwal & Calvi, 2004; Kohazaki & Murakami, 2005). Replikatsiooni *originide* regulatsioon kromatiini tasemel võimaldab replikatsiooni *originide* valiku plastilisust ja koordineerimist transkriptsiooniprotsessiga mis erinevates rakkudes on erinev ja võib muutuda ka rakkude diferentseerumise käigus.

1.1.2 Originide litsentseerimine

DNA replikatsiooni initsiatsiooni võib vaadelda kui kahe-etapilist protsessi. Rakutsükli hilises M ja G1 faasis toimivas esimeses etapis, mida kutsutakse litsentseerimiseks, laetakse *originile* inaktiivses vormis MCM2-7 heksameer (*Mini Chromosome Maintenance 2-7*) ja moodustub pre-replikatiivne kompleks ehk pre-RC (*pre-Replicative Complex*) (Boos, *et al.*, 2012). Selleks protsessiks vajalikest valkudest on olulisemad kuuest valgust koosnev ORC kompleks (*Origin Recognition Complex*), Cdc6 (*Cell division cycle 6*) ja Cdt1 (*Chromatin licensing and DNA replication factor 1*) (Vashee *et al.*, 2003). Origini valiku määrab ära ORC kompleksi seondumine. Peale ORC kompleksi seondumist *originile* tuuakse kohale ka Cdc6 ja Cdt1 valgud ning MCM2-7 subühikud. Nii ORC1-6, Cdc6 kui ka Cdt1 valgud kuuluvad

AAA+ valguperekonda (*ATPases Associated with various cellular Activities*). MCM2-7 laadimiseks DNA'le on vaja nii ORC kui ka Cdc6 ATPaasset aktiivsust. Mutatsioonid, mis kaotavad ORC-de või Cdc6 ATP hüdrolyüüsi võime, on rakkudele letaalsed ning nendes rakkudes on raskendatud pre-RC-de kokkupanek. (Randell *et al.*, 2006). Pre-RC moodustumiseks on vajalik madal tsükliin sõltuva kinaasi (CDK, *Cycline Dependent Kinase*) aktiivsus. Kõrge CDK aktiivsus hoiab ära pre-RC komplekteerimise, kuna fosforüleerib pre-RC komponente ja takistab nende korrektset talitlemist (Nguyen *et al.*, 2001).

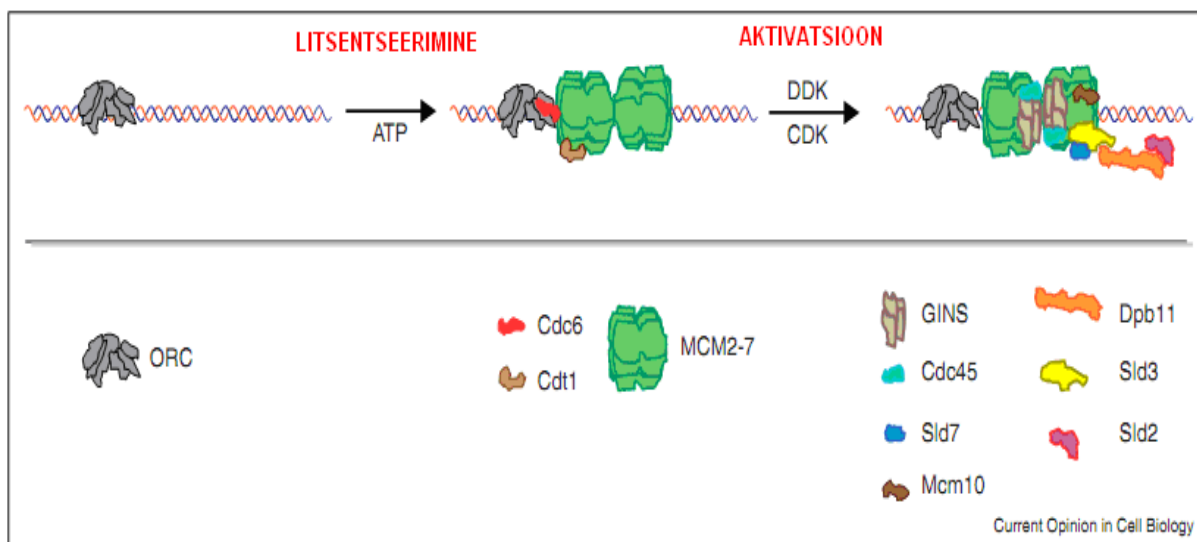
Paradoksaalsel kombel aktiveeritakse igas S-faasis vaid osa eelnevalt litsenseeritud originidest, mis tähendab, et litsenseeritakse rohkem origine kui tegelikult kasutatakse. Selle protsessi eesmärgiks võib olla kasutada „liigseid“ komplekse kui varuvarianti, mis aktiveeritakse vaid siis, kui vastavate kromosoomipiirkondade replikatsioon on häiritud näiteks lähenevate replikatsioonikahvlite kollapseeerumise või takerdumise tõttu kahjustunud DNA piirkodades. Lähedal asuvate vaikiolikus *originide* aktiveerimise järel initsieerivad nad taas DNA sünteesi ning püüavad tagada poolelijäänud genoomi segmentide täisulatuses replikatsiooni. (Sun & Kong, 2010)

1.1.3 pre-RC-de aktiveerimine ja *origini* „käivitamine“

Kuna MCM2-7 heksameer laetakse DNA-le inaktiivses vormis, on replikatsiooni käivitamiseks vajalik laadimisetapile järgnev aktivatsioonietapp, mida kutsutakse ka *origini* „käivitamiseks“ või „tulistamiseks“ (ingl. k. *origin firing*). Selle käigus aktiveeritakse kaksikahelalisele DNA-le laetud MCM2-7 rõngas lisafaktorite seondumise läbi protsessis, mida kontrollivad kaks rakutsükli kontrollkinaasi CDK ja DDK (DDK ingl *Dbf4 Dependent Kinase*). Aktivatsiooni käigus lisatakse MCM2-7 kompleksile Cdc45 ja heterotetrameerne GINS kompleks, mis koosneb Psf1-3 ja Sld5 valkudest. Peale Cdc45 ja GINS kompleksi (jaapani keeles *Go-Ichi-Ni-San* kompleks) laadimist, moodustub aktiivne CMG helikaasne kompleks (CMG- Cdc45-MCM2-7- GINS kompleks), millega seonduvad DNA polümeraas ning teised replikatsioonikompleksi komponendid ja käivitub replikatsioon.

CMG kompleks puhastati esmakordselt *Drosophila* embrüo-ekstraktist, kus näidati ka, et CMG kompleks omab helikaasest aktiivsust (Moyer *et al.*, 2006). CMG kompleksi assambleerimiseks on vajalikud mitmed lisafaktorid. Pagaripärmis läbi viidud uuringud on identifitseerinud neist olulisematena valgud Sld2, Sld3, Sld7, Dpb11 ja MCM10, mis moodustavad CMG kompleksi loomiseks kriitilise pre- initsiatsioonikompleksi (pre-IC, *pre-*

initiation complex). See on ajutine kompleks, mis laguneb peale CMG kokkupanekut (Zou & Stillman, 2000).



Joonis 1.

DNA replikatsiooni initsiatsioon *Saccharomyces cerevisiae*.

Esimese etapina toimub litsentseerimine, kus MCM2-7 heksameer laetakse DNA *originile* inaktiivses vormis. See protsess on sõltuv ATP-st, kuue subühikulisest ORC kompleksist ja laadimisfaktoritest Cdc6 ja Cdt1. Teises etapis ehk helikaasi aktivatsioonis toovad proteiinkinaasid CDK ja DDK kohale initsiatsioonifaktorid Sld2, Sld3, Sld7, Dpb11, Mcm10 ning CMG kompleksi moodustavad Cdc45 ja GINS kompleksi ning fosforüülivad vastavate komplekside subühikuid moodustamaks järgnevas etapis aktiivse CMG helikaasi. NB! Sellel pildil pole kujutatud täielikult aktiveeritud helikaasi. (Tõlgitud Boos *et al.*, 2012)

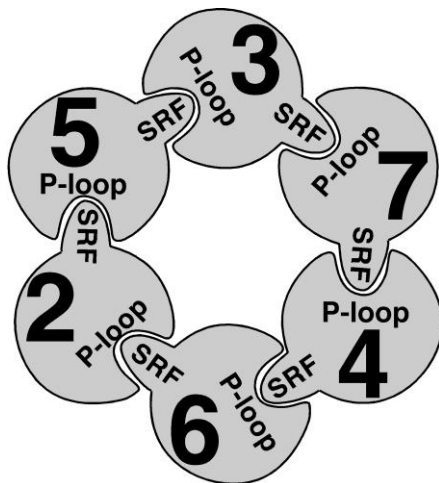
1.2 CMG kompleksi komponendid ja struktuur

1.2.1 MCM 2-7 heksameer – replikatiivse helikaasi „mootor“

Eukarüootides moodustavad CMG helikaasi tuumiku MCM2-7 heksameeri 6 subühikut. Kõik 6 subühikut on suuresti homoloogsed, kuid mitte identsed. Heksameerset rõngasjat kompleksi moodustades assotsieerub iga subühik enda kõrval paiknevate teiste subühikutega ning nende paiknemisjärjekord on erinevates eukarüootsetes organismides samasugune. (Davey *et al.*, 2003)

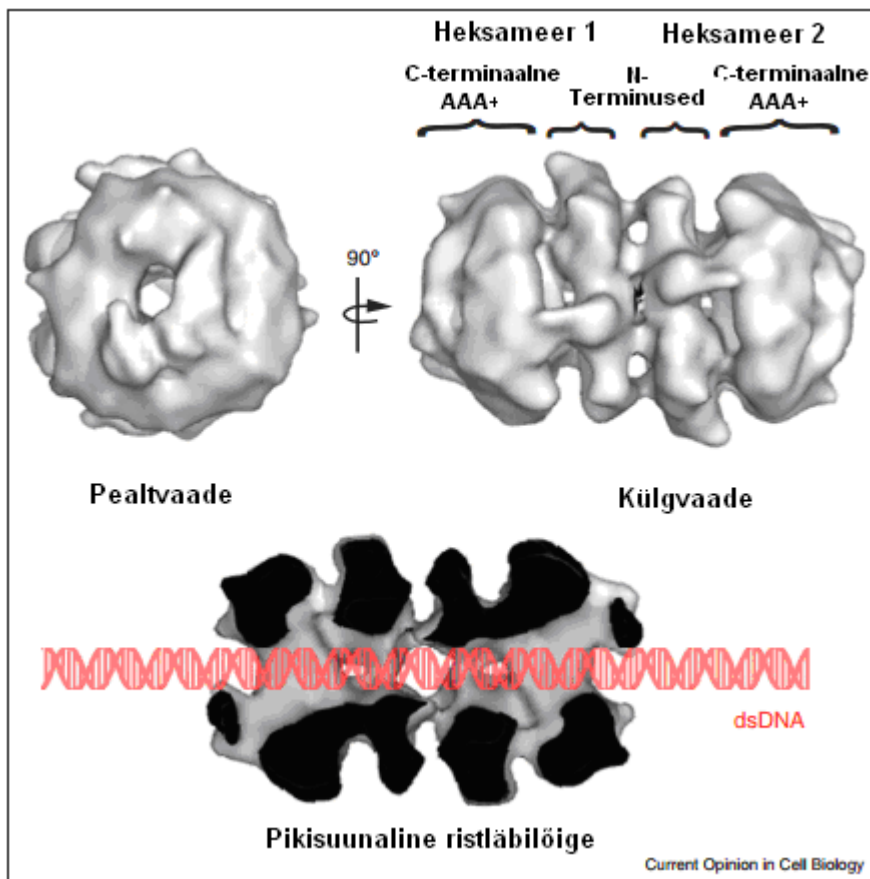
Nagu ORC1-6, Cdc6 ja Cdt1, kuuluvad ka MCM valgud AAA+ valkude superperekonda. AAA+ valgud täidavad organismis mitmeid väga erinevaid ülesandeid ja sisaldavad endas konserveerunud ATP sidumise ja hüdrolyüsi domääne. AAA+ valguperekonna liikmed moodustavad tihtipeale suuri ATP-st sõltuvaid komplekse, mis sagedasti omavad heksameerset vormi. Ka MCM-del on sellised konserveerunud domäänid olemas ning seal toimuv ATP hüdrolyüs varustab helikaasi mootorit energiaga ja annab sellele liikumapaneva jõu (Forsburg, 2004). MCM2-7 kompleksi teeb huvitavaks asjaolu, et ATP sidumiseks ja hüdrolyüsiks vajalikud struktuurid „taskud“ moodustuvad iga naabersubühikute paari vahele, kusjuures kumbki subühik panustab selle tasku moodustumiseks vajalikke struktuuri-elemente. Selleks, et moodustuks funktsionaalne MCM2-7 heksameer peavad subühikud paiknema omavahel kindlas järjekorras ning interakteeruma oma naabritega.

MCM-id eristuvad teistest AAA+ valkudest kõigis kuues subühikus paikneva ja vaid MCM valkudele eriomaseid elemente sisaldava kõrgelt konserveerunud ATPaasi domääni poolest, mida kutsutakse ka MCM boxiks (Tye & Sawyer, 2000). MCM box hõlmab umbes 200 aminohappe pikkust ala, mis sisaldab endas kahte ATPaasi konsensus motiivi. Esiteks Walker A motiiv, mis hõlmab endas ka aktiivsaide P-loopi. See sisaldab endas kõigis ATPaasset aktiivsust omavates valkudes esinevat invariantset lüsiinijääki. Võrreldes teiste Walker A motiivi sisaldavate valkudega, on toimunud MCM perekonna valkude Walker A konsensus järjestuses muutus, milles glütsiini jääk on asendatud kas arginiini või seriiniga. Koos teiste konserveerunud aminohappe jääkidega moodustavad need MCM-spetsiifilise konsensusjärjestuse. GDPxx(S/A)KS. Teiseks sisaldab MCM box Walker B motiivi. Klassikaline Walker B element on suur ja hüdrofoobne ning arvatakse, et see osaleb pigem ATP hüdrolyüsis kui seondamises. MCM valkude puhul on Walker B motiiv osa IDEFDKM järjestusest, mis on konserveerunud kõigis MCM valkudes ja mis määrab ära MCM perekonda kuuluvuse. Lisaks omavad veel kõik MCM valgud lühikest motiivi SRFD, mis asetseb umbes 70 aminohappejäägi kaugusel Walker B motiivist ja mis moodustab „arginiin sõrme“, mis on samuti vajalik efektiivseks ATP seondamiseks ja hüdrolyüsiks (Forsburg, 2004).



Joonis 2.

In vitro tehtud paarikaupa katsed on näidanud, et MCM2-7 heteroheksameeris on üksikute subühikute asetus selline nagu on näha ülalolevalt pildilt. P-loop-i, mis on osa Walker A motiivist ning SRF motiivi, mis moodustab „arginiin sõrme“, interaktsioonil moodustub funktsionaalne domään, mis seondab ja hüdrolyüsib helikaasi liikumiseks vajaminevat ATP-d. (Davey *et al.*, 2002)



Joonis 3.

Pre-RC-de DNA-le laadimise tulemus.

Joonisel on 3D rekonstrueering MCM2-7 kaksikheksameerist, mis on laetud DNA-le inaktiivses vormis. Kaksikahelaline DNA modelleeriti pikisuunaliselt kompleksi läbivasse kanalisse. (Tõlgitud Boos *et al.*, 2012)

1.2.2 GINS 1-4 ja Cdc45 – replikatiivse helikaasikompleksi aktiveerimiseks vajalikud lisafaktorid

GINS 1-4 valgud, mida kõrgemates eukarüootides tuntakse ka kui Sld5, Psf1, Psf2 ja Psf3, seostuvad spetsiifiliselt MCM rõnga neljandale *subühikule* ning suurendavad selle afiinsust kaheaheelalise DNA suhtes (Ilves, *et al.*, 2010)

Cdc45 ja GINS suurendavad CMG kompleksi DNA sidumise võimet võrreldes tavalise MCM2-7 heksameeriga. See saab võimalikuks läbi kahe mitte üksteist välistava ja võibolla sünergilise mehhanismi. Kaudselt võivad need aktiveerivad faktorid põhjustada struktuurseid muutusi MCM heksameeris, mis võimaldab muidu varjatud motiividele parema juurdepääsu. Samuti võivad nad soodustada tavaliselt struktureerimata osakeste organisatsiooni abifaktoriteta heksameeris, mis omakorda võib viia tugevama DNA sidumiseni CMG kompleksis. Teiseks võivad CMG kompleksi abistavad faktorid seonduda otseselt matriits DNA-ga. Viimast võimalust soosivad uurimused, mis on näidanud, et inimese GINS suudab seonduda DNA substraadile (Boskovic *et al.*, 2007).

GINS kompleks ja ka Cdc45 on mõlemad hädavajalikud nii replikatsiooni efektiivseks initsiatsiooniks kui ka replikatsioonikahvlite probleemide vabaks liikumiseks elongatsioonil. (Labib & Gambus, 2007)

GINS kompleksi konserveerunust replikatsiooni initsiatsioonil näitab tõsiasi, et GINS-i homologe on leitud ka arhedest. Sealsed GINS-id moodustavad samuti heterotetrameeri, kuid erinevalt eukarüootidest, ei moodustu see tetrameer mitte neljast erinevast monomeerist nagu arhedel, vaid kahest homodimeerist. Need homodimeerid on moodustunud eukarüootide Psf1-st ja Sld5-st. See annab aluse arvata, et evolutsioonilise arengu käigus on kahest GINS kompleksi *subühikust* saanud 4 erinevat valku, mis moodustavad eukarüootse GINS1-4 kompleksi (Oyama, *et al.*, 2011)

1.2.3 CMG kompleks – Cdc45L- Mcm2-7-Gins1-4 kompleks

Kuigi siiani pole veel suudetud üksikutest puhastatud CMG kompleksi osadest kokku panna aktiivselt töötavat helikaasi, näitasid Ilves *et al.* *Drosophilast* puhastatud CMG kompleksi ja putukarakkudes koekspressseeritud MCM2-7 subühikute abil, et CMG kompleksi helikaanse aktiivsus on sadades kordades suurem võrreldes tavalise MCM

kompleksi aktiivsusega. Mainitud avastus annab head tõendusmaterjali selle kohta, et CMG kompleks on replikatiivse helikaasi funktsionaalne vorm. (Ilves *et al.*, 2011)

MCM kompleksi puhul on teade, et heksameeri 2. ja 5. subühiku vaheline interaktsioon on nõrgem kui teised naabrite vahelised interaktsioonid, mistõttu on nende kahe vahel justkui avaus, millest võib läbi mahtuda DNA. (Davey *et al.*, 2003; Crevel *et al.*, 2001)

Kui Cdc45 ja GINS kompleks seonduvad MCM heksameerile, täidavad nad vahe MCM-i 2. ja 5. subühiku vahel ning moodustavad otsekui silla, mis tagab moodustunud CMG kompleksi kindlama püsivuse DNA-l ning takistab helikaasi maha „kukkumist“ kromosomaalselt DNA-lt.

Selle tulemusena võtab CMG kompleks konformatsiooni, mida kirjanduses nimetatakse planaarseks suletud vormiks. (Ingl. *Planar, gapped-ring form*) See on topoloogiliselt suletud vorm, mis omab suurt sisemist kanalit, millesse seotakse DNA ahel, mida mööda helikaas liigub. (Ilves *et al.*, 2011)

1.3 Eukarüootide genoomi replikatsiooni regulatsioon replikatiivse helikaasi aktiivsuse mõjutamise kaudu

1.3.1 Rakutsükli faktorite mõju replikatiivse helikaasi kompleksile

1.3.1.1 Replikatsiooni aktivatsioon

Replikatsiooni saab käivitada pre-RCga laetud *originidelt*, kuid mitte enne, kui rakutsükkel on jõudnud S-faasi. S-faasi indutseerimine on vajalik, sest siis tõuseb rakus erinevaid replikatsioonifaktoreid fosforüleerivate rakutsükli kinaaside aktiivsus. Selleks, et käivitada replikatsiooni on peamiselt vaja CDK (tsükliin-sõltuvad kinaasid) ja DDK (Dbf4-sõltuvad kinaasid) valkude hulga tõusu. Nende tase püsib kõrge rakutsükli S-faasist kuni M-faasi lõpuni. Nende ensüümide poolt läbi viidud fosforüleerimiste tulemusel tõuseb CMG kompleksi helikaasne aktiivsus, replikatsioon käivitatakse ning DNA polümeraasi abil algab ahela elongatsioon. Samal ajal kindlustab CDK-de kõrge tase rakus replikatsiooni ühekordse toimumise ühe rakutsükli vältel (Masai *et al.*, 2010).

Replikatsiooni aktivatsioon on komplekssete sündmuste jada, milles lisaks CDK ja DDK kinaaside taseme tõusule on praeguste teadmiste järgi vaja veel vähemalt kuue abifaktori seondumist *originile*. Nendeks faktoriteks on Mcm10, Dpb11, Sld2, Cdc45, Sld3 ning GINS kompleks. CDK-d omavad positiivset mõju replikatsioonile kuna nad fosforüleerivad Sld2 ja Sld3. Fosforüülimise tulemusena on nimetatud faktorid võimelised seonduma Dpb11 valguga. Sld2 ja Sld3 fosforüülimise tulemusena tekivad neile seondumissaidid BRCT1 korduste jaoks (Ingl. *Breast Cancer Gene 1 [BRCT1] C Terminal repeats*; rinnavähi geen 1 C-terminaalsed kordusjärjestused), mida omab Dpb11 (Tanaka *et al.*, 2007). Tänu sellele protsessile suudab tekkinud kolmikkompleks enda külge siduda GINS kompleksi ja Cdc45 ning toimetada nad MCM heksameerile laadimiseks vajalikku asupaika. DDK kinaasid omakorda fosforüleerivad MCM kompleksi 3. ja 4. subühikut ning teevad need vastuvõtlikuks Cdc45 sidumisele. (Bell & Dutta, 2002).

Replikatsiooni aktivatsioonivalkude seondumine initsiatsioonikompleksile on üksteisest tugevalt sõltuv ning teeb võimalikuks elongatsiooni alustamiseks vajaliku DNA ahela lahtikeerdumise (Ilves *et al.*, 2010).

1.3.1.2 Rereplikatsiooni tõkestamine

Genoomse stabiilsuse säilitamine on oluliseks eelduseks kõigi elusorganismide normaalse elutegevuse tagamiseks ja püsima jäämiseks. On väga tähtis, et replikatsiooni käigus saaks kahekordistatud kogu genoomne DNA ning ükski piirkond ei saaks replitseeritud rohkem kui ühe korra rakutsükli jooksul. MCM2-7 heksameeri laadimine DNA-le on inhibeeritud CDK kinaaside poolt. Seetõttu saab see toimuda ainult olukorras, kus CDK-de tase on madal. Selline olukord valitseb rakutsükli G1 faasis. CDK kinaaside taseme tõus rakutsükli G1- S üleminekul inhibeerib edasist pre-RCde laadimist *originidele* ning takistab seeläbi korduvat replikatsiooni (Diffley, 2011).

CDKde peamine rereplikatsiooni takistav mehhanism, mis on näidatud pagaripärmis, on Cdc6 fosforüleerimine, mille tagajärjel valk lagundatakse. Cdc6 omab olulist rolli MCM2-7 heksameeri laadimisel ORC kompleksi poolt äratuntud replikatsiooni alguspunktile. Lisaks seonduvad CDK kinaasid ka ORC kompleksiga, mistõttu on vastav kompleks inaktiivses vormis rakutsükli S- ja G2 faasi ajal. Lisaks sellele initsieerivad CDK kinaasid rakutsükli S-,

G2- ja varase M-faasi käigus Cdt1 ja MCM2-7 valkude transporti tuumast välja, et nende ligipääs DNA *originidele* oleks takistatud (Blow & Dutta, 2005).

Geminini avastamine kõrgemates eukarüootides ning tema võime inhibeerida pre-RCde moodustumist näitas, et mitte kõik ebasoovitavate pre-RCde formeerumist takistavad mehhanismid ei sõltu suurenenud CDK aktiivsusest. Geminini tase hakkab tõusma S faasis ning tõus jätkub kuni hilise M-faasini, mille lõpuks Geminin ubiquitinüleeritakse ja lagundatakse APC-sõltuval reaktsioonil (APC- ingl *Anaphase Promoting Complex*). Geminin takistab MCM-de laadimist kromatiinile ilma ORC-d ja Cdc6-te mõjutamata (Kirschner & McGarry, 1998) Leiti, et inimese Geminin assotsieerub HsCdt1-ga ning pre-RCde kokkupaneku inhibitsiooni Gemini poolt saab ümber pöörata, kui lisada *Xenopuse* embrüo ekstraktile liias HsCdt1'te (Wohlschlegel *et al.*, 2000).

Kuna Geminini ekspresseeritakse rakkudes alles siis kui algab S-faas ja ta saadetakse lagundamisele mitoosis, siis võib arvata, et Geminin panustab ka rereplikatsiooni takistamise, inhibeerides Cdt1 funktsiooni pärast replikatsiooni algust(Wohlschlegel *et al.*, 2000); (Kirschner & McGarry, 1998) .

1.3.2 Replikatsiooni regulatsioon DNA kahjustuste korral

Kui S-faasis olevad rakud satuvad genotoksilise stressi mõju alla , siis välditakse kahjustada saanud matriits-DNA edasist replitseerimist. Selleks kasutatakse S-faasi kontrollpunktide radasid, mis kontrollivad nii replikatsiooni initsiatsiooni kui ka elongatsiooni etappe. Punguvas pärmis tehtud uurimused näitavad, et uute replikatsioonikahvlite moodustumine peatatakse genotoksilise stressi tingimustes. Blokeering saavutatakse valguliste faktorite, mis tõenäoliselt vastutavad CMG kompleksi assambleerimise ja aktivatsiooni eest, kontrollpunkt sõltuva fosforüleerimise teel. Tundub, et sarnane protsess leiab aset ka kõrgemates organismides. Samas, kontrollpunktide rajad, mis reguleerivad juba liikuma hakanud replikatsioonikahvlite tööd, ei ole praeguseks ajaks veel eriti hästi mõistetavad. Tundub, et üks osa nendest radadest vastutab replisoomi kompleksi stabiilsuse eest matriits-DNA kahjustuste või nukleotiidide puuduse korral. Teine osa radadest võib otseselt aeglustada edasi liikuvat replikatsioonikahvli (Jones & Petermann, 2012).

Replikatiivne helikaasi kompleks on atraktiivne sihtmärk reguleerijate molekulaarsele võrgustikule, seal hulgas radadele, mis reguleerivad genotoksilise stressi vastuseid, mis

töötavad rakutsükli S faasis. Selle tõestuseks on näidatud, et *Drosophila* Chk2 suudab fosforüülida CMG kompleksi *in vivo* ja selline fosforüülimine inhibeerib CMG aktiivsust. Nende protsesside põhjalikum tundma õppimine ja mõistmine on aluseks, mille kaudu suudaksime mõista kriitilisi molekulaarseid radu, mis vastutavad geneetilise stabiilsuse hoidmise eest eukarüootides. Laiemas kontekstis võimaldaks nendest radadest arusaamine arendada välja tõhusamaid meetodeid vähi vastases võitluses kuna vähi tekke ja genoomi ebastabiilsuse vahel on leitud kindlaid seoseid (Ilves et al, 2012).

ATM, ATR ja kinaasid Chk1, Chk2 on kaks paari homoloogseid seriin/treoniin spetsiifilisi proteiinkinaase, mis on tuntud kui peamised koordinaatorid genotoksilise stressi vastuste korral. ATM- Chk2 süsteem näib aktiveeruvat, kui tegemist on kaheaahelaliste katketega DNA ahelas ja ATR-Chk1 siis, kui tekib üheaahelaline DNA katkestus või kui replikatsioonikahvel on kollapseeunud. Samas on näidatud, et kahe erineva raja vahel toimub ulatuslik koosmõju (Jones & Petermann, 2012)

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli konstrueerida rekombinantsed vektorid, mille abil oleks võimalik ekspresseerida ja puhastada inimese CMG helikaasikompleksi ja selle üksikuid alaosi. Töö käigus konstrueeriti kahte eri tüüpi vektoreid, mis võimaldavad kasutada kahte erinevat ekspressiooni strateegiat

- 1) Bakuloviirusvektoritel põhinevad konstruktid ning nende ekspresseerimine kasutades bakuloviiruse ekspressiooni süsteemi. Nende abil on võimalik koekspresseerida ja puhastada komplektne CMG helikaas, mis võimaldaks meie edaspidistes uuringutes jälgida erinevate reguleerivate fosforüülimiste mõju funktsionaalsele CMG kompleksi aktiivsusele.
- 2) Bakteri plasmiididel põhinevad konstruktid ning nende ekspresseerimine kasutades bakteri ekspressiooni süsteemi. Nende abil on võimalik ekspresseerida ja puhastada CMG kompleksi üksikuid *subühikuid* ning kasutada vastavaid valke substraadina reguleerivate kinaaside modifikatsioonisaitide kaardistamiseks mass-spektromeetria abil.

2.2 Materjalid ja meetodika

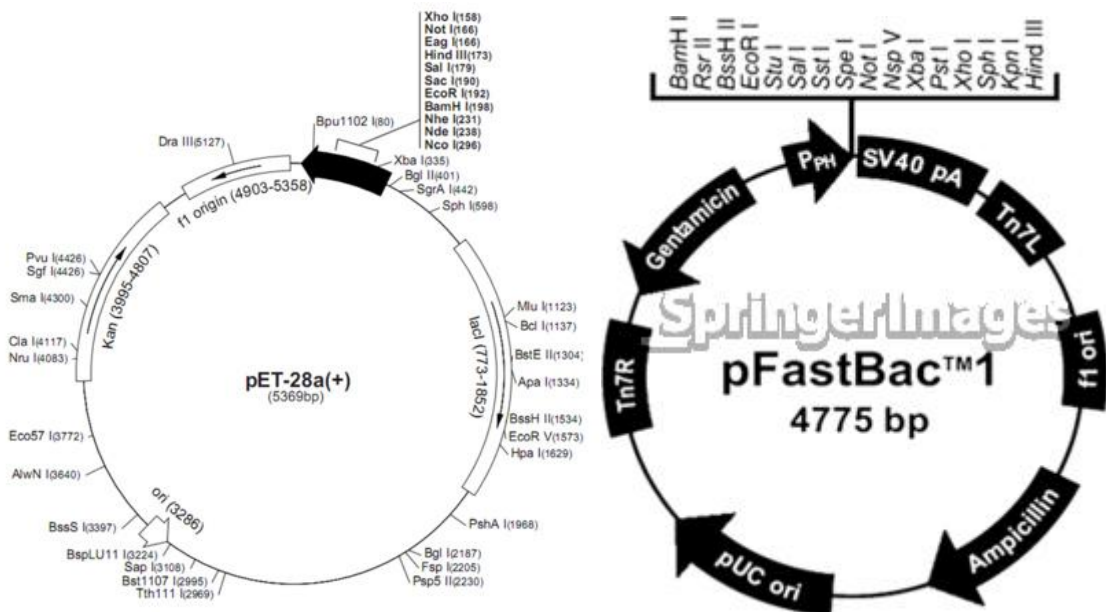
2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid.

a) pET28-His-Trx-Tev

5.8kb pikkune kanamütsiini resistentsusgeeni sisaldav vektor, mis on konstrueeritud A.Lulla poolt (tulemused publitseerimata) pEt28a(+) plasmidi põhjal. Vektorile on lisatud kolm *tag*'i, His, Trx ja Tev. His tähendab polühistiidiini *tag*'i. See on afiinsus *tag*, mille kaudu seonduvad valgud puhastamise käigus nikkel kandjale. Trx on tioredoksiin *tag*, mille ülesandeks on hoida ekspresseeritavad valgud lahustununa. Tev-*tag* on proteaasi lõikesait, mille tunneb ära kõrge spetsiifilisusega TEV proteaas. Tänu sellele saidile eemaldatakse pärast valgu puhastamist tema küljest kõik *tag*'id, mis tagab, et need ei hakka segama valgu natiivset konformatsiooni. Plasmidi joonis, koos temas paiknevate elementide ja restriksioonisaitidega lk .

b) pFastBac1

4775bp pikk vektor, mis sisaldab ampitsilliini resistentsusgeeni. Tegemist on kommertsiaalse vektoriga firma Invitrogen poolt. Plasmiid koos temas paiknevate elementide ja restriksioonisaitidega **joonisel 4**.



Joonis 4. Töös kasutatud plasmiidid.

Vasakul on pET-28a(+) plasmiidikaart ning paremal pFastBac-1 plasmiidikaart.

2.2.2 Kasutatud söötmed ja rakuliinid

Kõikides kloneerimise transformatsioonietappides kasutati *Escherichia coli* DH5 α rakke. Rakke kasvatati Difco™ LB vedel- või tardsöötmele, mis sisaldas liitri kohta 35g trüptooni, 35g pärmiekstrakti, 5g NaCl ja 15g agarit. Ekspressioonikontroll viidi läbi *E.Coli* BL 21 rakuliini rakkudes ning neid kasvatati Difco™ 2x YT söötmes. Sööde sisaldas liitri kohta 16g trüptooni, 10g pärmiekstrakti ja 5g NaCl-i.

2.2.3 Kloneerimine

Kõikide konstruktidite amplifitseerimiseks kasutatud praimerid on toodud **Tabelis 1 ja 2**.

PCR viidi läbi 50 μ l ja reaktsioonisegu sisaldas endas 10 μ l 1xHF puhvrit (1.5mM MgCl₂, 5 μ l 2mM dTNP, 2.5 μ l Fw ja Rev praimereid, 0.1 μ l matriits DNA, 0.5 μ l Phusion® (toodetud firma Finnzymes poolt) polümeraasi, lõppmahuni lisati mQ vett. PCR-i reaktsioonid viidi läbi programmeeritavas termotsükleris (Tprofessional *basic* Thermocycler, Biometra, Saksamaa). DNA fragmentide amplifitseerimiseks kasutati Phusion polümeraasile eripärast *2-step* programmi:

Algne denaturatsioon: 98 °C 30 sek minutit

Denaturatsioon: 98 °C 10 sekundit

Praimerite seondumine ja ekstensioon: 72 °C 1 min ja 30 sekundit

Lõpp-ekstensioon: 72 °C 10 minutit

} 30 tsüklit

Kõikide fragmentide puhul see ei toiminud ja siis kasutati tavalist 3 astmelist programmi, mille korral praimerite seondumistemperatuur oli 66°C.

Amplifikatsioonireaktsiooni produktid lahutati geelelektroforeesil 1.2%-lises agarosgeelis TAE puhvris (Tris-atsetaat-EDTA) (40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA, pH 8.0). Saadud DNA fragmendid lõigati agarosgeelist välja ja puhastati, kasutades NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit'i (MachereyNagel, Düren, Saksamaa) ning jälgides tootjapoolset juhendit. Järgnevalt restrikteeriti kõiki fragmente ja plasmide vastavate ensüümidega (vt **tabel 3 ja tabel 4**). Reaktsiooni üldmahuks oli 50 μ l ja see sisaldas endas 5 μ l Fermentase *Yellow, Red Orange, Green või FastDigest* puhvrit, 2 μ l DNA fragmenti, 0,5 μ l kumbagi ensüümi. Lõppmahuni lisati mQ H₂O-d. Kõik restriksioonil kasutatavad ensüümid olid Leedu firma Fermentas toodang. Proove restrikteeriti 1.5h 37 °C juures, misjärel puhastati otse reaktsioonisegust kasutades NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit'i. Bakuloviirus konstruktidite puhul tuli kanda proovid geelile, sooritada elektroforees, produktid geelist välja lõigata ja puhastada NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up Kit'i.

Pärast restriksiooni käivitati ligatsioonireaktsioon. Selle jaoks segati kokku reaktsioonisegu mahus 10µl. Reaktsioonisegu sisaldas 1 µl T4 ligaasi puhvrit (4 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05 mM ATP), 0.5µl plasmidi, 0.5µl sisestatavat fragmetni ja 0.5µl T4 DNA ligaasi. Nii T4 puhver kui ka ligaas olid firma Fermentas toodang. Ligatsioon toimus üleöö 18°C juures.

Pärast ligeerumist transformeeriti saadud konstruktid DH5α rakkudesse. Selleks pandi eelnevalt külmutatud DH5α rakud jääle sulama. Peale sulamist lisati ligatsioonisegule 70µl kompetentseid rakke. Proov supendeeriti ning asetati 30 minutiks jääle. Samal ajal segati valmis SOC lahus, mis sisaldas endas SOB söödet (ühe liitri kohta 20g trüptooni, 5g pärmiekstrakti, 0.5g NaCl, 10ml 250mM KCl) ja 40% glükoosi, mida lisati 10µl/ml SOB kohta. Pärast seda inkubeeriti proovi 42°C juures 2 min, et tekitada rakkudes *heat-shock* seisund. Pärast seda inkubeeriti rakke jääl 3 min ning siis lisati proovidele 800µl SOC sööde. Rakke inkubeeriti loksutil 37°C juures tund aega. Pärast seda fuugiti rakud põhja (5min-5000rpm), eemaldati üleliigne sööde ning rakud plaaditi ampitsilliini sisaldavatele LB tardsöötme tassidele (bakulo konstruktid puhul sisaldasid tassid kanamütsiini).

Pärast 16h rakkude kasvamist eraldati tassilt 6 kolooniat, mis pandi kasvama kuude 3ml LB söödet sisaldavatesse katseklaasidesse. Söötmele lisati ka vastavat antibiootikumi kontsentratsioonis 100µg/ml. Rakke kasvatati 16h.

Pärast rakkude kasvatamist puhastati nendest välja uuritav plasmid kasutades Favorprep Plasmid DNA Extraction Mini Kit'i. Puhastamisel järgiti tootjapoolset protokollit. (Favorgen Biotech corp., Austraalia)

Pärast uuritava DNA puhastamist sooritati kontrollrestriksioon konstruktid õigsuse kontrollimiseks. Kontrollrestriksioon viidi läbi samas mahus ja koostises nagu eelpool mainitud restriksioonil, kuid DNA konstrukti lisati eelneva 5µl asemel 2µl. Kontrollrestriksioonil kasutatud ensüümid, puhvrid ning oodatavad produktide pikkused toodud **Tabelis 3 ja 5.**

Tabel 1. PCR-il kasutatud praimerid

Tabelis on näidatud erinevate CMG kompleksi *subühikute* amplifitseerimiseks kasutatud oligonukleotiidid. Joonega on märgitud praimerite otstesse lisatud restriктаaside löikekohad. Antud oligonukleotiidid leidsid kasutust töös 2.3.1

Konstrukt	Kasutatud oligonukleotiidid	Fragmendi pikkus
HsMCM2	Fw-5' <u>GCGGATCC</u> ATGGCGGAATCATCGGAATCC Rev-3' CG <u>CTCGAGT</u> CAGAACTGCTGCAGGATCATTTTC	2.72 kbp
HsMCM3	Fw-5' ATGGCGGGTACCGTGGTGC Rev-3' CGGA <u>AGCTTT</u> CAGATGAGGAAGATGATGCCCTC	2.43 kbp
HsMCM4	Fw-5' TAGGATCCATGTCGTCCCCGGCGTC Rev-3' ATCTCGAGTCAGAGCAAGCGCACGGTc	2.6kbp
HsMCM5	Fw-5' GCGGATCCATGTCGGGATTCGACGATCCT Rev-3' CGGA <u>AGCTTT</u> CACTTGAGGCGGTAGAGAACCTT	2.2 kbp
HsMCM6	Fw-5' TAGGATCCATGGACCTCGCGGCGG Rev-3' GCCTGCAGTCAATCTTCGAGCAAGTAGTTAGGGTTA	2.45 kbp
HsMCM7	Fw-5' GCGAATTCATGGCACTGAAGGACTACGCGC Rev-3' GCCA <u>AGCTTT</u> CAGACAAAAGTGATCCGTGTCCG	2.16 kbp
HsGINS1	Fw-5' GCGGATCCATGTTCTGCGAAAAAGCCATGG Rev-3' CG <u>CTCGAGT</u> CATGACAGGATGTGCTCCAGG	0.59 kbp
HsGINS2	Fw-5' TAGGATCCATGGACGCTGCCGAGGTCG Rev-3' CG <u>CTCGAGT</u> CTAGAAGTCCTGAGACTGAGTACTCTCCAGAG	0.56 kbp
HsGINS3	Fw-5' GCGAATTCATGTCAGAGGCTTATTTCCGAGTGG Rev-3' CG <u>CTCGAGT</u> TTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCA	0.65 kbp
HsGINS4	Fw-5' GCGAATTCATGACCGAAGAAGTGGATTTCTTG Rev-3' CG <u>CTCGAGT</u> TAAATTAGCTGGACAGCTCCAGATG	0.67 kbp
HsCDC45L	Fw-5' GCGGATCCATGTTTCGTGTCCGATTTCCGC Rev-3' CG <u>CTCGAGT</u> CTAGGACAGGAGGGAAATAAGTGCG	1.7 kbp

Tabel 2. PCR-il kasutatud oligonukleotiidid.

Tabelis on näidatud erinevate CMG kompleksi *subühikute* amplifitseerimiseks kasutatud oligonukleotiidid. Joonega on märgitud praimerite ottesse lisatud restriктаaside löikekohad. Antud oligonukleotiidid leidsid kasutust töös 2.3.2

Konstrukt	Kasutatud oligonukleotiidid	Fragmendi pikkus
hMCM3	Fw-5' <u>CCGTCTCTTCAGATGGCGGGTACCGTGGTGC</u> Rev-3' CCCA <u>AGCTTTCAGATGAGGAAGATGATGCCCTCA</u>	2.43 kbp
hMCM4	Fw-5' <u>CCCGGTCTCTTCAGATGTCGTCCCCGGCGTTCG</u> Rev-3' <u>GGCTCGAGTCAGAGCAAGCGCACGGTCTTC</u>	2.6 kbp
hMCM4dN152	Fw-5' <u>CCCGGTCTCTTCAGATGTGGGGAACAGATGTAA</u> ATGTGGCAG Rev-3' <u>GGCTCGAGTCAGAGCAAGCGCACGGTCTTC</u>	2.15 kbp

2.2.4 Ekspressioonikontroll E.coli BL21 rakuliinis

Selleks, et kontrollida, kas meie poolt sisestatud plasmiidilt ekspresseeritakse valku, tuli transformeerida loodud konstruktid *E. Coli* BL21 tüve rakkudesse. Transformatsiooniks võeti eelnevalt külmutatud BL21 rakud jääle sulama ning pärast sulamist segati kokku transformatsiooni segu. Segu mahuks oli 200µl ning ta sisaldas endas 20µl 5xKCM lahust, 100µl BL21 kompetentseid rakke, plasmidi ca 45 ng/µl ning mQ vett lõppmahuni. Reaktsioonisegu inkubeeriti 20 minutit jääs. Pärast seda tehti rakkudele 1 minuti jooksul *Heat-shock* ja seejärel hoiti neid veel 2 minutit jääs. Pärast seda lisati segule 500µl LB söödet ning proovid viidi tunniks ajaks 37°C juurde loksutile. Tunni aja pärast tsentrifugeeriti rakud põhja (2min, 6000rpm), üleliigne sööde eemaldati ning rakud plaaditi kanamütsiini ja klooramfenikooli sisaldavatele tassidele. Rakkudel lasti kasvada 37°C juures 18 tundi. Järgmisel päeval eraldati tassidelt koloonia, mis pandi kasvama 5ml LB söötmesse, kuhu oli lisatud klooramfenikooli 50 µg/ml ja kanamütsiini 100 µg/ml. Kanamütsiin oli transformeeritava plasmidi resistentsusmarker ning klooramfenikool on BL21 rakuliini tüvemarker. Rakke kasvatati üleöö 37°C juures loksutil.

Vahepeal valmistati 2xYT söötmed. Selleks kaaluti 31g Difco™ 2xYT söötmesegu ühe liitri vee kohta. Saadud sööde autoklaaviti 121°C juures 15 minutit.

Pärast rakkude kasvamist tehti neist 1000x lahendus. Selleks kultiveeriti 500µl rakke sisaldavat söödet 500ml 2xYT söötmesse. Rakkudel lasti kasva kuni optilise tiheduse 0.8

saavutamiseni (mõõdeti spektrofotomeetriga Ultrospec™ 7000, GE Healthcare Life Sciences). Seejärel rakuti jahutati jäävannil 16°C-ni ning indutseeriti IPTG-ga (750 µl/l). Pärast seda kasvatati rakke veel 12 tundi loksutil 18°C juures.

Pärast seda võeti bakterikultuuri ja söötme suspensioonist 200µl proov, millele lisati 40 µl 6xSDS lahust (375mM Tris mille pH 6.8, 10% SDS, 50% glütserool, 10% β-merkaptopetaanool, 0.03% Bromo Blue). Proove keedeti 100°C juures 5min ning kanti seejärel 10% SDS-poliakrüülamiid geelile (lahutav osa: 30% akrüülamiid segu, 1.5M Tris mille pH 8.8, 10% SDS, 10% ammooniumpersulfaat, TEMED 1 µl/ 2.5 ml segu kohta; kontsentreeriv osa: 30% akrüülamiid segu, 1 M Tris mille pH 6.8, 10% SDS, 10% ammooniumpersulfaat, TEMED 1 µl/ 2.5 ml segu kohta).

Loksutile jäänud proovid tsentrifugeeriti sademe kogumiseks temperatuuril 4°C 10 minutit 4500rpm-i juures. Kasutati firma Sorvall RC-5 tsentrifuugi. Tekkinud bakterisadet pesti 1xPBS-iga, misjärel fuugiti neid temperatuuril 4°C 15 minutit 4500rpm-i juures ülalmainitud tsentrifuugiga. Pärast seda eemaldati rakkudel 1xPBS-i lahus ning neile lisati lüüsipuhvrit 10ml/1g sademe kohta. Lüüsipuhvri pH oli 7.4 ning ta sisaldas endas 300mM NaCl, 10% glütserooli, 0.2mM PMSF proteaasi inhibiitoreid, 15mM imidasooli, 2mM β-merkaptopetaanooli ja 50µl Roche proteaasi inhibiitori kokteili. Saadud lüsaat külmutati vedelas lämmastikus ning hoiustati -80°C juures. Rakke oli vaja lüüsida ja säilitada, et tulevikus saaks edasi minna valgupuhastus eksperimentidega.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Bakuloviirusvektoritel põhinevate inimese CMG ekspressioonikonstruktsioonide konstrueerimine

2.3.1.1 Bac-to-Bac® bakuloviiruse ekspressioonisüsteem

Bakuloviirustel põhinevaid ekspressioonisüsteeme kasutatakse laialdaselt eukariootsetes rakkudes rekombinantsete valkude ja valgukomplekside puhastamiseks. Tegemist on kitsa peremehespetsiifilisusega ja seetõttu suhteliselt ohutute putukaviirustega. Valke ekspresseeritakse putukatest pärit püsirakuliinides, mida on võimalik kasvatada ka suures mahus loksutikultuurides. Bakuloviiruse ekspressioonisüsteemi abil on puhastatud ka aktiivne rekombinantne äädikakärbse (*Ilves et al.*, 2010) ning inimese (*Kang et al.*, 2012) CMG helikaasikompleks, mis koosneb 11 erinevast subühikust. Hetkel on see ainuke

ekspressioonisüsteem, mis võimaldab puhastada rekombinantset CMG helikaasikompleksi selle biokeemilist analüüsi võimaldavais kogustes. Bakuloviirustel põhineva ekspressiooni süsteemi kasutamine on hädavajalik, sest ainult nii saab korraga koekspresseerida kõiki 11 CMG helikaasi *subühikut* ning puhastada aktiivset kompleksi. Minu töö üheks eesmärgiks oli konstrueerida rekombinantsed bakuloviirusvektorid inimese CMG kompleksi subühikute ekspresseerimiseks. Terviklikku kompleksi on vaja, et näha millist mõju avaldavad rakutsükli kinaaside poolt läbi viidavad modifikatsioonid helikaasi kompleksi talitlusele. Samuti selleks, et üle kontrollida CMG *subühikutes* kaardistatud fosforüülimissaidid ning vaadata, kas need toimivad ka täielikult kokku pandud kompleksis aktiivsete saitidena. Esineda võib erinevusi, kuna täiskompleksis ei pruugi olla kõik üksikute *subühikute* peal määratud saidid ligipääsetavad, sest kompleksi assambleerimisel muudavad osalevad valgud oma konformatsiooni ning mõni aktiivne sait võib saada maskeerituks, mistõttu vastavas positsioonis enam fosforüülimist ei toimu.

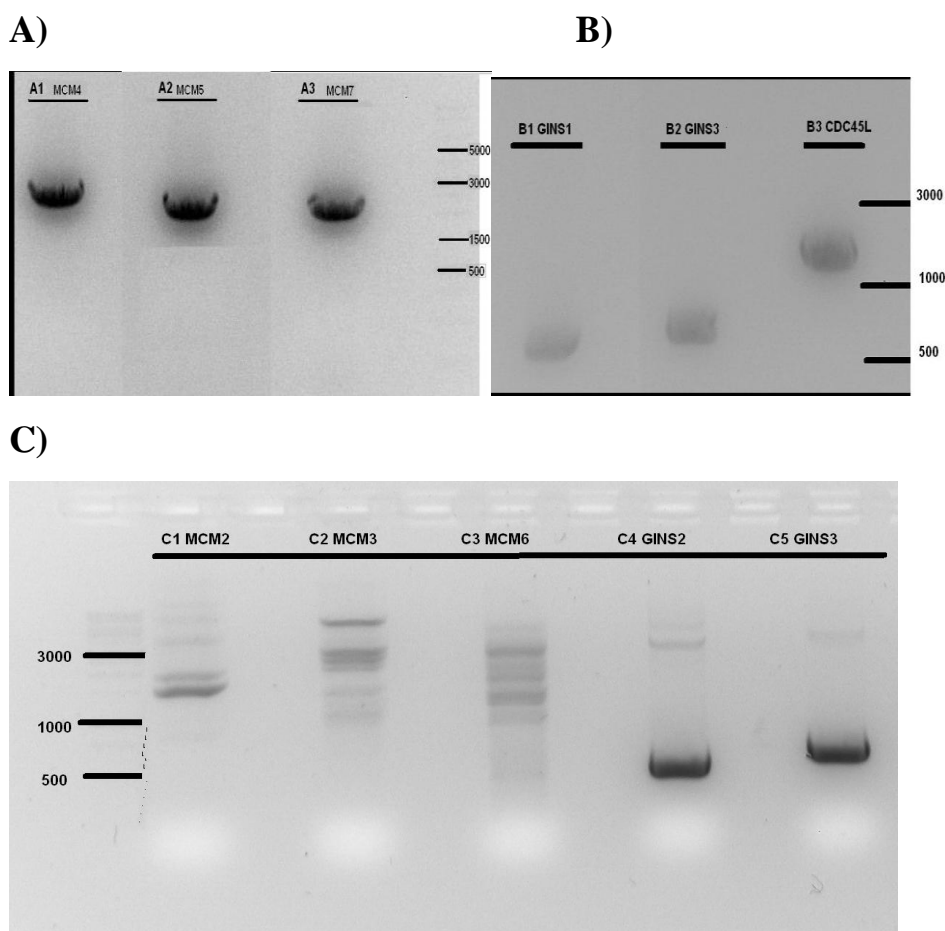
Bakuloviirustel põhineval ekspressiooni süsteemil on mõningad puudused, nagu näiteks madal saagis, mistõttu ei ole mõttekas seda süsteemi kasutada helikaasi üksikute *subühikute* puhastamiseks. Samuti tekib probleem fosforüülimissaitide kaardistamisega, kuna bakuloviirusvektor peab ekspressiooniks rekombineeruma putukarakkude genoomi. Teatavasti toimub eukarüootides valkude post-translatsiooniline modifitseerimine ja see teeb aktiivsete fosforüülimissaitide kaardistamise raskemaks, sest mõningad meid huvitavad saidid võivad olla juba rakkudes fosforüülitud enne kui valk puhastatakse.

Bakuloviirusvektorite konstrueerimiseks kasutasin Bac-to-Bac® ekspressiooni süsteemi (Invitrogen). Esimeses etapis kloneeritakse vajalikud cDNA-d pFastBac1 rekombinatsiooni doonorplasmidi. Saadud plasmid transformeeritakse edasi DH10Bac™ E. coli bakteritüvesse, kus toimub kloneeritud cDNA-d ekspresseeriva kassetti rekombinatsioon selles bakteritüves plasmidina (bakmiidina) püsivasse bakuloviiruse genoomi. Saadud rekombinantne viirusgenoom eraldatakse minipreparatsiooni teel ja transfekteeritakse putukarakkudesse, kus toimub intaktsete bakuloviiruspartiklite pakkimine ja eraldamine rakusöötmesse. Rakusööde on seega madala tiitriga viirusstokk, mida saab edasi nakatada uutesse putukarakkudesse. Selle eesmärgiks on kas viiruse paljundamine ja kõrgema tiitri saavutamine või nakatamine valguekspressiooni tarvis nakatavatesse rakkudesse.

Oma töö käigus konstrueerisin pFastBac1 rekombinatsiooni doonorplasmidid, mis kannavad inimese CMG kompleksi subühikute cDNAsid.

2.3.1.2 Inimese CMG kompleksi subühikute cDNAde amplifitseerimine PCR-i abil

Selleks, et konstrueerida 11 erinevat CMG kompleksi *subühikut* ekspresseerivat bakuloviirust, tuli esmalt luua huvipakkuvate insertidega pFastBac1 konstruktid. Konstruktide loomise esimeseks etapiks oli amplifitseerida PCR-i abil CMG kompleksi kõigile 11 *subühikule* vastavaid cDNA kloonide kandvaist algvektoreist. Vajalikud cDNA kloonid osteti Dana-Farber/Harvard Cancer Center plasmidikogust. PCR-i läbiviimiseks kasutatud praimerite nimekirja leiab **tabelist 1**.



Joonis 5. PCR-i tulemused

Joonistel on kujutatud amplifitseerimisreaktsiooni tulemused. Joonisel A) ja B) on samaegselt ja samadel tingimustel toimunud PCR reaktsiooni tulemused. Kasutatud programmi leiad leheküljelt 17. Joonisel C) on korratud PCR-i fragmentidele, mida ei õnnestunud esimesel korral amplifitseerida. Siinkohal kasutati 3 astmelist PCR-i programmi ning muudeti anniilumise temperatuuri. Joonistel on: A): A1) MCM4, A2) MCM5 A3) MCM6, B): B1) GINS1, B2) GINS3, B3) CDC45L, C: C1) MCM2, C2) MCM3, C3) MCM6, C4) GINS2, C5) GINS4. Joonisel C positsioonides 1-3 ei saanud PCR-i tulemusel oodatud pikkusega fragmente

Kuigi PCR-i praimerite disainimisel püüti tagada olukord, kus kõigil praimeritel on ühesugune anniilumis temperatuur, siis praktika näitas, et alati ei toimu kavandatud protsess plaanipäraselt. Esimest korda polümeraasi ahelreaktsiooni läbi viies kasutati Phusion™ polümeraasile omast kaheastmelist programmi (vt. lk 17), mille anniilumis ja ekstensiooni temperatuur oli 72°C. Sellistel tingimustel suudeti edukalt amplifitseerida MCM4, 5 ja 7, GINS1 ja 3 ning CDC45L (MCM4- 2.6kbp, MCM5- 2.2kbp, MCM7- 2.16kbp, GINS1- 0.59kbp, GINS3- 0.65kbp ja CDC45L- 1.7kbp). Teistkordsel PCR-i läbiviimisel kasutati klassikalist kolmeastmelist programmi mille anniilumistemperatuuriks oli 66°C ning tulemuslikult amplifitseerusid GINS2 ja GINS4 (GINS2- 0.56kbp, GINS4- 0.67kbp). MCM2, 3 ja 6 puhul andisid ka muudetud reaktsioonitingimused tulemuseks ühe kindla DNA fragmendi asemel mitmest fragmendist koosneva „redeli“. Eeldatavalt õige pikkusega fragmente geelist puhastades õnnestus järgnevais etappides saada kloone MCM2 ja 6 puhul, kuid nende sekveneerimisel selgus, et nad ei vastanud NCBI andmebaasis ära toodud referentsjärjestustele, mistõttu pole neid käesolevas töös kajastatud.

MCM3 puhul ei õnnestunud mingeid kloone saada. Algsete cDNA kloonide kontrollsekveneerimine näitas, et kui MCM2 ja MCM6 puhul olid kasutatud kloonid korrektsed ja PCR reaktsioon ei töötanud ilmselt praimerite ebaõnnestunud disaini tõttu, siis MCM3 puhul oli meile tootja poolse vea tõttu saadetud vale cDNA kloon, mistõttu konstrueeritud praimerid ei suutnud seonduda antud DNA-le ja seetõttu ei andnud ka amplifikatsioon tulemusi. Praeguseks on hangitud ka MCM3-st uus, töötav kloon ning kõik 11 subühikut on konstrueeritud eraldi vektoritesse ning valmis kasutamiseks.

2.3.1.3 PCR-i fragmentide restrikteerimine ning ligeerimine pFastBac vektorisse

Pärast CMG kompleksi *subühikute* amplifitseerimist ja produktide puhastamist geelist oli tarvis neid lõigata restriksiooniensüümidega. Samade ensüümidega lõigati ka pFastBac1 vektorit. Sellise lõikuse tulemusena tekitati nii vektorile, kui ka fragmendile identsed kleepuvad otsad, mis seejärel DNA ligaasi abil ühendati. Vektor avati *multi cloning site-s* paiknevate vastavate restriктаaside äratundmisjärjestuse koha pealt. Ka kloneeritavatesse fragmentidesse olid sisse viidud vastavate ensüümide lõikesaidid. See sai võimalikuks tänu oskuslikule PCR-i praimerite disainile, mille tulemusel PCR-i käigus tekitati fragmentide otstesse vastavate restriksiooniensüümide lõikesaidid (praimerid **Tabel 1 lk 19** ja pFastBac **joonis 4 lk 16**). Saadud ligatsioonisegudega transformeeriti kompetenseid *E. coli* DH5α tüve rakke.

Konstrukt	Restriktaasid	Produktide oodatavad pikkused	Puhver
MCM 4	BamHI ja XhoI	4.77kB ja 2.6kB	Yellow
MCM 5	BamHI ja HindIII	4.77kB ja 2.2kB	Yellow
MCM 7	EcoRI ja HindIII	4.77kB ja 2.16kB	Red
GINS 1	BamHI ja XhoI	4.77kB ja 0.59kB	Yellow
GINS 2	BamHI ja XhoI	4.77kB ja 0.56kB	Yellow
GINS 3	EcoRI ja XhoI	4.77kB ja 0.65kB	Orange
GINS 4	EcoRI ja XhoI	4.77kB ja 0.67kB	Orange
CDC45L	BamHI ja XhoI	4.77kB ja 1.7kB	Yellow

Tabel 3 Restriktsioonil kasutatud ensüümid ja puhvrid

Tabelis on toodud restriktaasid, mida kasutati fragmentide lõikamiseks klonermisel ja kontrollrestriktsioonil. Samuti ka kontrollrestriktsioonil oodatavate produktide pikkused. pFastBac1 vektorit lõigati samade ensüümidega nagu konstruktigi. Puhvrite valikul lähtuti parimate tulemuste saavutamiseks tootjapoolsetest soovitustest.

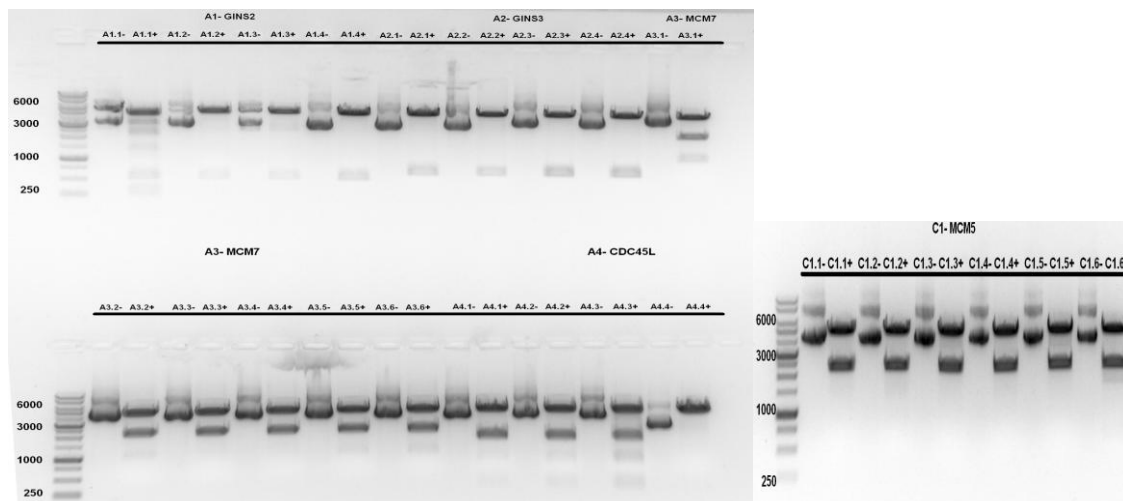
2.3.1.4 Korrektsete rekombinantsete plasmiidikloonide selekteerimine

Pärast transformatsioonikolooniate üleskasvamist valiti välja iga erineva konstrukti ligatsiooniseuga transformeeritud tassilt 6 kolooniat, mida kasvatati LB vedelsöötmes edasi, et oleks võimalik läbi viia esmane rekombinantsete kloonide õigsuse analüüs. Transformatsioonitasside kasvutiheduse võrdluses kontrolltassidega, milledele oli kantud vaid vastavate ensüümidega töödeldud „tühi“ pFastBac 1 vektor, leiti, et mõttekas on valida välja vähemalt 6 kolooniat. Kuna kontrolltassid olid väga hõreda kasvuga, siis järeldasime, et ligatsioon on kulgenud edukalt ning 6 kolooniat on piisav kogus leidmaks õiget konstrukti sisaldav koloonia.

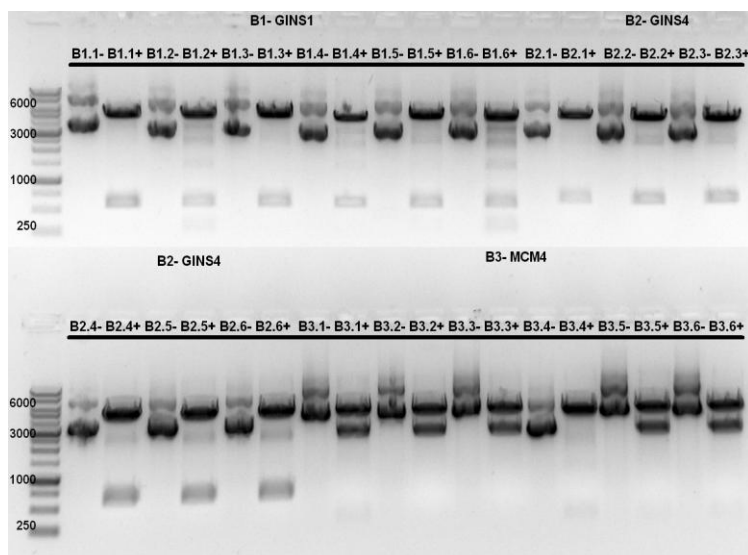
Kloneerimisel avati plasmiid kahe erinevaid kleepuvaid otsi tekitava restriktaasi poolt mitmel põhjusel. Esiteks selleks, et vältida plasmiidi iseendaga ligeerumist ja teiseks, et tagada meie poolt sisestatava fragmendi õigesuunaline orientatsioon. Samuti aitas see meil läbi viia kontrollrestriktsiooni, kuna kasutasime samu ensüüme, mida kloneerimiselgi. Sama restriktaasi äratundmissait sai tekkida ainult juhul kui fragment oli õige orientatsiooniga ligeerunud plasmiidi. Selle teadmise ja restriktsioonijärgsete produktide pikkuse hindamise abil saime tuvastada õiged konstruktid ning saata need täiendavale kontrollimisele.

Kontrollrestriktsioonil kasutatud restriktaasid, puhvrid ja produktide oodatavad suurused leiad **Tabelist 3.**

A)



B)



C)

Joonis 6. Kontrollrestriktsiooni tulemused

Erinevad kontrollrestriktsioonide tulemused on toodud joonistel A, B ja C. Tähistused joonistel on järgmised: - raja taga tähendab, et tegemist on lõikamata konstruktiga, + märgistab lõigatud konstrukte. Nt rajale A1.1- vastab lõikamata GINS2 esimene kloon ja A1.1+ vastab lõigatud GINS2 esimene kloon. Joonistel on: A) A1.1- - A1.4+ - GINS2, A2.1- - A2.4+ - GINS3, A3.1- - A3.6+ - MCM7, A4.1- - A4.4+ - CDC45L; B) B1.1- - B1.6+ - GINS1, B2.1- - 2.6+ - GINS4, B3.1- - B3.6+ - MCM4; C) C1.1- - C1.6+ - MCM5.

Analüüsidest kontrollrestriktsiooni tulemusi leidsime, et potentsiaalselt õiged konstruktid asuvad GINS2 puhul radadel A1.2 - A1.4, GINS3 ja MCM7 puhul osutusid õigeks kõik kloonid, välja arvatud A3.1 ning CDC45L puhul rajad A4.1 ja A4.2. Vaadates joonist B näeme, et GINS1 ja GINS4 puhul osutus kummalgi juhul valeks üks kloon, mis asub vastavalt radadel B1.6 ja B2.4, MCM4 puhul osutusid õigeks B3.1, B3.2, B3.5 ja B3.6. MCM5 puhul leidis igas kloonis potentsiaalselt õiget konstrukti sisaldavat plasmiid. Pärast restriktsioonikontrolli valiti iga konstrukti puhul potentsiaalselt õigete kloonide vahelt välja üks, mis saadeti sekveneerimisele, et veenduda nende õigsuses ja kontrollida, et nende

konstrueerimise käigus ei ole tekkinud DNA ahelatesse ebasoovitavaid mutatsioone. Sekveneerimisele saadeti proovid: MCM4- B3.2, MCM5- C3.3, MCM7- A3.2, GINS1- B1.1, GINS2- A1.4, GINS3- A2.3, GINS4- B2.3 ja CDC45L- A4.1. Plasmiidsest DNA-st sekveneeriti meie poolt sisestatud fragmendi täielik piirkond ning sekveneerimistulemuste võrdlusel NCBI andmebaasis toodud referentsjärjestuste vastu selgus, et kõik konstruktid omasid metsiktüüpi järjestust. Seega oli kloneerimine õnnestunud ning antud konstrukte saab edaspidi kasutada rekombinantsete viirusvektorite valmistamiseks ja töö jätkamiseks kompleksse CMG helikaasi puhastamisel.

2.3.2 Inimese MCM3 ja MCM4 subühikute ekspresseerimine bakteris

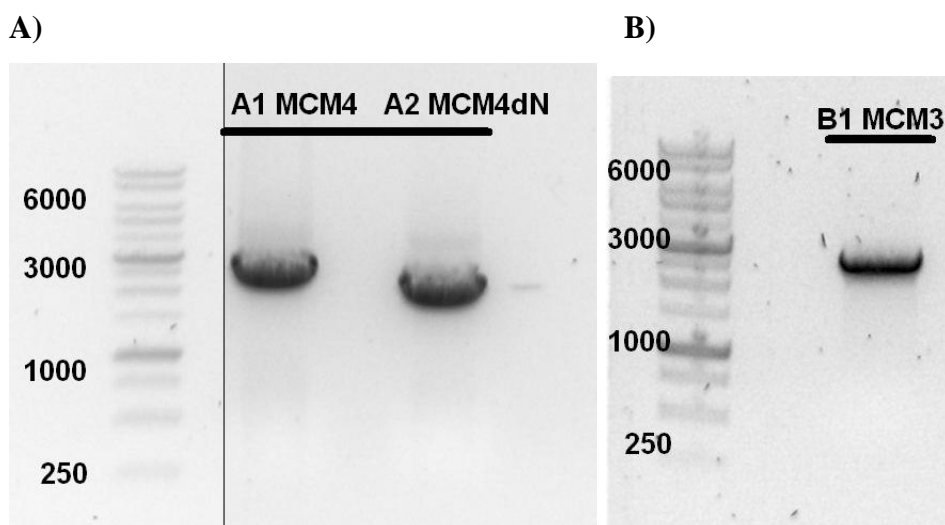
2.3.2.1 Põhjused bakteriekspresioonikonstruktide valikuks

Töö teiseks eesmärgiks oli osade inimese CMG subühikute individuaalse puhastamise jaoks vajaminevate bakteriekspresioonikonstruktide konstrueerimine ning nende esialgne analüüs. Puhastatud subühikute valke on plaanis kasutada erinevate reguleerivate proteiinkinaaside märklaudaminohapete kaardistamiseks CMG kompleksis. Bakteri ekspresioonisüsteemi eelistamiseks on mitu põhjust. Esiteks on bakteri süsteemi kasutamisel kordades suurem saagis võrreldes bakuloviiruse süsteemiga. See annab meile piisavalt substraati reguleerivate kinaaside efektorsaitide kaardistamiseks. Teine bakteri süsteemi eelis on see, et bakterites ei toimu valkude post-translatsioonilist modifitseerimist samade proteiinkinaaside poolt kui eukariootides ning fosfositide kaardistamisel mass-spektromeetria meetoditega võime olla kindlad, et valgu küljest avastatud fosfaatjäägid pärinevad meie poolt eelnevalt läbi viidud reguleerivate kinaasidega töötlustest.

Käesoleva töö käigus sai esimesteks kloneeritavateks konstruktideks valitud MCM3, MCM4 ja N terminaalne deletsiooniga MCM 4, millest puudub esimest 152 aminohapet kodeeriv lõik (MCM4dN152). Valik tehti olemasolevate teadmiste järgi MCM2-7 subühikute fosforüülimisest, mille põhjal on alust arvata, et meie huvipakkuvate reguleerivate kinaaside fosforüülimispiirkonnad võiksid paikneda MCM heksameeri subühikutes 3 ja 4 (Ilves *et al.*, 2012). Samuti on teada, et MCM4 fosforüülitakse just selle N-terminaalsest piirkonnast, seetõttu sai loodud ka kloon, millelt see piirkond on deleteeritud (Shi *et al.*, 2007); (Ishimi & Komamura-Kohno 2001).

2.3.2.2 Inimese MCM3, MCM4 ja MCM4dN152 cDNAde amplifitseerimine PCR-i abil

Esimeseks etapiks MCM3, MCM4 ja MCM4dN152 konstruktide loomisel oli amplifitseerida vastavaid fragmente PCR abil. PCR käigus kasutati sama programmi, mida olime kasutanud ka eelnevate bakuloviiruskonstruktide loomisel, kuid seekord kasutati teisi, bakteriaalse ekspresioonivektori multikloneerimissaidiga sobivaid primereid. Ajaks, mil hakati konstrueerima bakteriaalseid ekspresioonivektoreid, oli saanud uus ja töötav MCM3 cDNA kloon. Vt kasutatud programmi lk 17 ja primereid Tabel 2 lk 20. PCR-i tulemused leiad Jooniselt 7.



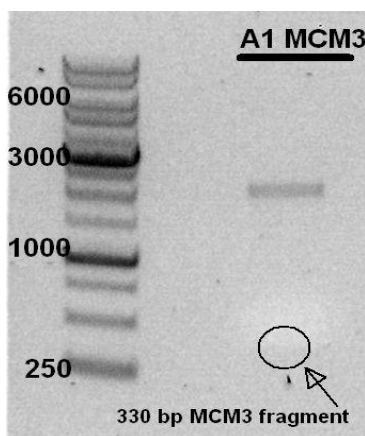
Joonis 7. PCR-i tulemused

PCR-i tulemusel said edukalt amplifitseeritud kõik huvipakkuvad fragmendid. Joonisel A) A1-MCM4 (2.6kB) A2- MCM4dN (2.1kB) ja B) B1- MCM3 (2.4kB)

2.3.2.3 Inimese MCM3, MCM4 ja MCM4dN152 cDNAde PCR-i fragmentide restrikteerimine ja ligeerimine pET28-His-Trx-Tev ekspresioonivektorisse

MCM3 ja MCM4 PCR fragmendid kloneeriti pET28-His-Trx-Tev vektorisse, mis on konstrueeritud Aleksei Lulla poolt. Pärast PCR-i restrikteeriti saadudprodukte Tabelis 4 toodud ensüümidega. pET28-His-Trx-Tev vektori kloneerimispiirkond (*multi cloning site*) on disainitud niimoodi, et kohe His-tioredoksiin-TEV piirkonna järele on lisatud Eco31I sait. See restriiktaas lõikab oma äratundmissaidist väljaspool, mis võimaldas sobivalt PCR primereid disainides kloneerida soovitud cDNA inserdid täpselt õigesse lugemisraami ilma et TEV saidi ja soovitud valku kodeeriva järjestuse vahele tekiks lisaaminohappeid. Selleks lisati kõigile 5'-otsa primeritele järjestused restriiktaasidele, mis lõikavad samuti väljaspool oma äratundmissaiti ja tekitavad lõigatud vektoriga sobivad kokkukleepuvad otsad. 3' – otsa

praimerite otstesse disainiti saidid restriktasidale, mis lõikaksid ka vektori kloneerimispiirkonda ja millel poleks PCR fragmendi sees lisalõikesaite (**PCR praimerid Tabel 2**). MCM3 puhul ei olnud võimalik valida sobivalt 5' – otsa lõikavat ensüümi, millel puuduks äratundmissait PCR fragmendi sees. Valiti Esp3I sait, mis lõikab korra ka MCM3 seest ja annab lõigates 2100bp pikkuse suure fragmendi ja väikese 337bp pikkune fragmendi (**Joonisel 8** on väiksem fragment halvasti nähtav ja seetütu tähistatud noolega). Restriksioonil saadud MCM3 fragmendid, samuti MCM3 ja MCM4 konstruktide kloneerimiseks vajalikud vektorifragmendid kanti agarosgeelile ja puhastati pärast elektroforeesi geelist. Restrikteeritud MCM4 fragmendid puhastati otse restriksioonisegust



Joonis 8. MCM3 restriksiooniproduktid

Pildil on noolega tähistatud MCM3 restrikteerimise tulemusena tekkinud väike 330bp pikkune fragment.

MCM4 ja MCM4dN152 restriksioonil ja ligatsioonil kasutati sama taktikat nagu bakuloviiruskonstruktide loomise puhul. Erisuguseid kleepuvaid otsi tekitavate restriktasidale lõigati nii vektori kui ka fragmendi ning see tagas, et ligeerumisel satuvad vektor ja fragment omavahel kokku õiges orientatsioonis. Samuti raskendas see ka vektoripõhimikul endaga ligeerumist.

MCM3 konstrukti puhul on seevastu vektori lõigatud ühtede ensüümidega ja MCM3 fragmendi teistega. Kuna MCM3 restrikteerimisel kasutatud ensüüm Esp3I lõikas fragmendi nii 5' otsast kui korra ka sisemusest, tekkis protsessil 2 produkti. Ligatsioonil liideti seega MCM3 väike fragment, suur fragment ja avatud pET28His-Trx-Tev vektor. Vektorisse said mõlemad MCM3 fragmendid ligeeruda õiges orientatsioonis seetõttu, et enda äratundmissaidist väljaspoolt lõikav Esp3I tekitab inserdi 5' otsast ja inserdi seest lõigates erinevaid kleepuvaid otsi.. Ligatsiooni tulemusel saadi 3 konstrukti: pET28-His-Trx-Tev-hMCM4, pET28-His-Trx-Tev-hMCM4dN ja pET28-His-Trx-Tev-MCM

Tabel 4.

Tabelis on toodud PCR fragmentide restriksioonil kasutatud ensüümid, puhvrid ning produktide oodatavad pikkused. Rasvases kirjas on märgitud vektorite fragmendid, mida kasutati kloneerimisel. Puhvrite valikul lähtuti parimate tulemuste saavutamiseks tootjapoolsetest soovitudest.

Konstrukt	Restriktaasid	Produktide oodatavad pikkused	Puhver
hMCM4	Eco31I ja XhoI	2592bp	Green
hMCM4dn152	Eco31I ja XhoI	2139bp	Green
hMCM3	Esp3I ja HindIII	2100bp ja 337bp	Yellow
a) pET28-HTT (MCM4 ja MCM4dn152)	Eco31I ja XhoI	5645bp ja 156bp	Yellow
b) pET28-HTT (MCM3)	Eco31I ja HindIII	58671bp ja 130bp	Yellow

2.3.2.4 pET28-His-Trx-Tev ekspressioonivektorite ligatsioonisegude transformatsioon DH5 α rakkudesse ja saadud vektorikloonide kontrollrestriksioon

Sarnaselt bakulokonstrukti kontrollimisele valiti ka seekord transformatsiooni- ja kontrolltassi kasvutiheduse võrdlusel välja igalt tassilt 6 kolooniat, mida kasvatati edasi LB vedelsöötmes. Pärast rakkude lüüsimist ja plasmidse DNA puhastamist viidi läbi kontrollrestriksioon saadud konstrukti esmaseks kontrolliks.

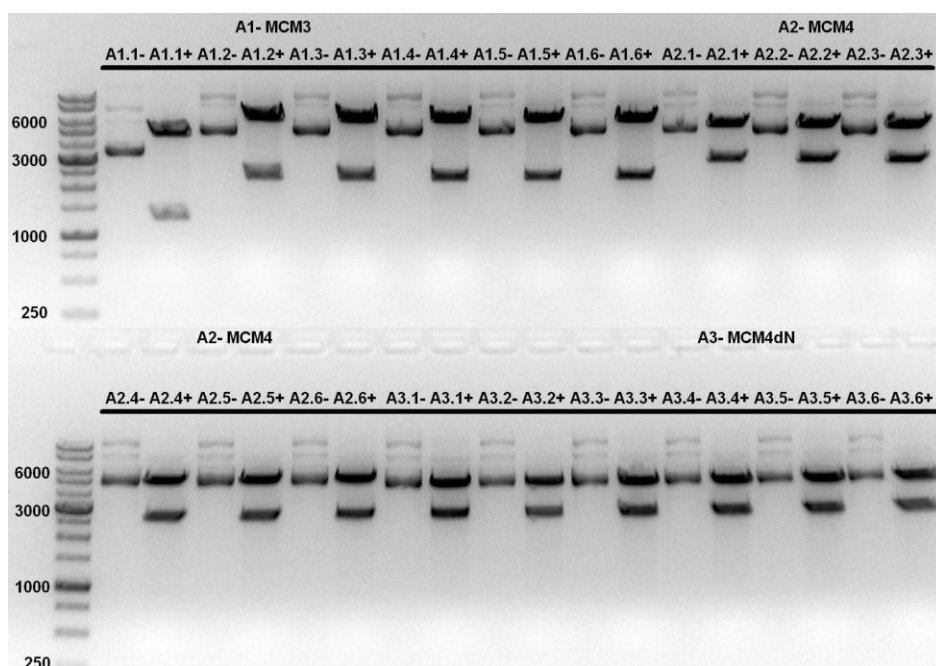
Võrreldes kloneerimisel kasutatud restriksiooniga kasutati kontrollrestriksioonil erinevaid restriksioone. Restriksioonid said valitud nii, et nad sooritaksid ühe lõikuse meie poolt sisestatud fragmendis ja teise pET28-His-Trx-Tev vektori alguses osas. Selle abil sai veenduda, et rakkudesse transformeeritud plasmid sisaldab ka huvipakkuvat fragmenti. Kasutatud ensüümid, puhvrid ja produktide oodatavad pikkused on toodud **Tabelis 5 lk 30**.

Tabel 5

Kontrollrestriksioonil kasutatud ensüümid, produktide oodatavad pikkused ja puhver, milles reaktsioon läbi viidi. Kuna kasutati FastDigest ensüüme teostati lõikused ka FastDigest puhvril.

Konstrukt	Restriktaasid	Produktide oodatavad pikkused	Puhver
pET28HTT-MCM3	FastDigest SmaI ja BamHI	2207bp ja 5885bp	FastDigest
pET28HTT-MCM4	FastDigest SmaI	2884bp ja 5358bp	FastDigest
pET28HTT-MCM4dn152	FastDigest SmaI	2884bp ja 4905bp	FastDigest

Kontrollrestriktsiooni tulemusi analüüsid järeldusele, et kõik katsete varasemad etapid on kulgenud edukalt, sest nii MCM4 kui ka MCM4dN152 puhul võivad potentsiaalselt õiget inserti sisaldada kõik valitud plasmidikloonid. Samuti olid positiivsed tulemused MCM3 puhul, kus vaid rajal A1.1 asuv konstruktsioon osutus valeks. Iga kloonitava elemendi potentsiaalselt õigete kloonide vahelt valiti välja üks, mis saadeti lisakontrolliks sekveneerimisele. Sekveneerimisele saadeti proovid: MCM3- A1.4, MCM4- A2.3 ja MCM4dN152- A3.1. Plasmiidsest DNA-st sekveneeriti täielikult meie poolt sisestatud fragmendi piirkond ning sekveneerimistulemuste võrdlusele NCBI andmebaasis toodud referentsjärjestuste vastu selgus, et kõik konstruktsioonid omasid metsiktüüpi järjestust. See tähendab, et olime katsetes edukad ja saavutasime soovitud tulemuse ning antud konstruktsioone saab edaspidi transformeerida bakteri rakkudesse, kus nendelt hakatakse ekspresseerima valku, mida pärast puhastamist on võimalik kasutada reguleerivate kinaaside fosforüülimissaitide kaardistamiseks.



Joonis 9 Kontrollrestriktsiooni tulemused

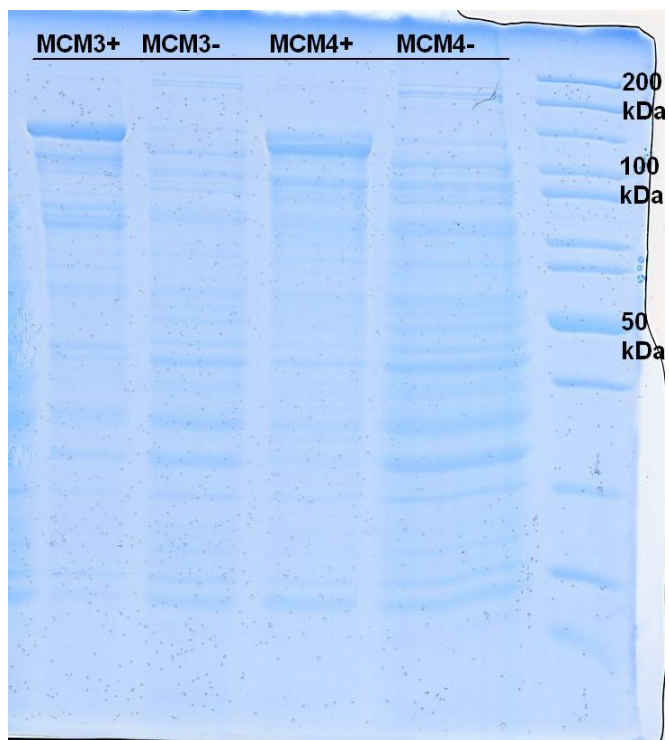
Tähistused joonistel on järgmised: - raja taga tähendab, et tegemist on lõikamata konstruktiga, + märgistab lõigatud konstrukte. Nt rajale A1.1- vastab lõikamata MCM3 esimene kloon ja A1.1+ vastab lõigatud MCM3 esimene kloon. Joonisel on: A1.1- - A1.6+ - MCM3, A2.1- - A2.6+ - MCM4, A3.1- - A3.6+ - MCM3dN152

2.3.2.5 pET28His-Trx-Tev ekspressioonivektorite transformatsioon *E.coli* BL21 rakkudesse ja esmane ekspressiooni kontroll

Pärast seda, kui olime sekveneerimistulemuste põhjal veendunud kloneeritud konstruktide õigsuses, transformeerisime nad valguekspressiooniks sobiva *E.coli* BL21 tüve rakkudesse.. Pärast seda, kui kolooniad olid kasvades saavutanud optilise tiheduse 0.8 (spektrofotomeeter kalibreeritud bakterivaba söötme vastu, mõõdetud spektrofotomeetril Ultrospec™ 7000, GE Healthcare Life Sciences), indutseeriti valgu ekspressioon meie poolt sisse viidud plasmiidilt kasutades IPTG-d. Laktoosivabas keskkonnas kasvavatel rakkudel on *lac* operon vaigistatud. Kui lisada kasvukeskkonda IPTG-d, siis ta mimikreerib oma kujult allolaktoosi, mis on laktoosi metaboliit ning seeläbi aktiveerib *lac* operoni, misjärel saab alata transkriptsioon sealsetelt geenidelt. Ka meie poolt sisestatud fragment sai paigutatud *lac* operoni kontrolli alla. Järelikult ei saa meid huvitav valk ekspresseeruda enne, kui kasvavad rakud on indutseeritud IPTG-ga.

Jooniselt 10 on selgelt näha, et IPTG-ga indutseeritud rakkude puhul on ilmunud radadele lisabänd, mis on märksa tugevam kui teised bändid. Indutseerimata proovidel sellist nähtust ei esine. MCM3 ja 4 ennustatavad suurused geelis on 92.1kDa ja 96.6 kDa. Sellele lisandub His-Trx-Tev *tag* mis annab juurde ca 13.5kDa. Kui vaadata geeli, siis on näha, et mõlemad bändid jooksevad 120kDa ja 100 kDa markerjoone vahel, mis lubab eeldada, et tegu on õigete valkudega, sest ennustuslikud suurused ja reaalsed suurused geelil ühtivad omavahel.

Ekspressioonikontrolli läbi viies veendusime, et meie poolt valmistatud konstruktid tõepoolest töötavad ning nendelt on võimalik ekspresseerida uuritavat valku. Tulevikus on nende konstruktide abil võimalik puhastada CMG helikaasi üksikuid *subühikuid* ning kaardistada neis paiknevad fosforüülimissaidid.



Joonis 10. Ekspressioonikontrolli tulemused

Joonisel vastab + märgitud rada IPTG-ga indutseeritud proovile ja – märgitud rada indutseerimata proovile. Produktide ennustusulikud suurused: MCM3- 92.1kDa ja MCM4- 96.6kDa.

KOKKUVÕTE

DNA replikatsiooni eukarüootides kontrollivad rakutsükli kontrollkinaasid ja teised regulaatorfaktorid, mis koordineerivad replikatsiooni initsiatsiooniks ja elongatsiooniks kriitilisi etappe. Oluline osa eukarüoodi genoomi replikatsiooni kontrollist toimub replikatīvse CMG helikaasi kokkupanemise, aktiveerimise ja aktiivsuse mõjutamise kaudu. Neid protsesse kontrollitakse ka vastusena DNA kahjustustele - replikatsioon saab jätkuda siis, kui kõik kahjustused on kõrvaldatud ja DNA on läbinud rakutsükli *checkpoint* mehhanismide „kvaliteedikontrolli“. On leitud, et erinevad rakulised kontrollkinaasid fosforüleerivad ka otseselt CMG helikaasi subühikuid, kuid nende fosforüleerimiste täpse efekti kohta on vähe teada.

Antud töö eesmärk oli konstrueerida kahte tüüpi ekspresioonivektoreid, mille abil oleks hiljem võimalik puhastada nii üksikuid CMG helikaasi *subühikuid* (bakteriaalsed ekspresioonivektorid) kui funktsionaalset helikaasi tervikkompleksi bakuloviiruskonstruktid). Töö tulemuseks oli 8 pFastBac1 doonorvektorit bakuloviiruste konstrueerimiseks ja 3 bakteriaalset pET28-His-Trx-Tev ekspresioonivektorit, mis sisaldavad inimese CMG kompleksi subühikute cDNAsid. Bakteriaalsetele ekspresioonivektoritele viidi läbi ka esmane ekspresioonikontroll, mille tulemustest järeldus, et olime edukalt kloneerinud töötavad rekombinantseid ekspresioonivektoreid. Saadud rekombinantseid vektoreid kasutatakse edaspidi valkude puhastamiseks, et määrata fosforüülimissaidid CMG kompleksis ning nende mõju CMG helikaasi talitlemisele.

Construction of recombinant vectors expressing the subunits of human replicative CMG helicase

Kristjan Madisoo

SUMMARY

Before a cell divides, it must make a complete copy of its genetic information. This process is called DNA replication and it forms the basis for biological inheritance both in prokaryotes and eukaryotes. In eukaryotes, DNA replication is initiated at multiple chromosomal elements called replication origins. These sequences direct the ordered assembly of multiprotein complexes that eventually form two replication forks at each origin.

Eukaryotic replication initiation is divided into two distinct steps: origin licensing and activation. Replication origins are activated at characteristic times. On average, some origins fire earlier (early-firing origins) and others later (late-firing origins) in the S phase of the cell cycle. Furthermore, origins range in efficiency from those that are active in almost every cell cycle to those that are used in only a small proportion of cell cycles

DNA replication in eukaryotes is controlled by cell cycle control kinases and other regulatory factors, which coordinate the steps critical for the initiation and elongation of the replication process. Important part of this coordination involves the regulation of replicative helicase complex (CMG). It is known that various regulatory protein kinases can phosphorylate CMG subunits, but the effect of these modifications on the functioning of the replicative helicase complex is not clear.

The aim of this study was to create two types of recombinant vectors that can be used to express and purify single subunits of the CMG helicase (bacterial expression vectors) or the whole functional helicase complex (baculovirus vectors). I created 8 pFastBac1 donor vectors for baculovirus construction and 3 pET28-His-Trx-Tev vectors for bacterial expression of human CMG subunits. These constructs will be later used in order to purify proteins that can be used as a substrate for mapping of the phosphorylation sites by mass-spectrometry methods and for identification of the effects of these modifications on the functioning of CMG helicase. This will give us a chance to study how different important phosphorylation events affect the steps important for the control of genome replication in eukaryotes.

KIRJANDUSE LOETELU

Aggarwal, B.D., and Calvi, B.R. (2004). Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells. *Nature*, 430: 372–376.

Barberis, M., Spiesser, T. W., & Klipp, E. (2010). Replication origins and timing of temporal replication in budding yeast: how to solve the conundrum? *Current Genomics*, 11, 199-211.

Bell, S. P., & Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 333-74.

Blow, J. J., & Dutta, A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 6, 476-486.

Boos, D., Frigola, J. and Diffley, J. FX. (2012). Activation of the replicative DNA helicase: breaking up is hard to do. *Current Opinion in Cell Biology* 24, 423-430.

Boskovic, J., Coloma, J., Aparicio, T., Zhou, M., Robinson, C.V., Mendez, J., and Montoya, G. (2007). Molecular architecture of the human GINS complex. *EMBO Rep.* 8, 678–684.

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. Based on electron microscopy, this paper describes the structures of the *Drosophila* Mcm2-7 and CMG complexes.

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.

Davey, M.J., Indiani, C., and O'Donnell, M. (2003). Reconstitution of the Mcm2-7p heterohexamer, subunit arrangement, and ATP site architecture. *J. Biol. Chem.* 278, 4491–4499.

Diffley, J.F. (2011). The many faces of redundancy in DNA replication. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75, 135–142.

Dijkwel, P.A., and Hamlin, J.L. (1995). The Chinese hamster dihydrofolate reductase origin consists of multiple potential nascent-strand start sites. *Mol Cell Biol*, 15: 3023–3031.

Enemark, E.J., and Joshua-Tor, L. (2008). On helicases and other motor proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol* 18, 243–257.

Forsburg, S.L. (2004). Eukaryotic MCM proteins: Beyond replication initiation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 109–131.

Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J. J., & Botchan, M. R. (2010). Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Molecular Cell*, 37, 247-58.

Ilves, I., Tamberg, N. and Botchan, M. R. (2012). Checkpoint kinase 2 (Chk2) inhibits the activity of the Cdc45/MCM2-7/GINS (CMG) replicative helicase complex. *Mol. Cell* 33, 13163-13170

Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y. (2001). Phosphorylation of Mcm4 at specific sites by cyclin-dependent kinase leads to loss of Mcm4,6,7 helicase activity. *J Biol Chem.* 14;276(37):34428-33.

Jones, R. M., and Petermann, E. (2012). REVIEW ARTICLE Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochem J* 443, 13-26.

Kang, Y.H., Galal, W.C., Farina, A., Tappin, I., Hurwitz, J. (2012). Properties of the human Cdc45/Mcm2-7/GINS helicase complex and its action with DNA polymerase epsilon in rolling circle DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 17;109(16):6042-7.

Kohzaki, H., and Murakami, Y. (2005). Transcription factors and DNA replication origin selection. *Bioessays*, 27: 1107–1116.

Kong, D., Coleman, T.R., and DePamphilis, M.L. (2003). *Xenopus* origin recognition complex (ORC) initiates DNA replication preferentially at sequences targeted by *Schizosaccharomyces pombe* ORC. *EMBO J*, 22: 3441-3450.

Kornberg, A., and Baker, T. (1992). *DNA Replication* (New York: W.H. Freeman and Co)

Labib, K., and Gambus, A. (2007). A key role for the GINS complex at DNA replication forks. *Trends Cell Biol.* 17, 271–278.

Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., & Oda, M. (2010). Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annual Review of Biochemistry*, 79, 89-130.

McGarry, T.J., Kirschner, M.W. (1998). Geminin, an Inhibitor of DNA Replication, Is Degraded during Mitosis *Cell* 93:1043–53.

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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:10236-10241.

Nguyen, V.Q., Co, C., and Li, J.J. (2001). Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature*, 411: 1068–1073.

Oyama, T., Ishino, S., Fujino, S., Ogino, H., Shirai, T., Mayanagi, K., Saito, M., Nagasawa, N., Ishino, Y., Morikawa, K. (2011). Architectures of archaeal GINS complexes, essential DNA replication initiation factors. *BMC Biol.* ;9:28. doi: 10.1186/1741-7007-9-28.

Randell, J.C., Bowers, J.L., Rodriguez, H.K., and Bell, S.P. (2006). Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2–7 helicase. *Mol Cell*, 21: 29–39.

- Schwacha, A., and Bell, S.P. (2001). Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication . *Mol Cell*, 8(5):1093-104.
- Shi, Y., Dodson, G.E., Mukhopadhyay, P.S., Shanware, N.P., Trinh, A.T., Tibbetts, R.S. (2007). Identification of carboxyl-terminal MCM3 phosphorylation sites using polyreactive phosphospecific antibodies. *J Biol Chem*. 23;282(12):9236-43.
- Sun, J., and Kong, D. (2010). DNA replication origins, ORC/DNA interaction, and assembly of pre-replication complex in eukaryotes. *Acta Biochim Biophys Sin*, 42: 433–439.
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2007). CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* 445, 328–332.
- Tye, B.K., Sawyer, S. (2000). The hexameric eukaryotic MCM helicase: building symmetry from non-identical parts. *J Biol Chem*. 10;275(45):34833-6.
- Vashee, S., Cvetic, C., Lu, W., Simancek, P., Kelly, T. J. and Walter, J. C. (2003). Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev*. 17, 1894–1908.
- 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*. 22;290(5500):2309-12.
- Zou, L., Stillman, B. (2000). Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7pDbf4p kinase. *Mol Cell Biol*, 20:3086-3096.

Kasutatud interneti leheküljed

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf

<http://www.molecularinfo.com/MTM/A/A3/A3-1.pdf>

TÄNUAVALDUSED

Tahaksin tänada oma suurepäraseid juhendajaid, Ivar Ilvest ja Sandra Koitu, kelle kvaliteetse nõu, jõu ja abita poleks see töö võimalikuks saanud. Aitäh Teile!

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristjan Madissoo, sündinud 16.06.1991,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Inimese replikatiivse CMG helikaasi *subühikuid* ekspresseerivate vektorite konstrueerimine“

mille juhendaja on PhD 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 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, 28.05.2013