

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

**Forkhead 1 transkriptsioonifaktori iseloomustamine DNA replikatsiooni
initsiatsioonil pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae***

Magistritöö
Lõputöö maht (40 EAP)

Kairi Koppel

Juhendajad
Prof. Arnold Kristjuhan, *PhD*
Allan Reinapae, *MSc*

TARTU 2017

Forkhead 1 transkriptsioonifaktori iseloomustamine DNA replikatsiooni initsiatsioonil pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae*

Käesoleva töö eesmärk oli uurida seitsme deletsioonimutandi põhjal, millised Forkhead 1 transkriptsioonifaktori järjestuse piirkonnad on olulised replitseerumise ajastuse tagamisel Fkh1 poolt reguleeritavatel replikatsiooni alguspunktidel. Genoomi stabiilsuse seisukohast on replikatsiooni õige ajalise kontrolli tagamine väga oluline ning seega on vaja mõista mehhanisme, mis selle tagavad ning faktoreid, mis seda mõjutavad. Töö tulemustest selgus, et 484 aminohappe pikkusest Fkh1 kodeerivast alast pole replikatsiooni reguleerimiseks vajalikud vaid esimesed 22 aminohapet. Aminohapete 23 kuni 484 deleteerimine pärssis varajaste replikatsiooni alguspunktide aktiveerumist. Sellega kooskõlas olid ka kromatiini immunosadestamise tulemused tüves, milles deleteeriti aminohapped 410–484. Antud järjestuse deleteerimise tagajärjel polnud Fkh1 ja Cdc45 seondumine replikatsiooni alguspunktidele enam täheldatav.

DNA replikatsioon, DNA replikatsiooni initsiatsioon, Forkhead transkriptsiooni-faktorid1/2. P320, nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees.

Characterization of Forkhead transcription factor 1 in DNA replication initiation in *Saccharomyces cerevisiae*

The aim of the current thesis was to investigate which parts of Fkh1 transcription factor are necessary for its ability to support early replication of origins controlled by it. Previously conducted studies show, that origins controlled by Fkh1 often coincide with early replicating loci, which by unknown mechanisms have an advantage in firing. Even more, deleting both Fkh1 and Fkh2 results in an extensive deregulation in replication timing on origins controlled by Fkh1 and Fkh2 transcription factors. Genomic stability depends largely on correct replication timing. Therefore, understanding the mechanism behind it and its different levels of regulation is crucial for understanding the negative outcomes caused by genomic instability, for example cancer. Results presented here, show that Fkh1 coding sequence (484 amino acids) can tolerate only the loss of first 22 amino acids without causing any deregulation in observed origins activity. Further deletions strongly perturbed origin activation on Fkh1/2 controlled origins. These results are supported by chromatin immunoprecipitation analysis in strain, where amino acids 410-484 were deleted. Deletion of particular sequence abolished Fkh1 and Cdc45 ability to recruit onto replication origins.

DNA replication, DNA replication initiation, Forkhead transcription factors1/2. P320, nucleic acids, protein synthesis

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Rakutsükkel	7
1.2. CDK ja DDK kinaasid	7
1.3. Replikatsiooni alguspunktid ehk ARS-id	8
1.3.1. ARS konsensuselement – ACS	8
1.3.2. B sekundaarelemendid	9
1.4. Replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine	10
1.4.1. Pre-replikatsioonikompleks	10
1.4.1.1. ORC kompleks	11
1.4.1.2. Mcm 2–7	11
1.4.2. Pre-replikatsioonikompleksi aktiveerimine	12
1.4.2.1. DDK roll pre-replikatsioonikompleksi aktivatsioonis	12
1.4.2.2. CDK roll pre-replikatsioonikompleksi aktivatsioonis	12
1.5. Re-replikatsiooni vältimine	13
1.5.1. Replikatsioonipunktide aktiveerumise ajastus	14
1.5.1.1. Varajased ja hilised replikatsiooni alguspunktid	15
1.5.1.2. Teised replikatsiooni ajastusse panustavad faktorid	16
1.5.2. Replikatsiooni limiteerivad faktorid	18
1.6. Forkhead transkriptsioonifaktorid	19
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	24
2.1. Töö eesmärgid	24
2.2. Materjal ja meetodika	24
2.2.1. Kasutatud söötmed	24
2.2.2. Kasutatud pärmitüved	25
2.2.3. DNA eraldamine ja sadestamine	26
2.2.3.1. gDNA eraldamine pärmist LiOAc-SDS meetodil	26
2.2.3.2. DNA puhastamine fenool-kloroform meetodil	26
2.2.3.3. Etanoolsadestus	26
2.2.4. Pärm transformeerimine	27
2.2.5. Tüvede valmistamine	27
2.2.5.1. <i>Fkh1:Δ1–7+ fkh2:ΔC</i>	27
2.2.5.2. <i>Fkh1:Δ1–7+ fkh2Δ</i>	29
2.2.5.3. <i>Fkh1:Δ1–7+ Fkh2 anchor-away</i>	29
2.2.6. Rakkude ettevalmistamine ja ajapunktide kogumine replikatsiooni uurimiseks	30
2.2.6.1. Läbivoolutsütomeetria	30
2.2.6.2. Koopia arvu analüüs	31
2.2.7. Kromatiini immunosadestamine	31

2.2.7.1.	Pärmi rakulüsaadi valmistamine	31
2.2.7.2.	Immunopretsipitatsioon (IP)	32
2.2.8.	Kvantitatiivne PCR (qPCR)	32
2.2.9.	Anchor-away	33
2.3.	Tulemused ja arutelu	34
2.3.1.	Fkh2 deleteerimine Fkh1:Δ2–6 tüvedes põhjustab rakkude agregeerunud kasvu	35
2.3.2.	Fkh1 valgu aminohapped 410-484 on vajalikud Fkh1 poolse replikatsiooni regulatsiooni tagamiseks	36
2.3.3.	Fkh1:Δ7 ei suuda seonduda replikatsiooni alguspunktidega ja põhjustab replikatsiooni deregulatsiooni	38
2.3.4.	Fkh1 valgu aminohapped 410-484 on vajalikud Cdc45 värbamiseks	40
2.3.5.	<i>FKH1</i> esimesest 22-st aminohappest allavoolu järjestuste deleteerimine põhjustab häireid replikatsiooni toimumises	42
	KOKKUVÕTE	48
	SUMMARY	50
	KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	51
	LISAD	57
	TÄNUAVALDUSED	65
	LIHTLITSENTS	66

KASUTATUD LÜHENDID

AAA+ – *ATPases Associated with diverse cellular activities* (erinevate rakuliste protsessidega seotud ATP-aasid)

Abf1 – *ARS binding factor* (ARS-iga seonduv faktor)

ACS – *ARS consensus sequence* (autonoomselt replitseeruva kompleksi konsensusjärjestus)

APC/C – *Anaphase- promoting complex/cyclosome* (Anafaasi soodustav kompleks)

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

Cdc6 – *Cell Division Cycle 6*

Dbf4 – *DumbBell Forming 4*

Cdc45 – *Cell division cycle*

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

Cdt1 – *Chromatin licensing and DNA replication factor 1* (kromatiini litsentseerimise ja DNA replikatsioonifaktor 1)

CMG – Cdc45-MCM-GINS kompleks

CK I– *Cyclin dependent kinase inhibitors* (tsükliin sõltuvate kinaaside inhibiitor)

Clb2/5/6 – *B-type cyclins* (B-tüüpi tsükliinid)

DBD – *DNA binding domain* (DNA-d seondav domään)

DDK – *Dbf4-dependent kinase* (Dfb4-sõltuv kinaas)

Dpb11 – *DNA Polymerase B (II)* (DNA polümeraas B (II))

DUE – *Double strand DNA unwinding element* (kaksikahela lahti keeramise element)

FHA – *Forkhead associated domain* (Forkheadiga seondumise domään)

Fhl1 – *Forkhead-like 1* (Forkheadi sarnane 1)

Fkh1/2 – *Forkhead homolog 1/2* (Forkhead homoloog 1/2)

FOX – *Forkhead box proteins* (Forkhead perekonna valgud)

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

Hcm1 – *High copy supressor of calmodulin* (kõrge koopia-arvuline kalmoduliini supressor)

HU – hüdroksüurea

MCM2 – 7 - *Minichromosome maintenance 2 – 7* (minikromosoomi hooldaja 2-7)

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

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

SCF – *Skp1, Cullins, F-box proteins* (Skp1, Cullini, F valgud)

Sld2/3/5/7 – *Synthetically Lethal with Dpb11-1/2/3/5/7* (süntetiliselt letaalne koos Dpb11)

SISSEJUHATUS

Korrektne rakutsükli kulgemine on aluseks, et rakujagunemise käigus saavad mõlemad tütarrakud võrdse koopia genoomist. DNA replikatsioon, mis leiab aset S-faasis, on tugevalt konserveerunud alates prokarüootidest kuni kõrgemate eukarüootideni. Peamine erinevus seisneb replikatsiooni alguspunktide arvus, millelt replikatsiooni alustatakse. Tulenevalt suurest genoomist kasutavad kõrgemad eukarüootid kuni kümneid tuhandeid alguspunkte. See võimaldab rakul läbida S-faasi optimaalse ajaga, et kindlustada kogu genoomi duplitseerimine ühe rakutsükli jooksul. Väiksema genoomiga prokarüootid kasutavad vaid üht DNA replikatsiooni alguspunkti.

DNA replikatsioon algab järjestustelt, mida nimetatakse replikatsiooni alguspunktideks (ingl. *replication origin*). Pagaripärmis on need defineeritud kui autonoomselt replitseeruvad järjestused ehk ARS-id (*Autonomously Replicating Sequence*). Ettevalmistused genoomi replitseerumiseks algavad juba enne S-faasi, kui G2/M/G1-faasis hakkavad DNA-ga seonduma replikatsiooniks vajalikud valgud. Sel viisil märgistatakse ehk litsentseeritakse replikatsiooniks kõik potentsiaalsed replikatsiooni alguspunktid üle genoomi.

Paljud replikatsiooniks vajalikud valgud on ekspresseeritud limiteeritud hulgas. See tähendab, et kõiki litsentseeritud replikatsiooni alguspunkte ei ole võimalik üheaegselt aktiveerida ning erinevad alguspunktid peavad nende faktorite üle konkureerima. See, kuidas määratakse, millised alguspunktid saavad ligipääsu limiteerivatele faktoritele, on reguleeritud mitmeti – näiteks kromatiini modifikatsioonidega, alguspunktide paiknemisega tuumas või läbi teiste valkude, mis soodustavad replikatsiooni alguspunktide ligipääsu limiteerivatele faktoritele. Regulatsiooni tulemusena kujuneb välja replikatsiooni alguspunktide ajaline programm, kus alamhulk järjestusi replitseeritakse S-faasi alguses, samas kui teiste replitseerimine jääb hilisemasse S-faasi.

Aastal 2012 näidati, et olulist rolli replikatsiooni alguspunktide ajastusele omavad transkriptsioonifaktorid *Forkhead homologue 1/2* (Fkh1 ja Fkh2). Katsetega näidati, et mõlema valgu, peamiselt just Fkh1 puudumine mõjutas suure hulga replikatsiooni alguspunktide ajastust. Forkheadid1/2 on nii mõnegi uurimisrühma huviorbiidis ning vahepealsed aastad on toonud uusi teadmisi Fkh1/2 valgu seondumise ja funktsiooni kohta, kuid valkude töömehhanisme pole veel detailselt kirjeldatud.

Käesoleva töö teoreetilises osas antakse ülevaade DNA replikatsiooni initsiatsioonist ning erinevatest mehhanismidest, mis seda kontrollivad, sealhulgas Forkhead transkriptsioonifaktoritest. Samuti antakse detailne ülevaade töös kasutatud meetoditest. Eksperimentaalse osa eesmärk oli luua Fkh1 mutantsed pärmitüved, mille kasv ei oleks mutatsioonide tõttu pärsitud ning võimaldaksid seeläbi uurida erinevate Fkh1 valgu piirkondade olulisust DNA replikatsiooni regulatsioonis. Mudelorganismina kasutati pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*), kuna Fkh1 replikatsiooni rolli on iseloomustatud enim just selles eukarioidis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Rakutsükkel

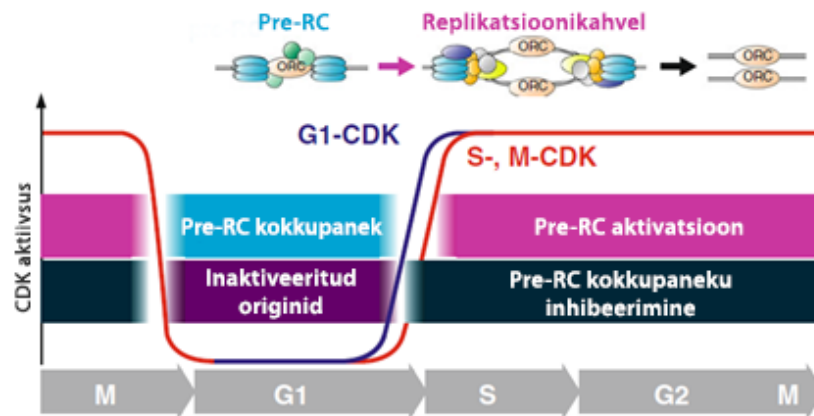
Rakutsükkel on jagatud nelja faasi – G1-faas, mille käigus toimub raku kasv ja valmistumine rakujagunemiseks; S-faas, mille käigus toimub DNA replikatsioon; G2-faas, kus rakk valmistub M-faasiks ja M-faas, kus toimub kromosoomide segregatsioon tütarakkudesse ja rakujagunemine. Pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) iseloomustab küllaltki pikk G2-faas ja lühike G1-faas (Diffley, 2004). Rakutsükli progresseerumise aluseks on tagasiside regulatsiooni süsteemid, võimaldades kahjustuste ilmnemisel peatada rakutsükli järgmisesse faasi sisenemine (Gollosi et al., 2017). Oluline on, et kromosoomide segregatsioon ei toimuks enne, kui DNA replikatsioon on lõpuni viidud. Selleks on segregatsioon ja replikatsioon üksteisest ajaliselt eraldatud, vastavalt M-faasi ja S-faasi (Murray ja Kirschner, 1989).

DNA replikatsiooni toimumiseks on vajalik täpselt reguleeritud replisoomide kokkupanek ja aktiveerimine, mis allub ajaliselt eraldatud litsentseerimisele ja aktiveerimisele. Komplekside kokkupanek algab juba G2-faasis, kus alamhulgale replikatsiooni alguspunktidele laetakse neid alguspunkte ära tundev kompleks ORC (*Origin recognition complex*). Järgnevalt laetakse G1-faasis kõikidele potentsiaalsetele alguspunktidele replikatiivne helikaas, mis jääb ootama aktiveerimist S-faasis (Remus ja Diffley, 2009). Mitmed replikatsioonil osalevad valgud on kasutatavad replikatsiooniks vaid kindlas rakutsükli faasis. G2- ja M-faasis transkribeeritakse geenid, mis osalevad replikatsiooni varajastel etappidel nii, et nende tase on kõrgeim G1-faasis, nagu näiteks Mcm2–7 (*Minichromosome maintenance*). Hilisemad geenid transkribeeritakse nii, et nende tase oleks kõrgeim S-faasis, DNA replikatsiooni ajal, nagu näiteks tsükliin-sõltuvad kinaasid CDK-d (*cyclin dependent kinases*). Need on mõned näited regulatsioonimehhanismidest, millega kindlustatakse replikatsiooni toimumine S-faasis (Enserink ja Kolodner, 2010).

1.2. CDK ja DDK kinaasid

Kinaaside mehhaaniline roll on enamasti sihtmärkvalkude fosforüleerimisega kutsuda neis esile konformatsiooniline muutus. CDK on oluline rakutsükli, DNA replikatsiooni initsiatsioonil ning re-replikatsiooni takistamisel. Pagaripärmi rakutsükli reguleerimiseks on kinaasidest vajalik ainult CDK1, kõrgemates eukarüootides lisaks ka CDK 2, 4 ja 6 osalus (Malumbres ja Barbacid, 2009). CDK-d aktiveeriva dimerisatsiooni partneri Clb5, Clb6 (*B-*

type cyclins) kontsentratsiooni tõustes G1/S-faasi üleminekul suureneb CDK katalüütiline aktiivsus (**joonis 1**). Kuna kinaas tohib aktiivne olla ainult väikeses ajavahemikus, on CDK aktiivsus inhibeeritud erinevate mehhanismidega. Näiteks on nende hulk reguleeritud tsükliinide kontsentratsiooni ja (Pines, 1994) tsükliinsõltuvate kinaaside inhibiitorite CKI-de (*Cyclin dependent kinase inhibitors*) poolt (Pavletich, 1999).



Joonis 1. CDK aktiivsus läbi rakutsükli. G1-faasis on CDK-d inaktiivsed ja replikatsiooni alguspunktide aktiveerimist ei toimu. G1-faasi lõpus hakkab aga CDK tase tõusma, ning S-faasis CDK-d aktiveeritakse, mis võimaldab alguspunktidele moodustunud pre-replikatiivse kompleksi aktiveerimist. Selle tulemusena moodustub 2 vastassuunda liikuvat replikatsioonikahvli (Tõlgitud Araki, 2010 järgi).

Sarnaselt CDK-le osaleb ka Dbf4 sõltuv kinaas DDK (*Dbf4-dependent kinase*) replikatsiooni initsiatsioonil. DDK on aktiivne ainult S-faasis, kuna Dbf4 (*DumbBell Forming 4*) on ekspresseeritud ainult hilises G1-faasis (Tanaka ja Araki, 2010). G1/S-faasi üleminekul stabiliseeritakse Dbf4 CDK1 poolt, mis inaktiveerib Dbf4-ja degradeeriva APC/C kompleksi (*Anaphase-promoting complex/cyclosome*) seda fosforüleerides (Jaspersen et al., 1999).

1.3. Replikatsiooni alguspunktid ehk ARS-id

1.3.1. ARS konsensuselement – ACS

DNA replikatsioon algab pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) kindlatelt järjestustelt, mida nimetatakse ARS-ideks ning defineeritakse kui lühikesi, 100-150 bp pikkuseid järjestusi. Need leiti kui järjestused, mis võimaldavad plasmiididel ja mini-kromosoomidel autonoomselt replitseeruda. Selleks inaktiveeriti selektiivsusmarkerit kandva plasmidi replikatsiooni tagav piirkond ning asendati erinevate pärmis genoomset päritolu DNA järjestustega. Transformeerides selle pärmis ja selekteerides vastava markeriga plasmidi

kandva pärmis, tehti kindlaks järjestus, mis suutis tagada plasmidi replitseerumise. (Chan ja Tye, 1980; Stinchcomb et al., 1979; Struhl et al., 1979)

ARS-id sisaldavad ARS konsensusjärjestust ACS (*ARS Consensus Sequence*) ehk A elementi, mis on 11 aluspaari pikkune DNA lõik (T/A)TTTAT(A/G)TTT(T/A) (Broach et al., 1983). Selle muteerimine viib ARS-i funktsiooni kadumisele, kuid mitte ilmtingimata, kuna ACS suudab taluda konsensusest ka mõnenukleotiidilisi erinevusi (Theis ja Newlon, 1997). Pagaripärmis leidub ACS motiive ~12 000, kuid ainult ~500 on neist aktiivsed replikatsiooni alguspunktid (Siow et al., 2012). Seega on A element hädavajalik replikatsiooni alguspunktide funktsioneerimiseks, kuid ei garanteeri replikatsiooni alustamist antud lookuselt. Replikatsiooni uurimine pagaripärmis on olnud tulemusrikas, kuna replikatsiooni alguspunktid on väga täpselt defineeritud (Stinchcomb et al., 1979).

1.3.2. B sekundaarelemendid

ARS sisaldab lisaks A elemendile veel mitmeid B sekundaarelemente – B1, B2 ja B3 (**joonis 2**), mille muteerimine vähendab replikatsiooni alguspunktide aktiivsust olulisel määral või inaktiveerib selle, kui muteerida kõiki kolme korraga (Lin ja Kowalski, 1997; Marahrens ja Stillman, 1992).

B1 element funktsioneerib sarnaselt A elemendiga seondades replikatsiooni alguspunkti äratundvat kompleksi ORC (Rao ja Stillman, 1995; Rowley et al., 1995). B2 element sisaldab endas kaheaahelalise DNA lahti sulatamise elementi DUE (*Double strand DNA unwinding element*), mis on eeskätt vajalik replikatsiooniks oluliste valkude seondumiseks. Näiteks soodustab see Mcm2-7 laadimist replikatsiooni alguspunktidele peale seda, kui järjestustele on toodud ORC (Wilmes ja Bell, 2002). B3 on 22 aluspaari pikkune lisaelement ning ARS1-l seondub sellega Abf1 (*Autonomously replicating sequence binding factor 1*) transkriptsioonifaktor, mis aitab hoida replikatsiooni alguspunktil nukleosoomide vaba ala (Lipford ja Bell, 2001; Marahrens ja Stillman, 1992).

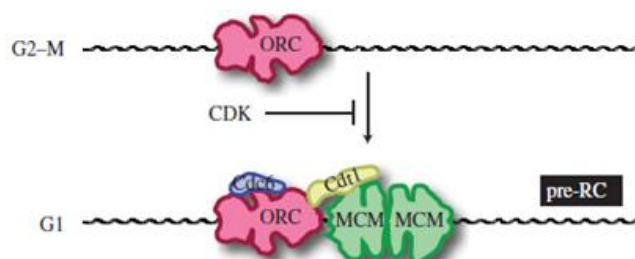


Joonis 2. Autonoomselt replitseeruv järjestus (ARS). ARS sisaldab endas ARS konsensusjärjestust ACS ehk A elementi, millega seondub replikatsiooni alguspunkti ära tundev kompleks ORC (*origin recognition complex*). Lisaks kuuluvad funktsionaalse ARS ehitusse ka B sekundaarelemendid - B1, mis osaleb lisaks A elemendile ORC sidumises, B2, millelt algab DNA lahti sulatamine ning B3 element, mis seob erinevaid ARS-i aktiivsust reguleerivad faktoreid.

1.4. Replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine

1.4.1. Pre-replikatsioonikompleks

DNA replikatsioon on mitmeastmeline protsess, mis algab potentsiaalsetele replikatsiooni alguspunktile pre-replikatsiooni kompleksi ehk pre-RC (*Pre-replication complex*) moodustumisega (**joonis 3**). Esmalt seondub hilises G2/M-faasis ACS A/T rikastele järjestustele ORC valgukompleks, mille peamiseks ülesandeks on märgistada genoomil kõik lookused, millelt on võimalik replikatsiooni alustada (Diffley et al., 1994). Järgnevalt seonduvad G1-faasis ORC kompleksiga Cdc6 (*Cell division cycle 6*), millega omakorda seondub Cdt1 (*Chromatin licensing and DNA replication factor 1*), mis toob endaga kaasa replikatiivse helikaasi MCM2-7 (Evrin et al., 2009). Sellega lõpeb replikatsiooni alguspunktide litsentseerimine ehk pre-replikatiivse kompleksi moodustamine ning litsentseeritud alguspunkt jääb ootama S-faasis replikatsiooni aktivatsiooni.



Joonis 3. Pre-replikatiivse kompleksi kokkupanek algab ORC kompleksi seondumisega potentsiaalsetele replikatsiooni alguspunktile. ORC kompleksiga seondub Cdc6, millega omakorda seondub Cdt1- MCM2-7 dimeer. Nendest valkudest moodustub replikatsiooni alguspunktile pre-replikatiivne kompleks. (Diffley, 2011)

1.4.1.1. ORC kompleks

ORC identifitseeriti kui kuuest subühikust (Orc1–6) koosnev kompleks, mis seondub ACS järjestusele. Viis esimest subühikut sisaldavad ATP-aasi domääni AAA+ (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*) ja vajavad oma tööks ATP olemasolu (Bell ja Stillman, 1992). Rakus moodustab ORC kuuest subühikust koosneva heteroheksameeri, mis seondub replikatsiooni alguspunktidega. DNA-ga seondumist vahendab peamiselt Orc1 (Klemm et al., 1997). Orc3 otseselt DNA-ga ei seonu, vaid pigem ühendab see teisi DNA-ga seonduvaid subühikuid (Clarey et al., 2006). Orc6 on ainuke subühik, mis ei sisalda AAA+ domääni ega seonu ka DNA-le. Selle ülesandeks on kompleksile Cdt1-MCM2–7 dimeeride värbamine. Peale ORC kompleksi seondumist ühinebki sellega järgnevalt Cdc6, mis toob replikatsiooni alguspunktile Cdt1-st ja Mcm2–7-st koosneva kompleksi. (Takara ja Bell, 2011)

1.4.1.2. Mcm 2–7

Replisoomi üks olulisemaid komponente on replikatiivne helikaas Mcm2–7, mis koosneb kuuest tugevalt konserveerunud subühikust, mille iga valgu C-terminuses asub ATPaasi domään. See omakorda sisaldab Mcm-spetsiifilist järjestust, mis osaleb juuksenõelastruktuuri moodustamisel ja arvatavasti interakteerub sünteesi ajal üheaheelalise DNA-ga. N-terminuse piirkonna saab aga jagada kolmeks osaks, mis osalevad subühikute ja heksameeride omavahelistes interaktsioonides. (Li et al., 2015)

Tõendid selle kohta, et Mcm2–7 on replikatiivne helikaas pärinevad katsetest, kus näidati, et Mcm2–7 liigub *in vivo* replisoomiga kaasa, viidates selle rollile nii initsiatsioonil kui elongatsioonil. Puhastatud Mcm2–7 valgud koos seda aktiveerivate faktoritega suudavad tagada replisoomi helikaasse aktiivsuse ka *in vitro* ning mutatsioonid selles kompleksis peatavad replikatsioonikahvli edasi liikumise (Aparicio et al., 1997; Bochman ja Schwacha, 2008; Labib et al., 2000). Replikatsiooni alguspunktidel sulgub Mcm2–7 heksameer ümber DNA, kindlustades selle, et heksameer ei dissotsieeruks DNA-lt ilma vastava signaalita, seejuures replikatsiooni alguspunktidel on N-terminuste kaudu seotud kaks heksameeri (Coster et al., 2014).

1.4.2. Pre-replikatsioonikompleksi aktiveerimine

G1-faasis replikatsiooni alguspunktile toodud Mcm2–7 komplekside aktiveerimine on replikatsiooni initsiatsiooni seisukohalt määrav hetk. Kui esialgu märgistati kõik potentsiaalsed replikatsiooni alguspunktid, siis S-faasi alguses aktiveeritakse neist vaid alamhulk. Replisoomi moodustamise üks olulisi vaheetappe pre-replikatsioonikompleksi kokkupaneku järel, on CMG (*Cdc45* – *Mcm2–7* – *GIN5*) kompleksi moodustumine G1/S-faasi üleminekul. CMG kompleksil on suurem helikaasne aktiivsus kui Mcm2–7 kompleksil eraldiseisvana ning see käitub kui DNA replikatiivne helikaas (Bochman ja Schwacha, 2008; Ilves et al., 2010). Selle moodustumiseks peavad replikatsiooni alguspunktile seonduma veel mitmed replikatsioonifaktorid, mille kohale toomine on reguleeritud peamiselt läbi kinaaside DDK ja CDK.

1.4.2.1. DDK roll pre-replikatsioonikompleksi aktivatsioonis

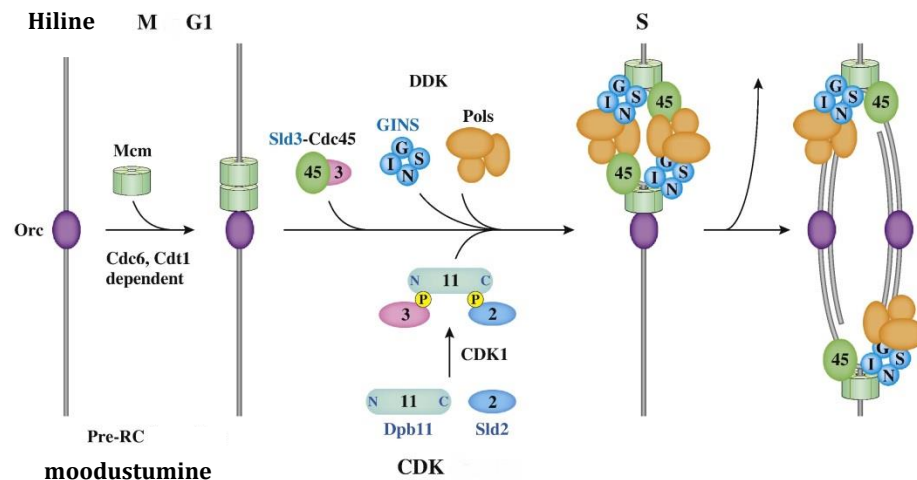
DDK üheks peamiseks ülesandeks replikatsiooni initsiatsioonis on mitmete Mcm2–7 subühikute fosforüleerimine. *In vitro* on näidatud subühikute 2, 3, 4, 6 ja 7 fosforüleerimist ning see soodustab Mcm2–7 kompleksi seondumist teiste replikatsioonis osalevate valkudega, näiteks Cdc45-ga (*cell division cycle*) (Masai et al., 2006; Sheu ja Stillman, 2010). Lisaks, kuna lahuses esineb MCM2–7 pooleldi avatud rõngakujulises konformatsioonis, on vaja indutseerida selles konformatsiooniline muutus, et võimaldada selle seondumist ümber kaheaheelalise DNA. Selleks fosforüleerib DDK Mcm2 subühiku, mille tulemusena nõrgenevad Mcm2 ja Mcm5 subühikute vahelised interaktsioonid ning ühtlasi eemaldatakse mahajääv DNA ahel heksameeri sisemusest. (Bruck ja Kaplan, 2015; Zhai et al., 2017)

Mcm2 fosforüleerimine on oluline CMG kompleksi moodustamise seisukohast, kuna üheaheelalise DNA (ssDNA) tekitamine soodustab GINS (*Go-Ichi-Ni-San*, jaapani keeles 5, 1, 2, 3) ja Mcm2–7 vahelise interaktsiooni teket. Mcm2–7-ga seotud Sld3 seondub tekkiva ssDNA-ga, vabastades sellega koha GINS-i seondumiseks. (Bruck ja Kaplan, 2015; Fu et al., 2011). Heksameer suletakse peale seda, kui Mcm3 ja Mcm5 subühikud fosforüleeritakse ja Ctd1 selle tulemusena kompleksist eemaldub (Ticau et al., 2017).

1.4.2.2. CDK roll pre-replikatsioonikompleksi aktivatsioonis

CDK fosforüleerib kaks replisoomi aktivatsiooniks vajaliku valku Sld2 (*Synthetic lethal with dpb11-2*) ja Sld3 (*Synthetic lethal with dpb11-3*). Kõigepealt fosforüleerib CDK pre-replikatsioonikompleksile seondunud Sld3, mis on kompleksis Cdc45 ja Sld7-ga. Fosforüleerimise tulemusena suureneb selle afiinsus Dpb11 (*DNA polymerase B 11*) ja Sld2

kompleksi suhtes, mis on omakorda seotud GINS kompleksi ja Pol ϵ -iga (*DNA polymeras epsilon*). Viimaste seondumisega lõpetatakse ka CMG helikaasi kokkupanek. Lisaks osaleb replisoomide aktivatsioonis ka Mcm10, mille funktsiooniks on stimuleerida DNA lahti harutamist, mis omakorda võimaldab polümeraasi seondumist. Kui polümeraas ϵ on pre-replikatsioonikompleksile toodud, moodustub kaks vastassuunda liikuvat replikatsioonikahvlit, millele järgneb DNA süntees (**joonis 4**). Kuna Sld2, Sld3 ja Dpb11 pole elongatsiooniks enam vajalikud, dissotsieeruvad nad kompleksist. (Muramatsu et al., 2010; Zegerman ja Diffley, 2007)



Joonis 4. Pre-replikatsioonikompleksi aktiveerumine. Moodustunud pre-replikatiivse kompleksi aktiveerimine algab Mcm2–7 subühikute fosforüleerimisega DDK poolt, mis võimaldab sellega järjestiku seonduda Sld3, Sld7 ja Cdc45-l. Kõigepealt seondub Sld3-Sld7, mis toob endaga kaasa Cdc45. Seejärel fosforüleerib CDK seondunud Sld3, mille tulemusena tõuseb selle afiinsus Sld2-Dpb11 kompleksi suhtes. Nendega koos seonduvad veel replisoomi komponendid GINS ja Pol ϵ . Selle tulemusena moodustub CMG (Cdc45/MCM2–7/GINS) kompleks, mis võimaldab DNA lahti keeramist, et DNA polümeraas saaks DNA-le seonduda. (Tõlgitud Araki, 2010 põhjal)

1.5. Re-replikatsiooni vältimine

Genoomi stabiilsuse seisukohast on oluline, et DNA replikatsiooni initsiatsioon toimuks ainult kord rakutsüklis. Kogu genoomi kõik lookused peavad S-faasis replitseeruma ning seda mitte vähem ega rohkem kui täpselt üks kord. Kõrvalekalded eeltoodust võivad viia genoomi ebastabiilsuse ja vähini (Göndör ja Ohlsson, 2009). Et seda ei juhtuks, on rakkudel välja kujunenud mitmeid kaitsemehhanisme.

Enamus nendest mehhanismidest toimivad samal eesmärgil – takistades pre-replikatiivsete komplekside kokkupanekut või nende aktiveerimist. Näiteks CDK-d suudavad fosforüleerida paljusid pre-RC komponente selleks, et takistada replikatsiooni alguspunktide litsentseerimist,

pärssides sellega re-replikatsiooni toimumist. CDK-d aktiveeritakse G1/S-faasi üleminekul ja sellepärast on S-faasis juba replitseeritud alguspunkti re-litsentseerimine pärsitud. CDK1 fosforüleerib ORC kompleksi ja Cdt1, mille tulemusel ei moodustu nendevahelist kompleksi. (Nguyen et al., 2001)

Cdt1 on oluline Mcm2–7 DNA-le laadimisel. Selle seondumise pärssimine katkestab replikatsiooni alguspunktide litsentseerimise ja edasine replikatsioonikompleksi kokkupanek on takistatud (Chen ja Bell, 2011). Kuni S-faasi sisenemiseni hoitakse Mcm2–7 kompleks inaktiivsesena. Vaba Mcm2–7 on rakus seotud Cdt1-ga ning Cdt1 puudumisel ei liigu Mcm2–7 G1-faasis tuuma (Tanaka ja Diffley, 2002). Mcm2–7 kompleks ja Cdt1 viiakse ka CDK1 vahendusel tuumast välja, vältimaks nende ligipääsu kromosomaalsele DNA-le (Nguyen et al., 2000).

Cdc6 on inhibeeritud kolmel erineval tasemel. Esiteks on Cdc6 transkriptsioon limiteeritud G1/S-faasi (Moll et al., 1991). Lisaks muudab CDK1 poolne Cdc6 fosforüleerimine selle SCF (*Skp1*, *Cullins*, *F-box proteins*) poolse degradeerimise sihtmärgiks (Drury et al., 2000) ning ühtlasi indutseerib selle seondumist Clb2-CDK1 kompleksiga, takistades seeläbi Cdc6 seondumist ORC kompleksiga ja sellepoolset replikatsiooni alguspunktide litsentseerimist (Mimura et al., 2004). Mitoosi lõpus degradeeritakse Clb2 (*Cyclin B*) APC/C poolt ning Cdc6 funktsioon taastub (Wäsch ja Cross, 2002). Seega on CDK-l oluline roll limiteerida replikatsiooni toimumine üks kord rakutsükli kohta. Ebakorrektne CDK1 regulatsioon võib põhjustada DNA replikatsiooni häireid ja genoomi ebastabiilsust.

1.5.1. Replikatsioonipunktide aktiveerumise ajastus

Tulenevalt eukarüootide suurest genoomist sõltub DNA vigadeta replitseerimine sadade kuni tuhandete replikatsiooni alguspunktide aktiveerimise täpsest koordineerimisest. Kuigi sündmuste jada, mis viib nende aktivatsioonini, on erinevate alguspunktide puhul sama, pannakse nende aktiveerumise aeg paika erinevate mehhanismidega. Korrekse regulatsiooni puudumist on eukarüootides seostatud mutatsioonide ja genoomi ebastabiilsusega, mis omakorda võib viia vähi tekkeni.

Kaks parameetrit, mida replikatsiooni alguspunktide kirjeldamiseks kasutatakse, on nende ajastus ja efektiivsus. Replikatsioonipunkti ajastus kirjeldab, millal alustatakse lookuselt replikatsiooni, kas varajases või hilises S-faasis, ning efektiivsus kirjeldab, kui sageli nendelt järjestustelt replikatsioon algab, ehk kui suure tõenäosusega antud replikatsiooni alguspunkt

käesolevas rakutsükli aktiveeritakse. Ajastus ja efektiivsus on omavahel seotud selliselt, et varajased või efektiivsemad alguspunktid replitseerivad sageli passiivselt ka nende läheduses asuvaid hiliseid või vähem efektiivseid alguspunkte ning nendelt algab replikatsioon ühtlasi suurema tõenäosusega. (Yamashita et al., 1997; Yang et al., 2010)

Eukarüootides on replikatsiooni alguspunkte ülehulgas, millest ühes rakutsükli on aktiivsed vaid mõnisada. Neid alguspunkte, millelt alustatakse replikatsiooni enamikes rakutsükklites, peetakse efektiivseteks, samas vaigistatud olekus hoitavad alguspunktid on vähemaktiivsed (Raghuraman et al., 2001). Mida suurem on genoom, seda suuremad on šansid, et mõni arvukatest replikatsioonikahvlitest seiskub, näiteks DNA katkete, tugevalt DNA-ga seondunud valkude või aktiivselt transkribeeritavate geenide tõttu (Azvolinsky et al., 2009; Tourrière ja Pasero, 2007). Kui replikatsioonikahvel peaks mingil põhjusel seiskuma, siis on võimalik DNA replikatsioon selles piirkonnas taastada, aktiveerides mõni läheduses asuv vähem efektiivne vaigistatud replikatsiooni alguspunkt (Ibarra et al., 2008).

1.5.1.1. Varajased ja hilised replikatsiooni alguspunktid

Erinevaid faktoreid, mis määravad replikatsiooni ajastuse on mitmeid. Esiteks ligipääsetavus valkudele, mis reguleerivad replikatsioonikahvli tööd, kromosoomikontekst, asukoht tuumas, epigeneetilised modifikatsioonid jpt. Leidub viiteid sellele, et replikatsiooni alguspunktide ajastus pannakse paika juba siis, kui ORC kompleks seondub DNA-le (Raghuraman et al., 1997). Näiteks on leitud, et replikatsiooni alguspunktid, mis seovad ORC kompleksi juba G2-faasis, on keskmiselt varasemad kui grupp alguspunkte, mis seovad ORC-i ainult G1-faasis (Belsky et al., 2015).

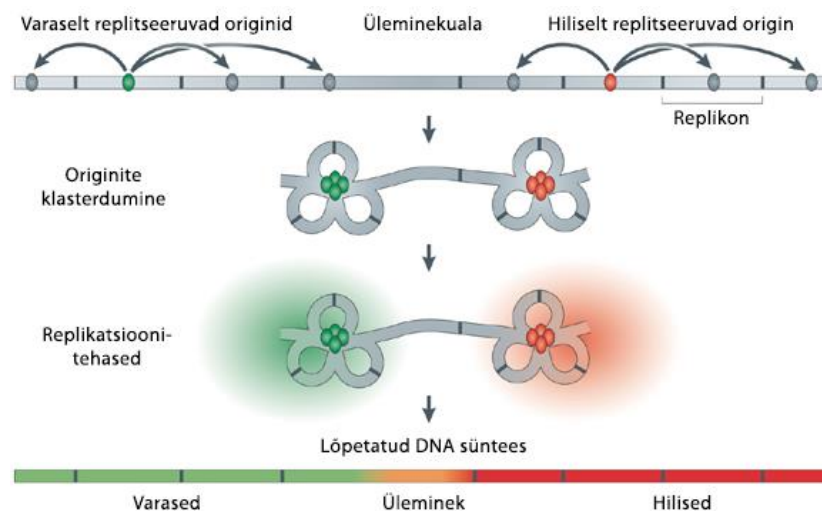
Üldiselt on varajastele replikatsiooni alguspunktidele iseloomulik paiknemine eukromatiinis ja tsentromeeride lähedal, lisaks on nad ka efektiivsemad kui hilised replikatsioonipunktid. Näiteks ARS605 ja ARS305, mis asuvad tsentromeeridele väga lähedal, on ühed esimesi alguspunkte, mis aktiveeritakse (Pohl et al., 2012). Hilised replikatsiooni alguspunktid paiknevad aga reeglina heterokromatiinis ja telomeeride ümbruses. Kui võrreldi subtelomeerset ARS501 teise tsentromeeri läheduses asuva replikatsioonipunktiga ARS1, nähti, et telomeerses piirkonnas asuv järjestus replitseerus hiljem. Mõlemal juhul on tegu efektiivse ARS-iga ja mõlemad on kompetentsed, alustamaks DNA replikatsiooni (Ferguson ja Fangman, 1992). Samas meie töögrupis on varasemalt näidatud, et leidub ka replikatsiooni alguspunkte, mis säilitavad uues lookuses oma algupärase ajastuse – ARS607 jääb varajaseks, kui see tõsta hilise ARS609 asemele (Lööke et al., 2013). Identifitseeritud on ka hiliseid

replikatsiooni alguspunkte, mis ei asu telomeeride läheduses. Tõstes need järjestused plasmidi, muutuvad varajaseks tänu plasmidis esinevale tsentromeerile. Samas, tõstes nad koos ümbritsevate järjestustega, säilitasid nad oma hilise replikatsiooni (Friedman et al., 1996). Need tulemused viitavad sellele, et kromatiini kontekst on oluline tegur, mis määrab replikatsiooni ajastuse.

Levinud kromatiini modifikatsioonid, mis panustavad replikatsiooni alguspunktide ajastusse, on histoonide atsetüleerimine. Atsetüleerimise tulemusena lisatakse histoonisaba N-terminaalsete lüsiinide külge atsetüülrühm, mis muudab histoonide laengut negatiivsemaks ja seeläbi interaktsioone negatiivselt laetud DNA-ga nõrgemaks. See omakorda loob soodsamad tingimused erinevatele DNA-ga interakteeruvatele valkudele, mis seeläbi DNA-le kergemini ligi pääsevad (Unnikrishnan et al., 2010). Sageli paiknevadki hilised replikatsiooni alguspunktid deatsetüleeritud piirkondades, kus kromatiin on tihedamalt pakitud. On näidatud, et histooni deatsetülaasi Rpd3 deleteerimine muutis hiliste, mittetelomeersete replikatsioonipunktide aktivatsiooni varasemaks, kuna atsetüleeritus hiliste alguspunktide ümber suurenes (Knott et al., 2009; Vogelauer et al., 2002).

1.5.1.2. Teised replikatsiooni ajastusse panustavad faktorid

Replikatsioon imetaja rakkudes on reguleeritud 100-200 kbp pikkuste järjestuste tasandil (Berezney et al., 2000). Nende järjestuste ulatuses koonduvad järjestikku asetsevad varaselt ja hiliselt replitseeruvad alguspunktid klastrisse, moodustades mitmeid replisoomi sisaldava replikatsioonitehase (**joonis 5**). Sarnane mehhanism leiab aset ka pärmirakkudes, kus mitmed replisoomid koondatakse tuumas ruumiliselt kokku. Nendes piirkondades on usutavasti suurenenud kontsentratsioon limiteerivaid faktoreid, mis annavad nendele replikatsiooni alguspunktidele eelise varem replitseerumiseks. Varasemalt arvati, et *Saccharomyces cerevisiae* replikatsioonitehased sisaldavad kuni 20 replisoomi (Kitamura et al., 2006), kuid 2013. aastal avaldatud töö (Saner et al., 2013) tõi sellesse arusaama palju detailsema pildi. Autorid kasutasid ühe raku reaalaajas pildistamise (*live-cell imaging*) meetodit ning uurisid, kui tihti saavad lähestikku paiknevad replisoomid replikatsioonitehasteks kokku. Oma tulemustes tõid nad välja, et replikatsioonitehaste suurus varieerub rakkudes suuresti, ning 39% neist sisaldab vaid ühte replisoomi ning suuremad replikatsioonitehased on vähem levinud. Samuti ei koondunud replikatsioonitehasteks alati samad ARS-id, vaid eraldiseisvates rakkudes paiknevad nad sageli erinevates replikatsioonitehastes. (Saner et al., 2013)



Joonis 5. Replikatsioonitehaste moodustumine. Individuaalsesse replikatsioonitehasesse koondatakse lähedal asetsevad varased või hilised replikatsiooni alguspunktid, millega võimaldatakse suurte DNA domäänide replitseerumist ning ligipääsu replikatsioonifaktoritele. (Tõlgitud Göndör ja Ohlsson, 2009 järgi)

Kuigi varasemalt on arvatud, et telomeersetes piirkondades asuvate replikatsiooni alguspunktide hilisem aktivatsioon tuleneb peamiselt neid ümbritsevast heterokromatiinist, on praeguseks leitud, et poolduvas pärmis (*Schizosaccharomyces pombe*) osalevad hiliste replikatsiooni alguspunktide regulatsioonis valgud Taz1 (*Telomere-associated in Schizosaccharomyces pombe*) ja Rif1 (*RAP1-interacting factor 1*) [*S. cerevisiae* Taz1 homolog on Rap1 (Marcand et al., 1997)]. Katsetega kus *RIF1* deleteeriti, muutusid 134 tavaliselt varajast replikatsiooni alguspunkti hilisemaks ja 189 alguspunkti aktiveerusid varasemalt. Kõige rohkem Rif1 seondumispirkondi leiti ARS-ide kõrvalt, mis muutusid hilisest varasemaks, viidates sellele, et Rif1 põhjustab otseselt nende subtelomeersete replikatsioonipunktide hilist aktivatsiooni (Hayano et al., 2012).

2017. aastal avaldatud töö tõi selgema pildi, kuidas Rif1 replikatsiooni alguspunktide ajastust mõjutab. Seal näidati, et Rif1 negatiivne mõju DNA replikatsioonile on põhjustatud sellest, et Rif1 takistab Mcm2–7 kompleksi fosforüleerimist DDK poolt, mille tulemusena Mcm kompleksi aktiveerimist ei toimu. Teisalt aga avastati, et Rif1 kaitseb Orc1 valku enneaegse fosforüleerimise eest, omades seeläbi positiivset mõju replikatsiooni alguspunktide litsentseerimisele G1-faasis. Mudeli kohaselt stabiliseerib Rif1 kõigepealt Orc1, soodustades selle seondumist alguspunktidega. Seondunud Orc1 stimuleerib seejärel G1-faasis Mcm2–7 kompleksi laadimist ning S-faasis limiteerib Rif1 jällegi Mcm2–7 kompleksi fosforüleerimist, seeläbi piirates aktiveeritavate replikatsiooni alguspunktide arvu. (Hiraga et al., 2017)

1.5.2. Replikatsiooni limiteerivad faktorid

Mitmeid replikatsioonil osalevaid valke ekspresseeritakse väga vähesel määral ning vaid kindlal rakutsükli etapil. See teeb neist replikatsiooni toimumise jaoks limiteerivad faktorid, kuna hilisemate replikatsiooni alguspunktide käivitumine sõltub sellest, millal need faktorid varasemalt replitseeruvatelt järjestustelt vabanevad ning liiguvad edasi hilisematele replikatsiooni alguspunktile. Nende valkude olemasolu rakus on üks peamisi põhjuseid, miks erinevad replikatsiooni alguspunktid aktiveeritakse S-faasi erinevatel etappidel. See, milliste alguspunktidega limiteerivad faktorid seonduvad, on suuresti määratud eelpool mainitud replikatsiooni alguspunktide kromosoomi kontekstiga ning tuumasisese paigutusega. Sellest tulenevalt seonduvad limiteerivad faktorid suurema tõenäosusega nendele alguspunktile, mis asuvad avatud kromatiinis ning transkriptsiooniliselt aktiivsetes rakutuuma piirkondades. Alles peale seda, kui nende töö kõige varasematel replikatsioonipunktidel on tehtud, saavad nad vabaneda ja seonduda järgmiste pre-replikatsiooni kompleksidega, et moodustada funktsionaalseid replisoomi.

Üheks selliseks faktoriks on Cdc45 koos teda pre-RC-le siduva Sld3-ga. Aeg, mil Cdc45 kompleksidega seondub, korreleerub replikatsiooni alguspunktide erineva ajastusega, viidates sellele, et DDK poolt vahendatud Cdc45-Sld3 värbamine on ajaliselt kontrollitud. Varajastel replikatsiooni alguspunktidel on nad kohal juba G1-faasis, kui pannakse paika replikatsiooni alguspunktide ajastus (Aparicio et al., 1999; Dimitrova ja Gilbert, 1999). Sõltumatute katsetega on näidatud, et Cdc45 ja tema seondumispartneri Sld3, Sld2, Sld7, Dpb11 ja DDK subühikute Cdc7 ja Dbf4 üleekspresseerimine suudab muuta tavapärasest hiljem replitseeritavate alguspunktide ajastust varasemaks. Samuti tõuseb üleüldine replikatsiooni alguspunktide aktivatsioon, mis on kooskõlas sellega, et Cdc45 on üks faktoritest, mis piirab aktiivsete replisoomide üldarvu rakutsükli S-faasis (Mantiero et al., 2011; Tanaka et al., 2011). Vastupidiselt, Cdc45 hulga piiramine rakkudes aga vähendab replikatsiooni toimumise aktiivsust (Edwards et al., 2002).

1.6. Forkhead transkriptsioonifaktorid

Forkhead (FOX) perekonna transkriptsioonifaktorid on evolutsiooniliselt konserveerunud pärmist kuni inimeseni, osaledes rakkudes mitmetes füsioloogilistes protsessides. Selle perekonna valgud seonduvad nukleiinhapetele neile omase DNA-d seondava domääni DBD (*DNA-Binding Domain*) kaudu. Pagaripärmis seondub see domään konserveerunud genoomsele DNA järjestusele RYMAAYA (R=A/G, Y=C/T, M=A/C) (Tuteja jt., 2007), mida esineb üle genoomi umbes 46 000, kuid ainult väga vähe osa neist seob tegelikkuses Fkh1/2 (Ostrow et al., 2014; Tuteja ja Kaestner, 2007). Imetajates on FOX perekonna transkriptsioonifaktoreid kirjeldatud kui valke, mis osalevad rakutsükli regulatsioonis, organismi arengus ja vananemises, apoptoosis ning suudavad modifitseerida kromatiini, muutes seda avatumaks ning mõjutades sel viisil geenide aktiivsust ja transkriptsioonifaktorite seondumist (Lalmansingh et al., 2012). Lisaks mängivad paljud FKH perekonna faktorid rolli haiguste ja vähi tekkel (Myatt ja Lam, 2007).

Pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* on esindatud kaks FOX alam perekonda FOX O ja M, millesse kuulub neli Fkh-DBD (*Fkh-DNA binding domain*) domääni sisaldavat faktorit - Fkh1 (*Forkhead homolog 1*), Fkh2 (*Forkhead homolog 2*), Hcm1 (*High copy suppressor of calmodulin*) ja Fhl1 (*Forkhead-like 1*). Fkh1 ja Fkh2 on neist enim sarnased ning tunnevad ära samu DNA järjestusi. Fkh1, Fkh2 ja Fhl1 omavad kõik ka FHA domääni (*Forkhead associated domain, FHAD*), mille kaudu toimub seondumine teiste valkudega (joonis 6) (Murakami jt, 2010).



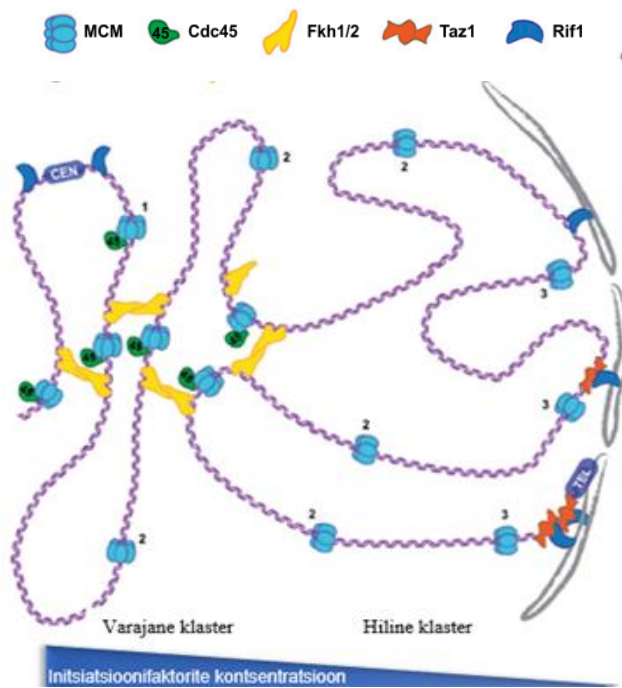
Joonis 6. *S. cerevisiae* Forkhead perekonna transkriptsioonifaktorite domäänide paigutus ja valkude suurus. FKH– Forkheadide DNA-ga seonduv domään ning FHA domään, millega Forkheadid seonduvad teiste valkudega. Pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* on esindatud kaks FOX alam perekonda FOX O ja M, millesse kuulub neli faktorit: Fkh1, Fkh2, Hcm1 ja Fhl1. (Tõlgitud Murakami jt, 2010 põhjal)

Fkh1/2 omavad olulist funktsiooni *CLB2* klatri geenide transkriptsiooni regulatsioonis (Murakami et al., 2010). Need geenid reguleerivad rakutsükli G2/M-faasi üleminekut ning üheks selle klatri valguks on mitootiline tsükliin Clb2, mille õigeaegse aktivatsiooni eest

vastutab peamiselt Fkh2 (Breedon, 2000). Fkh2 repressseerib selle transkriptsiooni G1-faasis ja stimuleerib hilises S- ja G2/M-faasis, seondudes ko-aktivaatoriga Ndd1 (Koranda et al., 2000). Fkh1 suudab Fkh2 selles asendada, kuid seondub *CLB2* promootorile nõrgema afiinsusega ning lisaks on tema peamine roll repressseerida *CLB2* transkriptsiooni (Hollenhorst et al., 2000, 2001). Fkh1/2 vastastikune mõju reguleerib seega Clb2 taset rakus, mis on omakorda vajalik indutseerimaks rakkude jagunemist. Häired *CLB2* klatri geenide transkriptsioonis põhjustavad pikale veninud tsütokineesi, mille tulemusena moodustuvad ebaloomulikult pikad rakud, mis kasvavad agregeerunult (Linke et al., 2013; Shi, 2016).

Viimaste aastatega on selgelt näidatud Forkhead transkriptsioonifaktorite osalust replikatsiooni alguspunktide aktivatsiooni ajastuse reguleerimisel. Fkh1 ja Fkh2 mõjutavad pagaripärmis nende alguspunktide aktiveerimise ajastust ligi pooltel replikatsiooni alguspunktidel, nii varajastel kui hilistel. Kui mõlemad geenid deleteeriti, nihkus valdav osa nende valkude poolt kontrollitud varajasi replikatsiooni alguspunkte hilisemaks (30%), samal ajal kui tavaliselt hilisemalt replitseeruvad alguspunktid alustasid replikatsiooni varem (23%). Ühtlasi tuli välja, et just *FKH1* deleteerimine mõjutab kindlate alguspunktide ajastust, samal ajal kui *FKH2* deleteerimine üksi ei omanud replikatsiooni ajastusele märgatavat mõju. Nendest katsetest selgus, et Fkh1/2 omavad rakkudes replikatsiooni regulatsioonil sarnast rolli, kuid teevad seda erineva ulatusega – Fkh1 suudab üksinda tagada normaalse replikatsioonimustri, samas kui Fkh2 suudab Fkh1 ainult osaliselt asendada. (Knott et al., 2012)

Fkh1/2 poolt kontrollitavaid replikatsiooni alguspunkte lähemalt uurides leiti, et Fkh1/2 võivad tekitada kontakti kahe eri kromosoomi peal asetseva replikatsiooni alguspunkti vahel. Kasutades 4C (*chromosome conformation capture-on-chip*) meetodit, näidati, et ARS305 ja ARS607 asetsevad metsiktüüpi rakkudes lähestikku, kuid interaktsioon ei olnud täheldatav kui ühel neist eemaldati Fkh1/2 konsensusjärjestus. Välja käidud mudeli kohaselt vastutab Fkh1/2 replikatsiooni alguspunktide klasterdumise eest ning seni teadmata mehhanismidega soodustatakse nendes klastrites ligipääs replikatsioonifaktoritele (**joonis 7**). (Knott et al., 2012)



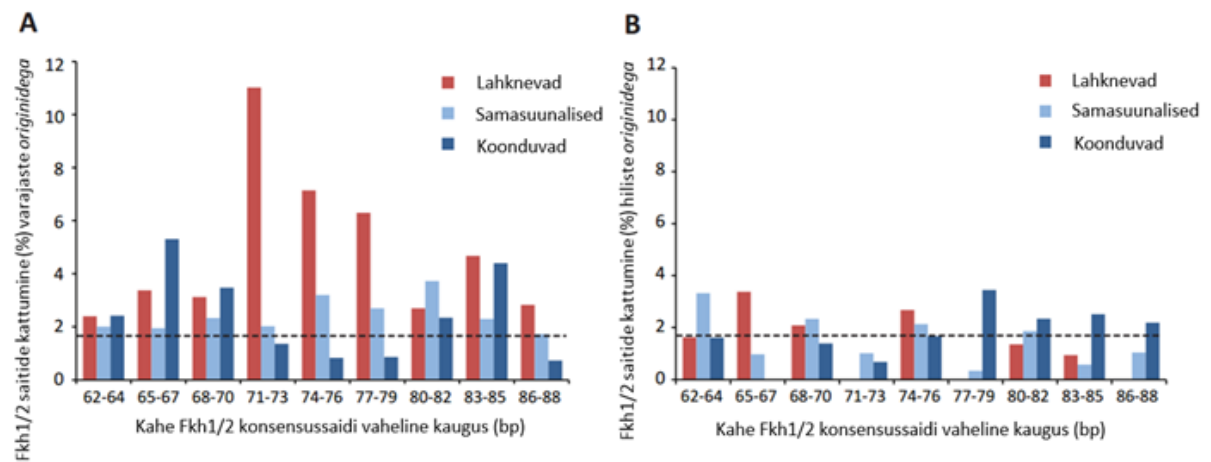
Joonis 7. Forkheadide poolne replikatsiooni alguspunktide klasterdamine. G1-faasis aset leidvate Forkhead valkude omavaheliste interaktsioonide tulemusena moodustatakse tuumas klastrid, mis oletatavalt kattuvad limiteerivate replikatsioonifaktoritega. Teisalt seob Rif1 alamhulga replikatsioonipunkte tuuma perifeeriasse, eemale kõrgemast Cdc45 kontsentratsioonist. (Tõlgitud Aparicio, 2013 järgi)

Kaugel asetsevate lookuste interaktsioon oli paljulubav teooria ning seda uuriti edasi. Lähtudes sellest, et inimese Forkhead FoxP valgud FoxP3 ja FoxP2 suudavad dimeriseeruda, otsustasid Ostrow jt. kontrollida, kas *S. cerevisiae* Fkh1 ja Fkh2 võiksid potentsiaalselt kasutada replikatsiooni alguspunktide klastrisse koondamiseks homodimeriseerumist (Ostrow et al., 2017). Selleks võrdlesid nad pagaripärmi Fkh1/2 aminohappelist järjestust imetajate FoxP alamperekonna valkude aminohappelise järjestusega. Sellest võrdlusest tuli välja, et Fkh1/2 jagavad inimese Forkhead alamperekonnap P tõepoolest peaaegu identset järjestust piirkonnas, mis on just vajalik dimeriseerumiseks (domääni vahetuse piirkond, *domain-swap*), kusjuures teised Fkh1/2 homoloogid pärmis ei omanud vastavate valkudega nii suurt sarnasust. Fkh1/2 ja FoxP eristuvad teistest Forkhead valkudest selle poolest, et need omavad dimeriseerumiseks kõige olulisemas positsioonisalaniini jääki, samas kui teistel Forkheadidel on seal proliin. Justalaniin võimaldab moodustuda väljaulatuval α -heeliksil, mis on dimeriseerumiseks vajalik. Lisaks asuvad läheduses veel aminohappejäägid, mille vahel formeerub soolasild, mis omakorda stabiliseerib tekkivat dimeeri (Bandukwala et al., 2011; Stroud et al., 2006).

Küll aga tuli ko-immunosadestamise katsetest välja asjaolu, et ainult Fkh1-d moodustavad homodimeere läbi oma forkhead-domääni vahetuse piirkonna, samas kui kõnealune piirkond on konserveerunud ka Fkh2 valgul. Võimalus jääb, et ka Fkh2 dimeriseerub, kuid katsetes ei olnud Fkh2 stabiilne. Kuna FoxP2/P3 kohta on teada, et eelpool mainitud oluliste aminohapete muteerimine elimineerib nende võime moodustada dimeere, siis viidi ka pagaripärmi *FKH1/2* sisse samad mutatsioonid. Domääni suhtes mutantsed Forkheadid suutsid tagada normaalse transkriptsioonilise kontrolli ja seonduda replikatsiooni alguspunktidega, kuid replikatsiooni ajastuse kontroll oli häiritud määral, mis sarnanes *FKH1/2* null-mutantide replikatsiooniprofiilile. Seega replikatsiooni alguspunktide klastrisse koondamine ja Fkh1 dimeriseerumine võib olla üks mehhanismidest, läbi mille Forkheadid reguleerivad replikatsiooni alguspunktide ajastust. (Ostrow et al., 2017)

Kuna Fkh1 ja 2 valgu ekspressioon rakus on madal, püstitasid Peace jt. hüpoteesi, mille kohaselt nende transkriptsioonifaktorite kättesaadavus replikatsiooni alguspunktidel määrab, millal toimub konsensusaidiga replikatsioonipunkti aktiveerimine. Tulemustest selgus, et Fkh-de üleekspressioonimine võimaldas hiliste replikatsiooni alguspunktide replitseerumist varajases S-faasis. Nendest tulemustest selgub, et Fkh1/2 ei seonu ja ei reguleeri kõiki oma konsensusjärjestusi, kuna rakus ei ole piisavalt Fkh1 valku. (Peace et al., 2016)

Meie töögrupp demonstreeris hiljuti, et Forkheadid vajavad seondumiseks ja varajaste replikatsioonipunktide aktiveerumiseks kindlas orientatsioonis asetsevad seondumissaitide (**joonis 8**). Näiteks varajased replikatsiooni alguspunktid ARS305, ARS607 ja ARS737 sisaldavad kahte Fkh1/2 seondumisjärjestust, mis asetsevad üksteise suhtes divergentselt ning on eraldatud 72 aluspaariga. Manipuleerides Fkh-de seondumissaitide asetusega selgus, et ainult metsik-tüüpi konsensusaitide asetusega ARS607 suudab tagada efektiivse Fkh1/2 seondumise ja replikatsioonipunkti varajase replitseerimise. Forkheadide seondumissaitide paigutus osutub määravaks just seetõttu, et Fkh1/2 esinevad rakkudes limiteeritud hulgal ning seonduvad ainult parima paigutusega konsensusjärjestustele. (Reinapae et al., 2017)



Joonis 8. Fkh1/2 konsensusssaitide paiknemine üksteise suhtes ning kattumine varajaste ja hiliste replikatsiooni alguspunktidega. Ülegenoomsest analüüsist nähtub, et kõige varasemalt aktiveeritavate replikatsiooni alguspunktide puhul (A) paiknevad Fkh1/2 konsensusssaidid üksteise suhtes divergentselt ning on eraldatud 72 aluspaariga- sagedamini, kui seda juhuslikkuse alusel oodata võib. Hilise replikatsiooni alguspunktiga (B) 72bp lahknevalt orienteeritud Fkh1/2 konsensusssaidid ei kolokaliseeru. (Reinapae et al., 2017)

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Mõned aastad tagasi avaldatud töös demonstreeris Knott jt, et transkriptsioonifaktorid Fkh1 ja Fkh2 omavad olulist rolli replikatsiooni alguspunktide ajastuse määramisel (Knott et al., 2012). Senini on jäänud aga üsna arusaamatuks, mis mehhanismi kaudu selline ulatuslik regulatsioon toimub. Erinevate välja pakutud mudelite järgi võib regulatsioon toimuda näiteks läbi alguspunktide klastrisse koondamise, arvatavasti tänu Fkh1 dimeriseerumise või Cdc45 seondumise hõlbustamise. Siiski pole teada, millised piirkonnad Fkh1 järjestusest on olulised replikatsiooni ajastuse määramisel. Sellest tulenevalt olid käesoleva töö eesmärgid järgmised:

- Luua pagaripärmi tüved, milles oleks võimalik uurida erinevate *FKH1* järjestuse piirkondade deleteerimisel saadud mutantide mõju DNA replikatsiooni initsiatsioonile.
- Töötada välja protokoll, mis võimaldab uurida fkh1 mutantide mõju replikatsiooni alguspunktide replikatsioonile *anchor-away* süsteemis.
- Näidata *FKH1* piirkonnad, mis mõjutavad replikatsiooni initsiatsiooni regulatsiooni.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud söötmed

Töös kasutatud *S.cerevisiae* tüvesid kasvatati YPD (*yeast extract, peptone, dextrose*) tardsöötme [glükoos 20 g/l (*Medipharma*), agar 20 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l (LAB MTM)] ja vedelsöötmes [mükoloogiline peptoon 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, glükoos 20 g/l]. Tardsöötme kasvatamine toimus 30°C inkubaatoris (*MIR-162, Sanyo*), vedelsöötmes 30°C juures loksutil (*Excella E25, New Brunswick Scientific*), 180 rpm.

Markergeenidega selekteeritavate tüvede konstrueerimiseks kasutati vastavat antibiootikumi sisaldavat miinimumsöödet, mille resistentsusgeen pärmi sisestati [[agar 2%, YNB (*yeast nitrogen base, Applichem*) 6,7 g/l, glükoos 2% (*Medipharma*), aminohapped ja nukleotiidid (*Serva*) – adeniin 40 µg/ml, uratsiil 40 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, trüptofaan 40 µg/ml, lüsiin 80 µg/ml, histidiin 80 µg/ml, antibiootikumid *Nourseothricin* [NAT (*Sigma*), lõppkontsentratsioon 100 µg/ml] ja *Geneticin* [G418 (*Sigma*), lõppkontsentratsioon 200 µg/ml]]. Kui selektiivsusmarkeriks oli mõne olulise aminohappe või nukleotiidi sünteesiraja geen, siis vastavalt geenilt kodeeritavat lõpp-produkti miinimumsöötmesse ei lisatud.

Pärmitüved ristati YPD tardsöötmel ning ristamisele järgneval päeval kanti rakud diploidide selekteerimiseks tempelkülvi meetodil selektiivsöötmele. Edasi külvati üks diploidi koloonia sporulatsioonisöötmele [pärmiekstrakt 1 g/l, kaaliumatsetaat 10 g/l (*Applichem*), glükoos 0,5 g/l, agar 20 g/l, tüvele vajalikud aminohapped ja nukleotiidid $\frac{1}{4}$ normaalsest kogusest (toodud selektsioonitasside juhendis)]. Tasse inkubeeriti 3-4 päeva toatemperatuuril. Tetraadianalüüsi jaoks kasutati spooride eraldamiseks tetraadide eraldamise mikroskoopi (*Singer instruments MSM*). Soovitud selektsioonimarkereid sisaldavad pärmikolooniad valiti välja selektiivtasside analüüsil tembeldades YPD tassil kasvanud kolooniad selektiivtassidele ning seejärel analüüsides spooride kasvu.

Paardumistüübi määramiseks ristati huvi pakkuvad pärmitüved testtüvedega DC14 ja DC17 ning külvati miinimumsöötmele, kus puudusid aminohapped ja nukleotiidid (-AA) (agar 2%, YNB 6,7 g/l, glükoos 2%). Selleks segati ühest kolooniast pärit rakud ühes tassi servas DC14 tüvega (a paardumistüüp) ja teises tassi servas DC17 tüvega (α paardumistüüp). Kahe päeva pärast vaadeldi, kumma tüvega ristatud rakud kasvades kolooniaid moodustasid. Kuna meie katsetes on vajalik, et kasutatavad pärmitüved oleksid a-paardumistüübiga ning arvestades, et pärm paardub ainult vastaspaardumistüüpi pärmiga, valiti uuritav pärmikoloonia edasisteks katseteks vaid juhul, kui see moodustas kolooniaid DC17 tüvega, mis kinnitab määratava koloonia a paardumistüüpi.

2.2.2. Kasutatud pärmitüved

Töös kasutati pärmitüvesid DC14, DC17, AKY1145, AKY1442, AKY1436 ja AKY1439, mis on varasemalt konstrueeritud Arnold Kristjuhani töögrupi poolt ja tüvesid AKY 1356, 1357, 1358, 1359, 1360, 1361, 1362, 1363, 1477, 1478, 1479, 1480, 1481, 1482, 1483, 1484, 1573, 1574, 1575, 1576, 1577, mis saadi antud töö raames. Tüvede genotüübid ja tegijad/päritolu on toodud **lisas 1**. Kõik kasutatud tüved on *bar1Δ*, mis vastasel juhul lagundab α-faktori. α-faktor on α paardumistüübiga pagaripärmi poolt toodetav paardumisferomoon, mida saab kasutada A paardumistüübiga tüvede G1-faasi arresti esile kutsumiseks. Sellest tulenevalt on ka kõik töös kasutatud tüved A paardumistüübiga.

2.2.3. DNA eraldamine ja sadestamine

2.2.3.1. gDNA eraldamine pärmist LiOAc-SDS meetodil

Tüvede tegemisel kasutati peamise kontrollmeetodina PCR reaktsiooni ning sekveneerimist. Selleks on vajalik kõigepealt uuritavate pärmikolooniate genoomse DNA eraldamine. Kõigepealt suspendeeriti üks pärmikoloonia 100 µl 200 mM LiOAc ja 1% SDS lahuses ning inkubeeriti 10 minutit 70 °C termostaadis (*Eppendorf Thermomixer compact*), peale mida lisati rakkudele 300 µl 96% etanooli. Järgnevalt sadestati rakupuru ja DNA tsentrifuugimisega (*Eppendorf Centrifuge R-5415*) 1 minut maksimumpööretel (16 100 G) ning supernatant aspireeriti. Sadet pesti 70% etanooliga ning lahustati 50 µl Milli-Q vees (Lööke et al., 2011).

2.2.3.2. DNA puhastamine fenool-kloroform meetodil

Rakkudest DNA eraldamiseks fenool-kloroform meetodil purustati alustuseks rakud klaaskerakestega. Selleks lahustati rakud 500 µl lüüsipuhvris (10 mM TRIS pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% TritonX-100) ja lisati 300 µl klaaskerakesi [läbimõõduga 0,5 mm, kui kasutati väristajat (*Disruptor Genie™, Scientific industries*) või 0,25-0,5 mm, kui kasutati *Precellys®24* homogeniseerijat (*Bertin*)]. Rakkude purustamine toimus 15 min väristajal või programmiga 6000 RPM 3x60 sek, kui kasutati homogeniseerijat.

Peale rakkude purustamist lisati proovidele samas mahus fenool-kloroformi (1:1), segati vorteksiga ning tsentrifuugiti toatemperatuuril 5 minutit maksimumkiirusel. Saadud vesifaas, mis sisaldab DNA-d, tõsteti uude 2 ml tuubi ja lisati uuesti proovidega samas mahus fenooli, tehti vorteks ja tsentrifuugiti proove 5 minutit maksimumpööretel. Vesifaas tõsteti edasi uude 2 ml eppendorfi tuubi ja lisati samas mahus veega küllastatud kloroformi. Peale vorteksit tsentrifuugiti proove toatemperatuuril 5 minutit, maksimumpööretel. Saadud vesifaas tõsteti jällegi uude 2 ml tuubi ja DNA sadestati etanoolmeetodil (**ptk 2.2.3.3**).

2.2.3.3. Etanoolsadestus

DNA puhastamiseks ja sadestamiseks lisati sadestatavale DNA-le glükogeeni (lõppkontsentratsioon 0,8 µg/µl), ½ mahust 7,5 M ammooniumatsetaati NH_4Ac , 3X mahtu 96% etanooli ning asetati 10 minutiks -80°C juurde. Kui DNA-d puhastati eelnevalt fenool:kloroform meetodil, siis lisati rakkudele 1/10 mahust naatriumatsetaati (lõppkontsentratsioon 0,3M) ja asetati samuti 10 minutiks -80 °C. Järgnevalt jätkati tsentrifuugimisega 15 minutit maksimumpööretel +4°C juures, aspireeriti supernatant ning soolade eemaldamiseks pesti sadenenud DNA-d 1 ml 70% etanooliga. Supernatandi

eemaldamiseks tsentrifuugiti DNA-d 10 minutit maksimumpööretel, aspireeriti supernatant ja kuivatati proove termostaadis 37°C juures. DNA lahustati vees ja kasutati edaspidistes reaktsioonides. qPCR reaktsioonides kasutatav DNA lahustati üles Tris-EDTA lahuses (1M Tris, 0,1 M EDTA).

2.2.4. Pärm transformeerimine

Transformeeritav tüvi kasvatati loksutil 50 ml YP vedelsöötmes, 30°C juures üleöö, 180 rpm loksutil tiheduseni 2×10^7 rakku/ml. Rakud koguti tsentrifuugides 3 minutit 2000 G (*Sigma 4K15*, rootori tüüp 11150), eemaldati sööde, pesti 10 ml 30°C autoklaavitud milli-Q veega ning korraldati tsentrifuugimist ja aspireerimist. Rakkude tõstmiseks 1,5 ml eppendorfi tuubi suspendeeriti rakud uuesti 1 ml Milli-Q vees, tsentrifuugiti, eemaldati supernatant ja lahustati üles 1 ml TE/LiOAc lahuses (1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCL pH 7,5; 100 mM LiOAc). Samal ajal valmistati ette transformeeritav DNA. Selleks kuumutati 5 µl DNA-kandjat/*carrier*-DNA-d 100°C-ni, jahutati kiirelt jääl ja segati kokku 40 µl (~2,4 µg) PCR produktiga. Eelnevalt TE/LiOAc lahuses suspendeeritud rakud tsentrifuugiti, supernatant aspireeriti ja rakusade lahustati uuesti 250 µl TE/LiOAc lahuses (eeldatav rakutihedus 4×10^9 rakku/ml).

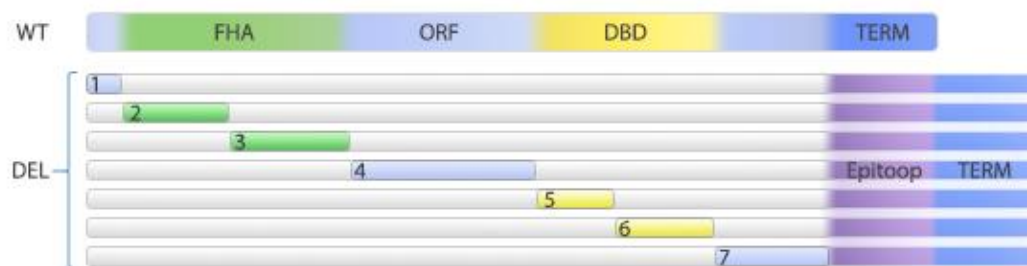
80 µl rakususpensiooni tõsteti uude tuubi ning segati transformeeritava DNA-ga, lisati 300 µl PEG4000 (lõppkontsentratsioon 40%) ja inkubeeriti 30°C termostaadil 1 h, aeg-ajalt segades. Peale inkubeerimist lisati rakkudele 70 µl 100% DMSO-t (dimetüülsulfoksiid, Sigma®) ning inkubeeriti rakke 15 min, 42°C. Seejärel koguti rakud tsentrifuugides, aspireeriti supernatant ja resuspendeeriti rakud 100 µl Milli-Q vees. Resuspendeeritud rakud plaaditi YPD tardsöötmele, inkubeeriti ööpäev 30 °C juures, kanti tempelkülvi meetodil vastavale selektsioonitassile ja inkubeeriti 3-4 päeva 30 °C.

2.2.5. Tüvede valmistamine

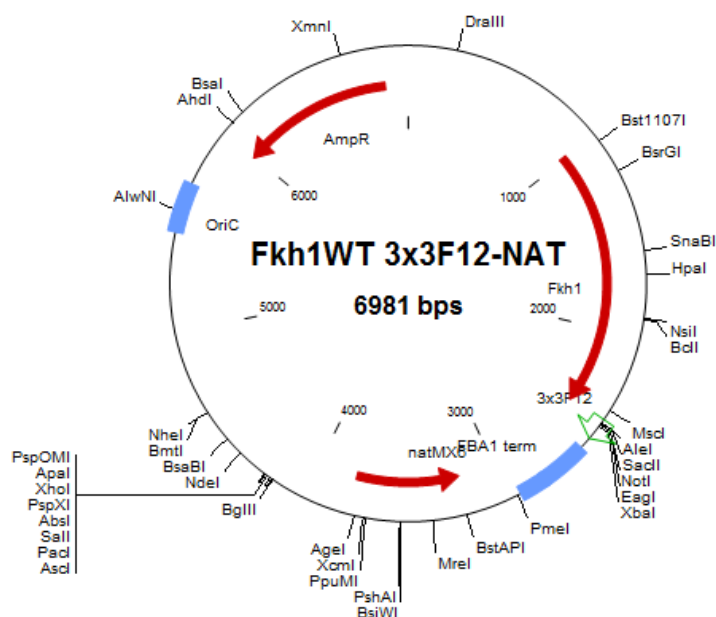
2.2.5.1. *Fkh1:A1-7+ fkh2:ΔC*

Selleks, et uurida *fkh1* deletsioonimutantide mõju DNA replikatsiooni initsiatsioonile, tuli alustuseks konstrueerida tüved, kus metsiktüüpi *Fkh1* oli asendatud muteeritud *fkh1*-ga. Selleks oli käesoleva töö autor konstrueerinud oma bakalaureusetöö raames vastavad plasmiidid, kus *FKH1* oli muteeritud ning sisaldas C-terminaalset kolmekordset 3F12 epitoopi ja *FKH1* enda promootor ja terminaator järjestust (**joonised 9 ja 10**). Amplifitseerides nendelt plasmiididelt *fkh1* koos integreerumiseks vajaliku homoloogiaga

ning transformeerides päritüve saadud PCR produktidega, inserteerus muteeritud *fkh1* järjestus homoloogilise rekombinatsiooni teel pärmis genoomi. Primerid ja PCR programm järjestuse amplifitseerimiseks on toodud **lisas 2**.



Joonis 9. Konstrueeritavad Fkh1 deletsioonimutandid. Forkheadiga seondumise domään FHA (roheline), DNA-d seondav järjestus DBD (kollane), 3x3F12 epitoop (lilla), *FKH1* kodeeriv järjestus ORF (hall), terminaatorjärjestus TERM (tumesinine) ning teadmata funktsiooniga alad on helesinised. Kokku tehti 7 erinevat deletsiooni. Deleteeritavad aminohapped $\Delta 1$: 1-22; $\Delta 2$: 23-92; $\Delta 3$: 93-171; $\Delta 4$: 172-292; $\Delta 5$: 293-344; $\Delta 6$: 345-409; $\Delta 7$: 410-484.



Joonis 10. Deletsioonimutantide konstrueerimiseks kasutatud plasmid Fkh1WT 3xF12-NAT, mis sisaldab *ampicillin* (AMP) selektiivsusmarkerit, et paljundada ja selekteerida plasmidi *E. coli* ja *Nourseothricin* (NAT), et selekteerida insertiooniga pärmikolooniaid. Deletsioonid viidi sisse autori poolt optimeeritud *overlap* PCR meetodiga (Kairi Koppel, bakalaureusetöö)

Kuna Fkh1 ja Fkh2 on omavahel lähedased homologid ning Fkh2 suudab Fkh1-te tema funktsioonides asendada, siis oli oluline, et transformeeritav tüvi ei sisaldaks funktsionaalset Fkh2-te, kuna vastasel juhul pole *FKH1* deletsioonimutantide mõju eristatav metsiktüüpi Fkh1-st. Varasema kirjanduse baasil sai valitud tüvi, kus Fkh2 C-terminusest oli eemaldatud ah 624-862, mille kohta on teada, et *fkh2:Δ624-862* (edaspidi *fkh2:ΔC*) töötab endiselt

transkriptsioonis, kuid replikatsiooni roll on kadunud (Reynolds et al., 2003). Sobivaks tüveks osutus varasemalt meie töögrupis konstrueeritud tüvi AKY1145, mille genotüüp on toodud **lisas 1**. Transformeeritud pärm külvati selektsioonitassile NAT^- . Selektiivtassil üles kasvanud kolooniatest eraldati DNA (**ptk 2.2.3.1**) ning inserteerumist kontrolliti PCR-i ja sekveneerimisega. Praimerid ja PCR programm on toodud **lisas 3**.

2.2.5.2. *Fkh1:Δ1–7+ fkh2Δ*

Fkh2 deleteerimiseks pärmi genoomist amplifitseeriti plasmiidilt LEU2 markergeen, ning saadud produktiga transformeeriti eelnevalt konstrueeritud tüvesid (*fkh1:Δ1–7+ fkh2:ΔC642-862*). Transformatsiooni tulemusena asendatakse genoomis Fkh2 markergeeniga. Saadud transformandid külvati YPD söötlele ning sealt edasi LEU^- selektsioonitassile, millel kasvama läinud kolooniatest eraldati DNA (**ptk 2.2.3.1**) ning inserteerumist kontrolliti PCR-iga. Praimerid ja PCR programm on toodud **lisas 3**.

2.2.5.3. *Fkh1:Δ1–7+ Fkh2 anchor-away*

Kuna *fkh1* deletsioonimutandid 2–6 (*fkh1:Δ1–7+ fkh2Δ*) moodustasid kasvamisel kokku kleepunud raku-agregaate, siis nende tüvedega tehtud katsete tulemuste tõlgendamine on raskendatud. Agregeerumise vältimiseks tehti tüved, milles kasutatav *anchor-away* süsteem võimaldab huvipakkuva valguga tuumast eemaldada selleks sobival ajahetkel. Meetod seisneb kahe rapamütsiini siduva domeeni interaktsiooni indutseerimisega, kui rakkude kasvukeskkonda lisatakse rapamütsiini. Üks selline domeen on inimese mTOR rapamütsiini siduv domeen – FRB, mis lisatakse uuritava valguga C-terminusse ning teine, milleks on inimese Fkbp12, mis lisatakse ribosoomi suure subühiku valgule Rpl13a. Interaktsioonile järgnevalt transporditakse soovitud valk tuumast välja.

Eesmärgiks oli luua tüved, mis võimaldaksid hoida Fkh2 tuumas seni, kuni see on oma rolli Clb2 promootoril täitnud ning seejärel tuumast välja transportida. Antud tüves on Fkh2 valguga C-terminus liidetud FRB valguga ning rapamütsiini lisamisega indutseeritakse Fkh2 transport tuumast välja. See võimaldab uurida *FKH1* deletsioonide mõju replikatsiooni ajastusele, samas säilitades Forkheadide poolse transkriptsioonilise kontrolli. Soovitud omadustega tüve konstrueerimiseks kasutati eelnevalt loodud tüvesid *fkh1:Δ1–7+ fkh2Δ*, mis ristati töögrupis varem konstrueeritud *anchor-away* süsteemi sisaldava tüvega AKY1442 (**lisa 1**). Ühtlasi on sellest tüvest deleteeritud Fkbp12 pärmi homoloog *FPR1* (*fpr1Δ*) ja rapamütsiini resistentsuse tagamiseks on muteeritud *TOR1* (*tor1-1*). Ristamise tulemusena asendati *fkh2Δ* Fkh2-FRB'ga,

viidi sisse *tor1* mutatsioon, samas säilitades *FKH1* deletsioonimutandid ning epitoopmärgisega Cdc45.

2.2.6. Rakkude ettevalmistamine ja ajapunktide kogumine replikatsiooni uurimiseks

Rakutsükli analüüsimiseks kasvatati rakud üleöö ette tiheduseni 5×10^6 rakku/ml. Rakud arrestiti G1-faasis inkubeerides neid 3h α -faktoriga (lõppkontsentratsioon 100 nM). Arrestitud rakkudest koguti esimene ajapunkt (0), mille jaoks tõsteti 1,2 ml söödet ($\sim 1,2 \times 10^7$ rakku/ml) 10 ml 70% jääkülma etanooli. Järgnevalt pesti arrestunud rakke 40 ml 30°C Milli-Q veega ja lahustati värskes YPD vedelsöötmes, mis sisaldas pronaasi (lõppkontsentratsioon 50 µg/ml, *Applichem*) ja hüdroksüureat HU (lõppkontsentratsioon 200 mM, *Hydroxyurea*, *Carbosynth*). Pronaas on proteaas, mis lagundab α -faktorit, mille mõju alt vabanemine võimaldab rakkudel jätkata rakutsükli. HU arrestib rakud varajases S-faasis takistades deoksüribonukleotiidide sünteesi. Aeg arrestumiseni on aga piisav, et jõuaksid käivituda meie huvi pakkuvad kõige varajasemad alguspunktid, mille replikatsioonidünaamikat soovime uurida (ARS305 ja ARS607). Katsega jätkates koguti järgmised ajapunktid 60 ja 120 minutil ning katse lõpus jaotati kogutud proovid kaheks: 1. uuriti läbivoolutsütomeetriaga kinnitamaks rakkude arrestumist G1-faasis, 2. kasutati koopia arvu analüüsil tuvastamaks muutusi replikatsiooni alguspunktide replikatsioonil.

2.2.6.1. Läbivoolutsütomeetria

Kogutud proovid (**ptk 2.2.6**) tsentrifuugiti 10 min, 1700 g, eemaldati etanool, rakuksade suspendeeriti 1 ml 50mM naatriumtsitraadis ning pooled rakud tõsteti edasi uude 1,5 ml eppendorfi tuubi. Seejärel tsentrifuugiti rakke 15 minutit maksimumpöoretel ning supernatant aspireeriti. Kuna läbivoolutsütomeetria analüüsil suhtelise DNA hulga mõõtmiseks kasutatav CYBR® green seondub nii DNA kui RNA-ga, siis töödeldi proove RNA-siga, et vähendada ebaspetsiifilist signaali. Selleks suspendeeriti rakud 1 ml 50 mM naatriumtsitraadis, millele oli eelnevalt lisatud RNaseA (lõppkontsentratsioon 10 µg/ml), sonikeeriti proove 5x30 sek [30 sek sonikeerimist, 30 sek pausi, *Bioruptor*®, (*Diagenode*)] ja inkubeeriti üleöö 37°C.

Järgmisel päeval tsentrifuugiti rakke 10 minutit maksimumpöoretel ja aspireeriti supernatant nii, et alles jääks 100 µl. Seejärel resuspendeeriti proovid alles jäetud supernatandis, lisati CYBR® green [lõppkontsentratsioon 5X(*Applichem*)], segati vorteksil ja asetati 30 minutiks toatemperatuuril pimedasse inkubeerima. Enne läbivoolutsütomeetria lisati rakkudele 300-500 µl 50 mM naatriumtsitraati ja sonikeeriti proove 20 sekundit. Läbivoolutsütomeetria viis

läbi Dimitri Lubenets masinal BD FACSria™ (BD Biosciences). Rakutsükli analüüs viidi läbi läbi programmiga *Flowing software 2.5.1* (Perttu Terho, Turku Biotehnoloogia keskus). Koopia-arvu analüüside ja ChIP katsete FACS graafikud on toodud **lisas 4**.

2.2.6.2. Koopia arvu analüüs

DNA eraldamiseks ajapunktidel kogutud rakkudest (**2.2.3.6**), sadestati naatriumtsitraadis suspendeeritud rakud uuesti põhja tsentrifuugides proove 15 minutit maksimumpööretel ning supernatant aspireeriti. Seejärel lisati rakkudele 500 µl lüüsipuhvrit [10 mM TRIS pH 8,0; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS; 2% TritonX-100 (*Applichem*)], tõsteti uude keeratava korgiga 1,5 ml tuubi (VWR®) ja lisati 300-500 µl klaaskerakesi (0,25-0,5 mm). Rakkude purustamiseks kasutati *Precellys*®24 homogeniseerijat ja programmi 6000 rpm, 3x60 sekundit 4 °C juures. Saadud rakulüsaadi DNA-d puhastati fenool:kloroform meetodil (**ptk 2.2.3.2**) ja DNA sadestati standard etanoolsadestamisega (**ptk 2.2.3.3**). Saadud DNA-d analüüsiti kvantitatiivse PCR-iga (**ptk 2.2.8**).

2.2.7. Kromatiini immunosadestamine

2.2.7.1. Pärimi rakulüsaadi valmistamine

Rakud kasvatati ette sarnaselt läbivoolutsütomeetria (**ptk 2.2.6**) ja fikseeriti peale 3h α-faktoriga arrestimist formaldehüüdiga 12 minutit toatemperatuuril inkubeerides [lõppkontsentratsioon 1% (*AppliChem*)]. Formaldehüüdi neutraliseerimiseks lisati glütsiini [lõppkontsentratsioon 200 mM (*AppliChem*)] ning hoiti veel lisaks 5 minutit toatemperatuuril. Rakud koguti tsentrifuugimisega 1 min 1700 G (4 °C) juures, pesti 2 korda 10 ml jääkülma PBS-iga ning suspendeeriti 1 ml FA lüüsilahuses (4 °C). Rakususpensioon tõsteti edasi uude 1,5 ml tuubi ning tsentrifuugiti 30 sek 5000 g. Alates PBS-iga pesemisest jätkati tööd hoides rakud pidevalt jääl. Kõik kromatiini immunosadestamisel kasutatud lahuste koostised on toodud **lisas 5**.

Lüsaadi valmistamiseks resuspendeeriti rakud 500 µl FA lüüsilahuses, rakususpensioonile lisati 300 µl klaaskerakesi 0,5mm (*BioSpec Products Inc.*) ja rakud purustati hoides neid 15 min väristajal (*Disruptor Genie*™, *Scientific industries*). Lüsaadi eraldamiseks tehti tuubi põhja auk ning asetati uue 2 ml tuubi kohale (4 °C). Järgnes tsentrifuugimine 1 min 1000 G, peale mida lisati proovidele veel 1000 µl FA lüüsilahust, tehti tugev vorteks ja sonikeeriti proove 15 min jäävannis sonikaatoril *Bioruptor*® (*Diagenode*) (30 sek sonikeerimist, 30 sek pausi). Peale tugevat vorteksit tsentrifuugiti proove 15 minutit maksimumpööretel ja tõsteti

kogu-raku-lüsaat (*whole cell lysate*, WCL) uude 1,5 ml tuubi ja kasutati edaspidi kromatiini immunosadestamise katsetes.

2.2.7.2. Immunopretsipitatsioon (IP)

Immunosadestamise katsete tarbeks on Fkh1 valkude C-terminusse liidetud kolmekordne 3F12 epitoop, mida tunneb ära 5E11 antikeha (*Icosagen*). Cdc45 C-terminus sisaldab 3x1E2 epitoopi, mida tunneb ära 1E2 antikeha (*Icosagen*). Enne antikeha lisamist tsentrifuugiti proove 5 minutit maksimumpööretel ja 300µl supernatanti tõsteti uude 1,5 ml tuubi, kuhu lisati 1 µl antikeha (lõppkontsentratsioon 1µg/ml). Proove inkubeeriti üleöö rotaatoril 4°C juures. Järgmisel hommikul tsentrifuugiti proove 15 minutit 4°C maksimumpööretel ja supernatant tõsteti edasi uude 1,5 ml tuubi. Samal ajal valmistati ette proteiiniA-sefaroosi kerakesed [*ProteinA SepharoseTM Fast Flow (GE Healthcare Bio-sciences AB)*]. Selleks pesti kerakesi (15µl ühe proovi kohta) 2 korda 800 µl FA-BSA-ga [BSA, lõppkontsentratsioon 1 mg/ml (*Bovine serum albumine*, BioTop,) + FA lüüsipuhver], 4°C juures rotaatoril segades. Peale supernatandi eemaldamist lisati kerakestele FA-BSA lahust 100 µl proovi kohta, jaotati 90 µl kaupa antikehaga seotud proovidele ja inkubeeriti rootoril 1 h 4°C juures.

Proteiin A kerakesed sadestati tsentrifuugides 1 minut 0,1 G ja supernatant eemaldati ettevaatlikult. Kerakesi pesti järjestikku 1,3 ml FA lüüsipuhvri, FA500, LiCl ning TES pesupuhvriga, iga lahusega 5 minutit rotaatoril 4 °C juures. Antikehi elueeriti 2x lisades proovidele 200 µl elueerimispuhvrit ja inkubeerides 8 minutit 30 °C juures, lõpetades 5 sek 1400 rpm vorteksiga. Formaldehüüdi tekitatud ristseoste lõhkumiseks inkubeeriti proove üleöö 65°C juures. Peale inkubeerimist tõsteti proovid toatemperatuurile jahtuma ja jätkati DNA eraldamisega fenool-kloroform meetodil (**ptk. 2.2.3.2**), millele järgnes etanoolsadestus üleöö, -20 °C (**ptk. 2.2.3.3**).

2.2.8. Kvantitatiivne PCR (qPCR)

Nii kromatiini immunosadestamisel kui koopia-arvu analüüsil saadud DNA-d analüüsiti kvantitatiivse PCR-iga (*LightCycler[®] 480 Real-Time PCR system*, Roche). Reaktsioonid viidi läbi mahus 10 µl [5 µl DNA, 5 µl qPCR segu (2x *SYBRGreen[®] qPCR ROX Mix*, Thermo Scientific), praimerid 0,3 µM]. qPCR programm ja praimerid on toodud **lisas 6**. Igat proovi analüüsiti vastava praimeriga kolmes korduses. Reaktsioonide lävitsükliid (*crossing point*) arvutati kasutades *Lightcycler[®]* tarkvara. Tulemuste analüüsimiseks kasutati relatiivset kvantifitseerimist. Koopia arvu katsete puhul kasutati tulemuste normaliseerimiseks ARS501 väärtusi ning kromatiini immunosadestamise puhul PAU2 väärtusi, seega on

tulemused esitatud sihtmärk lookuse ja normaliseerimise lookuse suhtena, kusjuures koopia arvu katsetes G1-faasi suhe võrdsustati ühega. Andmete analüüsimiseks kasutati *Microsoft Excel*'it.

2.2.9. Anchor-away

Rakud kasvatati üleöö loksutil, 30°C juures, 180 rpm, tiheduseni $5 \cdot 10^6$ rakku/ml. G2-faasi arresti indutseerimiseks lisati söötmesse DMSO-s lahustatud nokodosooli (*ACROS organics*) (lõppkontsentratsioonid 15 µg/ml nokodosooli ja 1% DMSO) ning inkubeeriti rakke 165 minutit loksutil, 30°C juures, 180 rpm. Seejärel indutseeriti Fkh2 transport tuumast välja lisades söötmesse rapamütsiini (lõppkontsentratsioon 1 µg/ml, *Cayman*) ja inkubeeriti rakke veel 15 minutit.

Peale rakkude arrestimist G2-faasis, pesti nokodosool 2x 40 ml autoklaavitud Milli-Q veega maha ning rakkudele lisati uus YPD sööde, mis sisaldas lisaks DMSO-le ja rapamütsiinile ka α-faktorit [rapamütsiin 1 µg/ml, DMSO 1%, α-faktor 100 nM]. Rakke inkubeeriti 3 tundi peale mida koguti esimene ajapunkt (0 min). Rakutsükli arrestist vabastamiseks pesti α-faktor 40 ml Milli-Q veega maha ja rakkudele lisati uus sööde koos rapamütsiini ja DMSO-ga kindlustamaks, et Fkh2 ei liiguks tagasi tuuma. Replikatsioonipunktide aktiveerumise hindamiseks koguti järgmised ajapunktid 60 ja 120 minutil. Rakke töödeldi DNA eraldamiseks fenool-koloroform meetodil (**ptk 2.2.3.2**) ja DNA puhastati standard etanoolsadestamise teel. Tulemusi analüüsiti qPCR-iga (**ptk 2.2.8**).

2.3. Tulemused ja arutelu

Kahe identse genoomi koopia edasi pärandamine on keerulise rakutsükli tulemus. Kui alamad organismid kasutavad oma genoomi replitseerimiseks ainult ühte replikatsiooni alguspunkti, siis tulenevalt eukarüootide suurest genoomist, algab DNA replikatsioon sadadelt kuni tuhandetelt replikatsiooni alguspunktideelt. Kõik replikatsiooni alguspunktid ei saa aga alustada replitseerumist korraga, ning sellest tulenevalt jaotatakse replikatsiooni alguspunktide aktiveerimine üle kogu S-faasi kestuse. Mitmeid replikatsiooniks vajalikke valke on limiteerivas hulgas. Esimeste alguspunktide termineerumisel vabanevad limiteerivad faktorid Cdc45 jt ning need värvatakse hilistele replikatsiooni alguspunktidele, mis saavad seejärel aktiveeruda. Selliselt tagatakse replitseeruvate järjestuste aktiveerumise ajaline kord. Millised valgud ja kuidas seda korda tagavad ei ole siiani päris selge.

Hiljuti demonstreeriti pagaripärmis kahe transkriptsioonifaktori ulatuslikku rolli replikatsiooni koordineerimisel. Forkhead1 ja 2 on valgud, mille deleteerimisel nihkub nende poolt kontrollitavate replikatsiooni alguspunktide ajastus hilisemaks, samal ajal nende poolt repressseeritavad replikatsiooni alguspunktid aktiveeruvad varasemalt kui tavaliselt. Seda, kuidas Fkh1/2 oma rolli replikatsiooni ajastusel täidavad, on püütud seletada mudeliga, mille kohaselt koondab Fkh1/2 replikatsiooni alguspunkte tuumas klastritesse ehk replikatsioonitehastesse, kus hüpoteesi kohaselt on kõrgem kontsentratsioon limiteerivaid faktoreid.

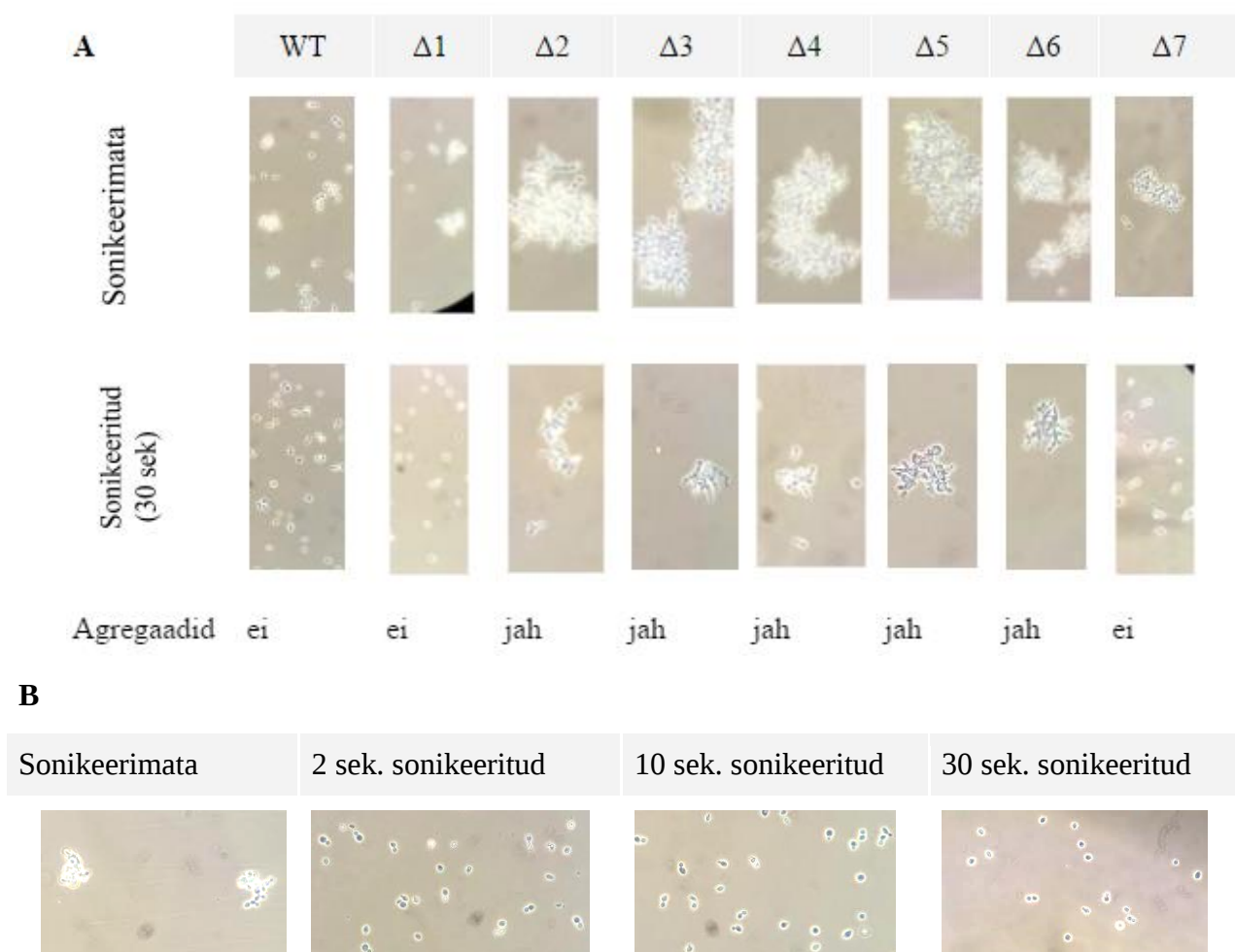
Meie kromatiini töögrupi üheks suunaks on iseloomustada Fkh1 transkriptsioonifaktorit, mis omab mõju varaselt ja hiliselt replitseeruvate replikatsiooni alguspunktide regulatsioonis. Tänapäevaks ei ole teada millised Fkh1 piirkonnad on replikatsioonis avalduvaks rolliks vajalikud ning selleks konstrueeriti käesoleva töö raames erinevaid *FKH1* deletsioonimutante kandvad pärmütüved. Saadud mutantidega viidi läbi koopia-arvu analüüs ning Fkh1 ja Cdc45 kromatiini immunosadestamine.

2.3.1. Fkh2 deleteerimine Fkh1:Δ2–6 tüvedes põhjustab rakkude agreggeerunud kasvu

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutavad erinevad fkh1 deletsioonimutandid replikatsiooni initsiatsiooni ajastust. Selleks konstrueeriti tüved, mis kandsid endas kas metsiktüüpi (wt) või mutantset fkh1 valku (**joonis 9**) ning *fkh2:ΔC*. Fkh2 muteerimine oli vajalik, kuna varasemalt on teada, et *fkh2:ΔC* suudab endiselt reguleerida *CLB2* geeniklastri transkriptsiooni, kuid replikatsiooni roll on takistatud (Reynolds et al., 2003). Tehtud tüvedega viisime läbi meie labori poolt välja töötatud lookuse koopia-arvu analüüsi, kus jälgitakse replikatsiooni alguspunkti sisaldava lookuse kordsuse muutust võrrelduna replitseerumata G1-faasi lookuse DNA kordsusega. Kuna pagaripärmi genoom replitseerub keskmiselt 10 minutiga, tuli varajaste replikatsiooni alguspunktide analüüsimiseks S-faasi progresseerumine peatada varajases S-faasis, kasutades selleks hüdroksüureat. Tehtud tüvedega läbi viidud koopia-arvu analüüs näitas, justkui ei omaks *FKH1* muteerimine replikatsioonile mingit efekti. See viitab, et *fkh2ΔC* suudab replikatsioonil fkh1-te asendada või suudavad muteeritud fkh1/2 koos tagada normaalse replikatsiooni ajastuse varajastel replikatsiooni alguspunktidel. Seetõttu otsustati Fkh2 rakkudest deleteerida, et vältida igasugust Fkh2 poolset komplementeerimist.

Koopia arvu analüüsi katseid ei olnud võimalik sooritada kõikide *fkh1:Δ1–7+ fkh2Δ* mutantsete tüvedega, kuna deletsioonid 2–6 ei kasvanud metsiktüüpi tüvele omase kiirusega ja moodustasid agregaatide, mida polnud võimalik üksteisest eraldada (**joonis 11A**). Kuna rakuagregaatide rakutsükli faasi ei ole võimalik selgelt määratleda, ei tea me rakutsükli arrestumise ja sellest tulenevalt S-faasi sisenemise efektiivsust ning saadud koopia-arvu analüüsi tulemused poleks agregaatide moodustavates tüvedes usaldusväärsed. Tüved Δ1 ja Δ7 agregaatide ei moodustanud ning nendes tüvedes jätkati koopia arvu analüüsiga.

Joonisel 11B on toodud võrdlusena tüvi, mis ei moodusta kasvades agregaatide. Paneelilt B on näha, et rakukobarate eemaldamiseks piisab juba kahest sekundist sonikeerimisest, seega kui mutantset tüved polnud 30 sekundiga üksteisest eraldatavad, kinnitab see veelgi, et need rakud polnud katsetes kasutatavad.

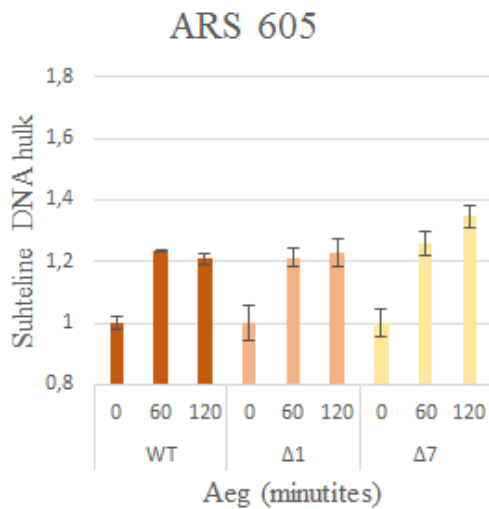


Joons 11. Paneelilt A on näha, et Fkh2 deleteerimine põhjustas *FKH1* mutantsetes tüvedes *fkh1:Δ2–6* rakkude agregeerunud kasvu, mida polnud võimalik elimineerida ka tugeva sonikeerimisega. Paneelilt B on näha, et juba 2 sekundit sonikeerimist on piisav, et normaalse fenotüübiga rakud üksteisest eraldada. See kinnitab, et paneel A deletsioonitüved 2–6, mida sonikeeriti 30 sekundit, polnud üksteisest eraldatavad ja katsetes kasutatavad. Vaadeldud 40X suurendusega.

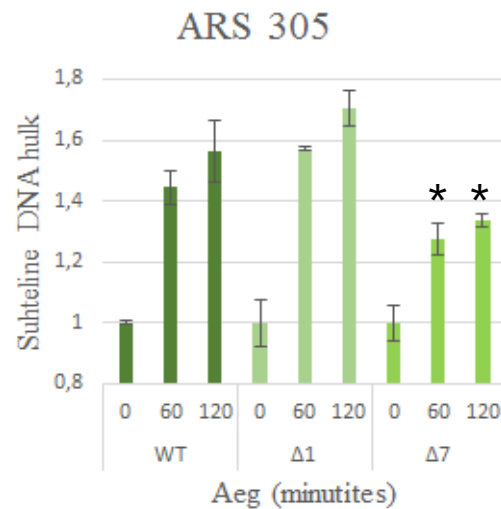
2.3.2. Fkh1 valgu aminohapped 410-484 on vajalikud Fkh1 poolse replikatsiooni regulatsiooni tagamiseks

Koopia-arvu katsetes uuriti kahe Fkh1/2 poolt kontrollitavate replikatsiooni alguspunktide ARS305 ja ARS607 käivitumist võrrelduna Fkh1/2 sõltumatu varajase replikatsiooni alguspunktiga (ARS605). Kogu DNA hulga normaliseerimiseks valiti hiliselt replitseeritav järjestus ARS501, mis antud katse tingimustes ei käivitu, kuna rakud arreteeritakse varajases S-faasis. Koopia arvu analüüsil saadud tulemused on toodud **joonisel 12**. Kuna ARS605 replikatsioon toimub Fkh1/2 sõltumatult, siis erinevate *FKH1* piirkondade deleteerimine ei tohiks selle replitseerumist inhibeerida.

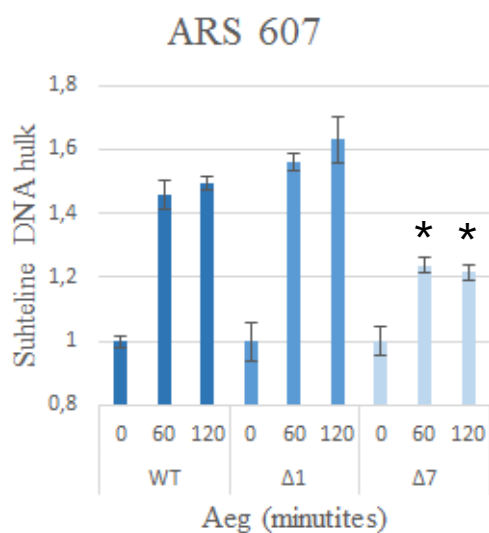
A



B



C



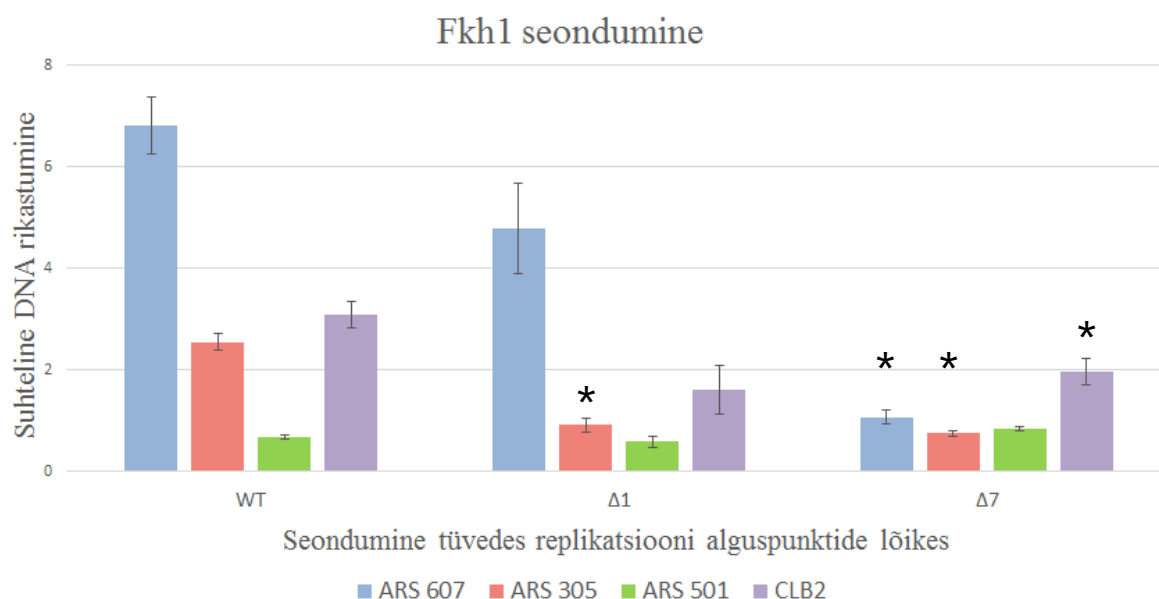
Joonis 12. Koopia-arvu analüüs. Fkh1: $\Delta 7$ on oluline ARS305 ja ARS607 varajaseks aktiveerimiseks. Eksponentsiaalse kasvu faasi rakkude G1 arrest saavutati inkubeerides α -faktoriga 3h ning koguti 0 minuti ajapunkt. Järgnevalt pesti rakkudelt alfa faktor ning suspendeeriti rakud värskes YPD (30°C) söötmes, kuhu oli lisatud Pronaas ning HU. S-faasi jooksul koguti 60 ja 120 minuti ajapunktid. Kogutud ajaproove analüüsiti qPCR-iga kasutades replikatsiooni alguspunkti spetsiifilisi praimereid A (ARS605), B (ARS305) ja C (ARS607) ning normaliseerides sisend DNA kogus ARS501 suhtes. Veapiirid näitavad kolme sõltumatu katse standardviga. * $p < 0.05$ wt sama ajapunkti suhtes.

Tõepoolest, nii WT, *fkh1: $\Delta 1$* kui *fkh1: $\Delta 7$* korral saavutab ARS605 talle omase aktiivsuse, seejuures tüves *fkh1: $\Delta 7$* on märgata koguni ARS605 marignaalset aktiveerumist (**joonis 12 A**). See läheb kokku tulemustega, kus Knott (2012) demonstreeris: FKH1/2 deleteerimisel muutusid kõik tsentromeersed replikatsioonipunktid veelgi varasemateks. Fkh1/2 poolt kontrollitavate replikatsiooni alguspunktide ARS305 (**joonis 12 B**) ja ARS607 (**joonis 12 C**) puhul on aga näha, et seitsmenda piirkonna deleteerimine (aminohapped 410-484) omab nende järjestuste replikatsioonile võrreldes wt tüvega inhibeerivat mõju. Deleteerides Fkh1 valgust aga esimesed 22 aminohapet, säilib selle funktsioon replitseeritavatel järjestustel ning ARS305 ja ARS607 saavutavad oma tavapärase aktiivsuse.

2.3.3. Fkh1: $\Delta 7$ ei suuda seonduda replikatsiooni alguspunktidega ja põhjustab replikatsiooni deregulatsiooni

Kuna deletsioon 7 põhjustas märgatava muutuse replikatsiooni alguspunktide ARS305 ja ARS607 replitseerumisel, siis huvitas meid edasi, kas muutus on tingitud sellest, et muteeritud fkh1 ei suuda seonduda oma konsensusjärjetusele või on häiritud mõne fkh1 vahendatud replikatsioonifaktori värbamine replikatsiooni alguspunktidele.

ChIP katsetest, kus kasutati Fkh1 vastast antikeha on näha, et fkh1: $\Delta 7$ ei seonu enam ARS305 ja ARS607-ga (**joonis 13**) ning see on ka arvatavasti põhjus, miks on nendelt alguspunktidelt ka replikatsiooni toimumine vähenenud. Need tulemused lähevad kokku varasemate andmetega, kus näidati, et FKH1/2 deleteerimisel hilines ARS607 ja ARS305 replikatsioon (Knott et al., 2012). Sellest tulenevalt võib järeldada, et fkh1 aminohapete 410-484 deleteerimine võib põhjustada pärmis nullmutandile omast replikatsiooniprofiili ning viitab selgelt sellele, et need aminohapped on Fkh1 jaoks määrava tähtsusega, et säiliks selle funktsioon replikatsiooni alguspunktidel.



Joonis 13. Fkh1 kromatiini immunosadestamine. *Fkh1*: $\Delta 7$ on vajalik tagamaks Fkh1 seondumise replikatsiooni alguspunktidega. Eksponentsiaalse kasvu faasi rakkude G1 arrest saavutati inkubeerides rakke α -faktoriga 3h. Puhastatud DNA analüüsiti qPCR-iga, kasutades replikatsiooni alguspunktide spetsiifilisi primereid ARS607 (sinine), ARS305 (punane) ja negatiivseks kontrolliks ARS501 (roheline). Lisaks kontrolliti, kas fkh1 suudab seonduda ka *CLB2* promootorile (lilla). Ühega on võrdsustatud rikastumine ilma antikehata *CHIP*'is. Veapiirid näitavad kolme iseseisva katse standardviga. * $p < 0.05$ wt sama ajapunkti suhtes.

Mõningal määral on *fkh1* seondumine vähenenud ka *fkh1:Δ1* tüves (**joonis 13**), kuid replikatsiooni alguspunktid aktiveeruvad nagu wt Fkh1 puhul. Seega osaline *fkh1* seondumise vähenemine ei põhjusta veel replikatsiooni deregulatsiooni (**joonis 12**), ning *fkh1:Δ1* fenotüüp demonstreerib jällegi Fkh1/2 keerukat toimemehhanismi replikatsioonis. Eelnevalt on näidatud, et Fkh1 vajab replikatsiooni alguspunktidega interakteerumiseks kahte konsensus saiti ning juba neist ühe muteerimine vähendab Fkh1 seondumist ning kaotab regulatsiooni (Reinapae 2017).

Lisaks varajaste replikatsiooni alguspunktide regulatsioonile omavad Fkh1/2 rolli ka *CLB2* klatri geenide transkriptsiooni regulatsioonil. See geeniklaster kodeerib ühtlasi Clb2 valku, mille roll on reguleerida rakkude G2/M-faasi üleminekut. Clb2 regulatsiooni puudumise tagajärjel kasvavad rakud pikaks ja moodustavad suuri agregate (Hollenhorst et al., 2000). Sellist fenotüüpi põhjustas ka Fkh1 aminohapete 23-409 deleteerimine ($\Delta 1$: 1-22; $\Delta 2$: 23-92; $\Delta 3$: 93-171; $\Delta 4$: 172-292; $\Delta 5$: 293-344; $\Delta 6$: 345-409; $\Delta 7$: 410-484) tüvedes *fkh1:Δ2-6+fkh2Δ*, mille tulemusena ei saanud neid katsetes kasutada. *Fkh1:Δ1+fkh2Δ* ja *fkh1:Δ7+fkh2Δ* suudavad kasvada probleemideta ja seonduda *CLB2* promootorile (**joonis 13**), seega aminohapped 2-22 ($\Delta 1$) ja 410-484 ($\Delta 7$) ei ole olulised Fkh1 vahendatud *CLB2* klatri ekspressiooniks, samas aga aminohapped 23-409 on selleks hädavajalikud.

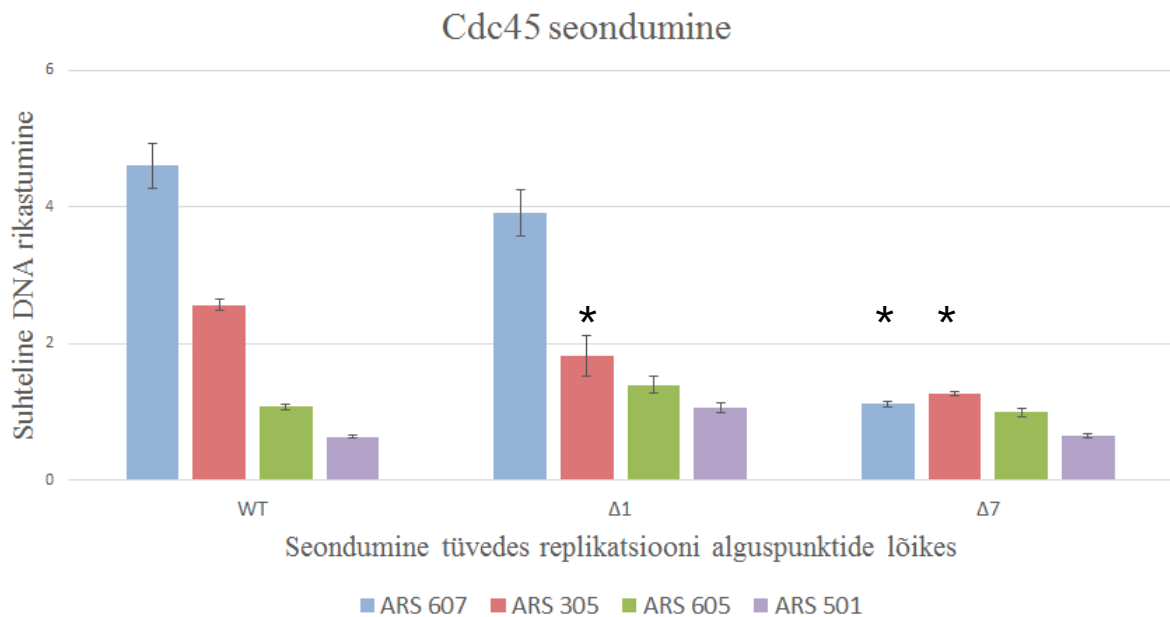
Saadud tulemused lähevad kokku ka hiljuti avaldatud tööga, kus uuriti erinevate Fkh1/2 piirkondade mõju *CLB2* klatri geenide transkribeerimisele (Shi, 2016). Nii Fkh1 kui Fkh2 sisaldavad FHAD ja DBD domääni. Varasemalt on teada, et Fkh2 moodustab *CLB2* klatri geenide promootoril Mcm1-ga ternaarse kompleksi ning selleks on vajalik Fkh2 valgu piirkond, mis jääb FHAD-i ja DBD vahele, kattudes osaliselt DBD järjestusega (FHAD-DBD). Fkh1 ternaarset kompleksi ei moodusta, kuid seda on võimalik indutseerida, kui asendada Fkh1 FHAD-DBD piirkond Fkh2 vastava järjestusega. Ainult DBD asendamine kompleksi moodustamist ei toetanud, seega ternaarse kompleksi moodustumiseks on vajalik kindlasti DBD koos sellest ülesvoolu jääva järjestusega, mis Fkh1 valgul puudub ning sellest tulenevalt funktsioneerib Fkh1 *CLB2* promootoril teise mehhanismi alusel kui Fkh2 (Shi, 2016). Samades katsetes ei mõjutanud FHAD domääni deleteerimine Forkheadide seondumist promootorile, kuigi oli mõnevõrra nõrgem. See võib viidata sellele, et FHAD stabiliseerib Fkh1/2 transkriptsioonifaktoreid *in vivo*. Võimalik, et deletsioonimutantide 2 ja 3 korral oli replikatsiooni aktivatsioon samuti häiritud, kuna FHAD piirkond oli mõlemas osaliselt deleteeritud ning *fkh1* oli ebastabiilne. (Shi, 2016)

Nendest katsetest tuli ühtlasi välja, et Fkh1 võib Clb2 promootorile seonduda hoopis läbi kolmanda valgu. Kui Fkh2 ja Clb2 vahel leiab FHAD piirkonna vahendusel aset otsene interaktsioon, siis Fkh1-Clb2 vahel otsest interaktsiooni ei esine, kuigi immunosadestamise analüüsis on nende oletatav interaktsioon täheldatav (Shi, 2016). Need tulemused võivad seletada, miks ei suuda fkh1 deletsioonimutandid Fkh2 puudumisel *CLB2* transkriptsiooni käivitada. FHAD piirkonna puudumisel ei suuda fkh1 seonduda arvatava lisavalguga, FHAD ja DBD vahelise ala erinevus Fkh2 järjestusest ei võimalda ka *wt* valgul funktsioneerida ning lõpuks DBD piirkonna puudumisel ei suuda mutandid seonduda.

2.3.4. Fkh1 valgu aminohapped 410-484 on vajalikud Cdc45 värbamiseks

Cdc45 on replikatsiooni toimumise seisukohalt oluline valk, mille deleteerimine mõjub rakkudele letaalselt (Zou et al., 1997). Cdc45 on hädavajalik nii replikatsiooni initsiatsioonil kui ka elongatsioonil. Koos GINS ja Mcm2–7 kompleksiga moodustab ta replikatsiooni alguspunktidele CMG kompleksi (Cdc45/Mcm2–7/GINS), mille tulemusena toimub helikaasi aktiveerimine. Kuna Cdc45 on rakkudes ekspresseeritud limiteerival hulgal ning seondub replikatsiooni alguspunktidega küllaltki nõrgalt, tekib küsimus, kas alamhulgale replikatsiooni alguspunktidele võimaldatakse teadmata mehhanismi läbi soodsam olukord Cdc45 värbamiseks?

Knott'i läbi viidud ChIP analüüs näitas, et Cdc45 seondub G1-faasis paljude varajaste replikatsiooni alguspunktidega ning see seondumine kattub Fkh1/2 poolt reguleeritavate alguspunktidega nagu ARS607 ja ARS305. Kuna *FKH1/2 Δ* rakkudes on Cdc45 seondumine oluliselt langenud, annab see alust arvata, et Fkh1/2 võivad olla vastutavad Cdc45 eelisjärjekorras seondumise eest varajastel replikatsiooni alguspunktidel. Sellest tulenevalt tekkis küsimus, kas deletsiooni 7 poolt põhjustatud muutus ARS305 ja ARS607 replikatsiooni aktiivsuses (**joonis 12**), võib olla põhjustatud häiritud Cdc45 värbamisest replikatsiooni alguspunktidele. Hüpoteesi kontrollimiseks viisime Cdc45 ChIP katse läbi *wt* ning *fkh1:Δ1* ja *fkh1:Δ7* tüvedes. Puhastades Fkh1 ja Cdc45 külge seotud DNA ja analüüsides seda kvantitatiivse PCR-iga, võimaldas see hinnata, mil määral on selle valgu seondumine muutunud.

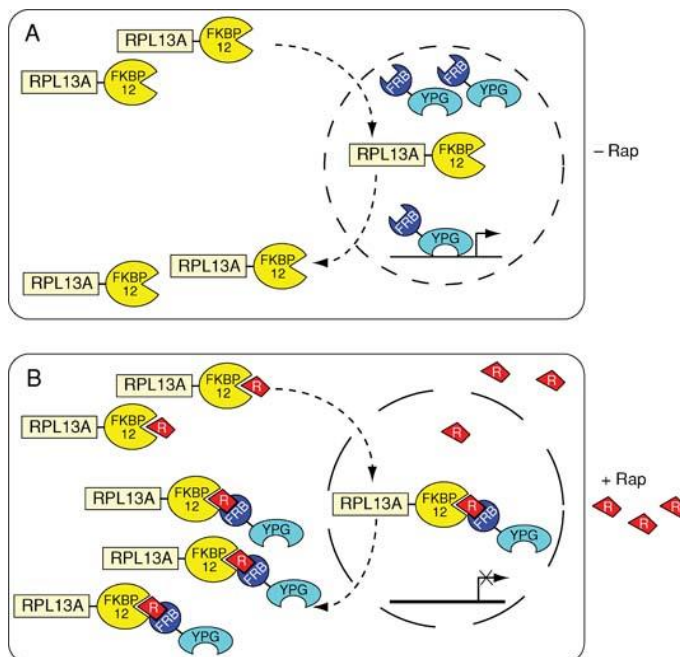


Joonis 14. Cdc45 kromatiini immunosadestamine. Fkh1:Δ7 ei suuda toetada Cdc45 värbamist replikatsiooni alguspunktile. Eksponentsiaalse kasvu faasi rakkude G1 arrest saavutati inkubeerides rakke α-faktoriga 3h. Puhastatud DNA analüüsiti qPCR-iga kasutades replikatsiooni alguspunktide spetsiifilisi praimereid ARS607(sinine), ARS305(punane). Negatiivseks kontrolliks on ARS605 (roheline) ja ARS501 (lilla). Ühega on võrdsustatud rikastumine ilma antikehata CHIP'is. Veapiirid näitavad kolme iseseisva katse standarddviaga. * $p < 0.05$ wt sama ajapunkti suhtes.

Cdc45 ChIP katsed näitavad, et fkh1:Δ1 seondub replikatsiooni alguspunktidele ARS305 ja ARS607-l wt-ga sarnasel tasemel, samas kui fkh1:Δ7 tüves Cdc45 seondumine nendele replikatsioonisaitidele puudub (**joonis 14**) See tähendab, et fkh1:Δ7 ei suuda G1-faasis CMG koosseisu kuuluvat Cdc45-d pre-replikatsioonikompleksidele tuua ning selle tagajärjel ei suuda need alguspunktid enam varajases S-faasis replikatsiooni alustada (**joonis 12**). Tehtud katsed näitavad selgelt, et aminohapped 410-484 on hädavajalikud Fkh1 toimimiseks replikatsiooni masinavärgis, kuid mitte transkriptsioonis, kuna fkh1:Δ7 ei moodustanud kasvades agregate. Lisaks seondub fkh1:Δ7 Clb2 promootorjärjestusele samal tasemel kui wt tüves.

2.3.5. *FKH1* esimesest 22-st aminohappest allavoolu järjestuste deleteerimine põhjustab häireid replikatsiooni toimumises

Paljud tuumas lokaliseeruvad valgud omavad olulisi rolle replikatsioonis, transkriptsioonis ja DNA reparatsioonis. Seetõttu võib osutuda nende valkude uurimine keeruliseks, kuna vastavad mutandid pole eluvõimelised. Selliste mutantide uurimiseks on aga välja töötatud *anchor-away* meetod, mis võimaldab valgu konditsionaalset tuumast välja transportimist. Süsteem põhineb rapamütsiini siduvate valkude Fkbp12 ja mTOR-i FRB domääni võimel rapamütsiini vahendusel dimeriseeruda (**joonis 15**).



Joonis 15. *Anchor-away* skeem. Rapamütsiiniga indutseeritav valkude tuumast välja transportimine (A) Kui keskkonnast puudub rapamütsiin, siis ribosomaalse ankurvalgu Rpl13A-Fkbp12 ja FRB-sihtmärkvalku vahel interaktsiooni tekkida ei saa ning sihtmärkvalk jääb tuuma. (B) Kui rakkude kasvukeskkonda lisatakse rapamütsiini, võimaldab see rapamütsiini vahendusel ankurvalgu Rpl13A-Fkbp12 ja FRB-sihtmärkvalku vahelise kompleksi teket ning sihtmärkvalku transporditakse ribosoomide kokkupaneku käigus ankurvalkudega tsütoplasmasse. (Fan et al., 2011)

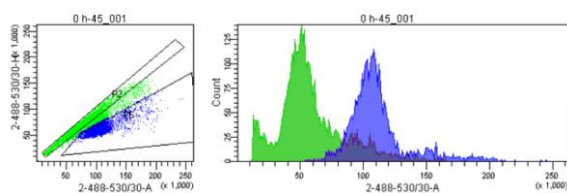
Katses seotakse Fkbp12 ankurvalguga, milleks on ribosomaalne Rpl13A ning FRB liidetakse sihtmärkvalku kodeeriva osaga. Ribosoomide kokkupaneku käigus ühinevad ribosoomi valgud, sealhulgas Rpl13A ning Fkbp12, mis seejärel tuumast välja transporditakse. Kui rapamütsiini rakkude kasvukeskkonda ei lisata, siis sihtmärk-FRB kompleks ei interakteeru Fkbp12-ankurvalgu kompleksiga ning soovitud valgu tuumast välja ei transpordita. Juhul kui rakkudele aga lisatakse rapamütsiini, seondub FRB-sihtmärkvalku kompleks rapamütsiini vahendusel Fkbp12-ankurvalgu Rpl13A kompleksiga ning moodustunud ternaarne kompleks transporditakse tuumast välja. (Haruki et al., 2008)

Tüvedes *fkh1:Δ2-6+fkh2Δ*, moodustasid rakud agregate, kuna *CLB2* klatri geenide regulaatorid puudusid (Fkh2) või olid kaotanud oma töövõime (Fkh1) (Hollenhorst et al., 2000). Kuna varasema kirjanduse põhjal on teada, et Fkh2 reguleerib *CLB2* klatri geenide transkriptsiooni G2-faasis, võimaldas see luua meil katsesüsteemi, kus laseme Fkh2-l oma transkriptsioonifaktori rolli G2-faasis täita ning arrestime rakud M-faasis nokodasooliga. Seejärel eemaldame funktsionaalse FKH2-FRB (FRB on liidetud Fkh2 C-terminusega) tuumast *anchor-away* meetodil, laseme rakkudel liikuda G1-faasi, kus arrestime nad sünkroniseerimiseks uuesti ning kogume koopia arvu analüüsiks esimese ajapunkti. Replikatsiooni toimumise hindamiseks võimaldame seejärel rakkudel siseneda S-faasi ning kogume järgmised ajapunktid 60 ja 120 minutil.

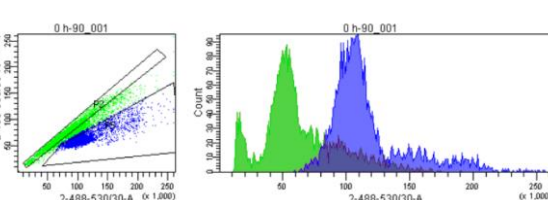
Tüves *fkh2Δ*+ FKH1-FRB töötati välja protokoll, mis võimaldab Fkh transporti tuumast välja viisil, mis ei tekita agregeerunud rakke ja võimaldab rakkudel alustada replikatsiooni. Selleks, et teha kindlaks kuna on õige aeg Fkh2 tuumast välja transportimiseks, arrestiti rakud M-faasis nokodasooliga. Viimane takistab mikrotuubulite polümeriseerumist ning seeläbi mitoosikävi moodustumist M-faasis ning rakutsükkel jääb selle tulemusena pidama. Kolmetunnise arrestimise jooksul lisati rakkudele erineval ajahetkel (45, 90, 135, 150 ja 165 minutil) rapamütsiini, mis indutseeris Fkh2 transpordi tuumast välja. Seejärel eemaldati nokadasool rakkudelt, säilitades Fkh2 väljutamine tuumast rapamütsiiniga, ning indutseeriti α -faktoriga G1 faasi arrest. 3 tunni möödudes lubati rakud sünkroonselt S faasi ning koguti ajapunkte, mida iseloomusati FACS-i ja lookuste kordsuse jälgimisega (koopia-arvu analüüs).

Rakutsükli analüüsil läbivoolutsütomeetriaga on oluline eristada üksikuid ja kokku kleepunud rakke, kuna viimased annavad rakutsükli kohta valeinformatsiooni. Näiteks G1-faasis arrestunud rakkude DNA hulk peaks olema 1n, siis vastavalt kaks kokku kleepunud G1 rakku loetakse FACS analüüsil G2/M faasi rakkudeks, kuna fluorestsentsi intensiivsus, mille järgi DNA hulka hinnatakse, on kahekordne (2n). Et selliseid eksitavaid tulemusi vältida, on välja töötatud analüüs, mille järgi eristatakse üksikuid ja kokku kleepunud rakke hinnates fluorestsentsi tugevust ja kestust vastavalt rakkude suurusele. Eeldatavast tulemusest kõrvale kalduvad rakud langevad fluorestsentsi tugevuse ning rakkude suuruse lineaarsest suhtest kõrvale ning on selle tulemusena lihtsalt eristatavad (Wersto et al., 2001). **Jooniselt 16** on kujutatud FACS graafikud, kus on märgitud kaks populatsiooni rakke. Rohelisega on märgitud üksikrakud ning sinisega on märgitud agregeerunud rakud.

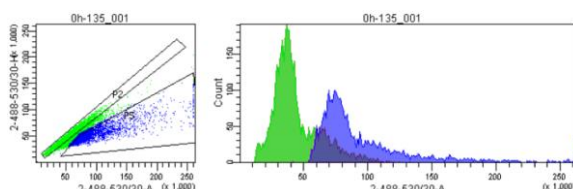
A Rapamütsiin lisati 45 minutil



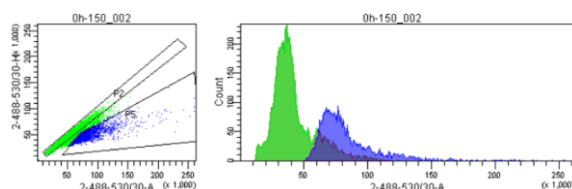
B Rapamütsiin lisati 90 minutil



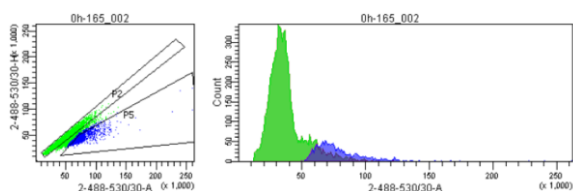
C Rapamütsiin lisati 135 minutil



D Rapamütsiin lisati 150 minutil



E Rapamütsiin lisati 165 minutil



Agregeerumata rakud

Agregeerunud rakud

X telg- rakkude arv

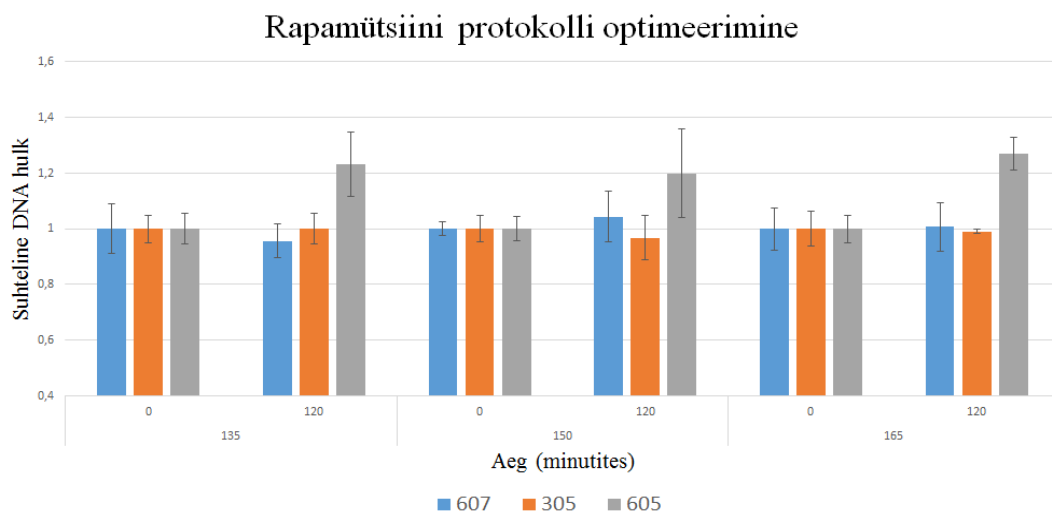
Y telg- fluorestsentsi intensiivsus

Joonis 16. Agregeerunud rakkude populatsioon on väiksem kui rapamütsiin lisatakse rakkudele 165 minutit peale nokodasooli lisamist. Agregeerunud rakkude tekkimise vältimiseks kasutati Fkh2 tuumast välja transportimiseks G2 faasis *anchor-away* süsteemi. Eksponeentsiaalse kasvu-faasi rakkude G2 arrest saavutati inkubeerides rakke 3h nokodasooliga. Fkh2 eksport tuumast tsütoplasmasse indutseeriti rapamütsiini lisamisega 45 (A), 90 (B), 135 (C), 150 (D) ja 165 (E) minutit peale nokodasooli lisamist. Peale G2 arresti pesti nokodasool rakkudelt maha ning rakud suspendeeriti värskes YPD (30°C) söötmes, kuhu oli lisatud G1 faasi arretsimise indutseerimiseks α -faktorit. Peale 3h inkubeerimist fikseeriti 1 ml rakke etanoolis, DNA värviti SYBR-Greeniga (*Thermo Fisher*) ning analüüsiti läbivoolutsütomeetriaga. Üksik-rakud on toodud roheliselt, agregeerunud rakud on näidatud siniselt.

Kõige vähem agregaate tekkis, kui rakkudele lisati rapamütsiini 165 minutit peale nokodasooli lisamist (**joonis 16 E**), viidates sellele, et Fkh2 eemaldati tuumast peale Clb2 transkriptsiooni aktiveerimist. 165-ndal minutil on näha, et valdav osa rakkudest on G1-faasis ning agregeerunud rakkude populatsioon on tühine võrreldes G1 populatsiooniga. Selline rakususpensioon on sobilik kasutamiseks meie lookuse kordsuse analüüsil, kuna saame olla kindlad rakkude sünkroniseerimises. Järgmiseks oli vaja määrata, kas rakud on võimelised peale sellist stressi liikuma ka sünkroonselt S-faasi.

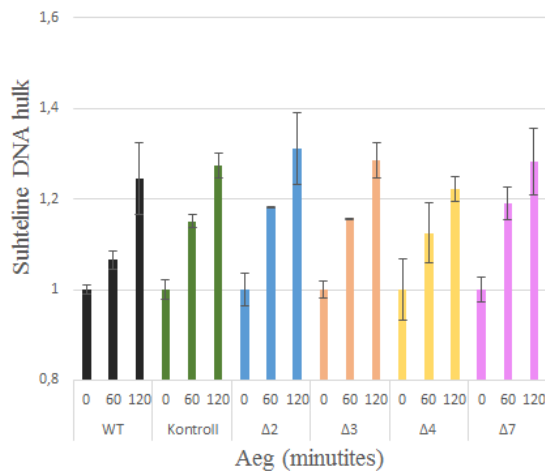
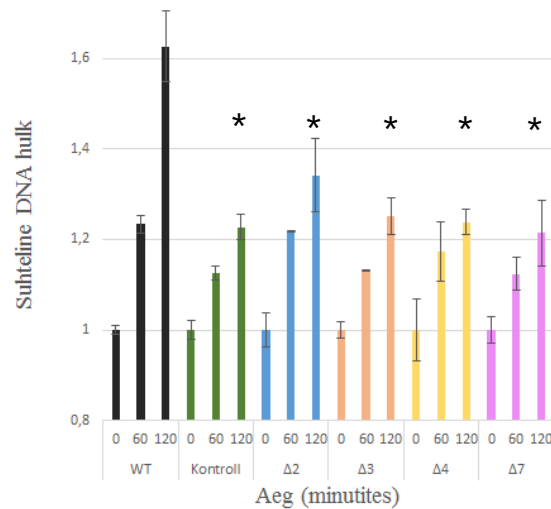
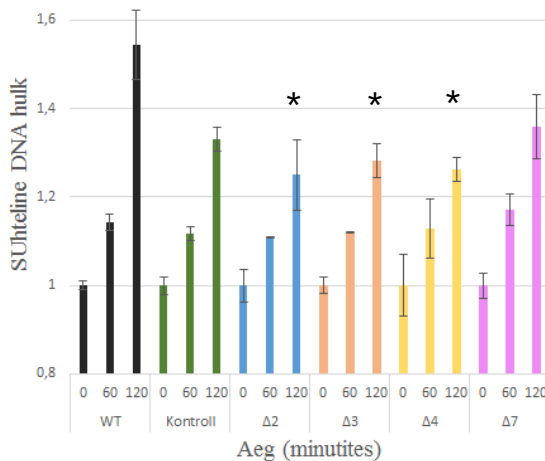
Selleks et hinnata rakkude võimet liikuda peale rakutsükli arretsimisi edasi S-faasi kasutati tüve, millest Fkh2 oli deleteeritud ning Fkh1 transport tsütoplasmasse indutseeriti

rapamütsiini lisamisega. Tüve genotüübi järgi ei tohiks Fkh1/2 poolt reguleeritavad replikatsiooni alguspunktid meie katses replitseeruda ja Fkh1/2 sõltumatu replitseeruva järjestuse ARS605 replikatsioon ei tohiks olla häiritud. Koopia-arvu analüüsi järgi käivitub 165-ndal minutil ainult ARS605 (**joonis 17**), mis kinnitab, et rakud elavad arrestimised üle ning suudavad edukalt siseneda S-faasi.



Joonis 17. Koopia-arvu analüüs. *Anchor-away* nokadasooliga ja alfa faktoriga arrestitud rakud suudavad edukalt siseneda S-faasi. Eksponentsiaalse kasvu-faasi rakkude G2 arrest induseeriti 3h nokodasooli inkubeerimisega. Fkh1 eksport tuumast tsütoplasmasse indutseeriti rapamütsiini lisamisega 135, 150 ja 165-ndal minutil (ajapunktid 45 ja 90 pole toodud). Peale G2 arresti pesti nokodasool rakkudelt maha ning rakud suspendeeriti värskes YPD (30°C) söötmes, kuhu oli lisatud G1 faasi arrestimise indutseerimiseks α -faktorit. Peale 3h inkubeerimist võeti 0 ajaproov ja rakutsükli jätkamiseks pesti rakkudelt α -faktor maha. Järgnevalt suspendeeriti rakud värskes YPD (30°C) söötmes, kuhu oli lisatud Pronaas ning HU. S-faasi jooksul koguti 60 ja 120 minuti ajapunktid ning kogutud ajaproove analüüsiti qPCR-iga kasutades replikatsiooni alguspunkti spetsiifilisi praimereid ARS605 (hall), ARS305 (oranž) ja ARS607 (sinine) ning normaliseerides sisend-DNA kogus ARS501 suhtes. Veapiirid näitavad kolme iseseisva katse standardviga.

Sobiva protokoll olemasolul sai edasi liikuda eesmärgi suunas ja iseloomustada Fkh1 deletsioonimutante *fkh1Δ*: 2, 3, 4, 7+Fkh2-FRB. Kuna deletsioon 7 pakub meile kõige rohkem huvi, tehti ka sellest *anchor-away* tüvi ning vaadeldi replikatsiooni alguspunktide replitseerumist. Katseks kasutati välja töötatud protokoll (**joonis 16 ja 17**) ning 0, 60 ja 120 minuti ajapunkte analüüsiti tavapärase koopia-arvu analüüsi meetodil (**joonis 18**).

A**ARS 605****B****ARS 305****C****ARS 607**

Joonis 18. Koopia-arvu analüüs. Fkh1 aminohapped on 23–409 on vajalikud ARS607 ja ARS305 varajaseks replitseerumiseks. Eksponentsiaalse kasvu-faasi rakkude G2 arresti induseerimiseks inkubeeriti rakke 3h nokodasooliga. Fkh2 eksport tuumast tsütoplasmasse indutseeriti rapamütsiini lisamisega 165-ndal minutil. Peale G2 arresti pesti nokodosool rakkudelt maha ning rakud suspendeeriti värskes YPD (30°C) söötmes, kuhu oli lisatud G1 faasi arrestimise indutseerimiseks α -faktorit. Peale 3h inkubeerimist võeti 0 ajaproov ja rakutsükli jätkamiseks pesti rakkudelt α -faktor maha. Järgnevalt suspendeeriti rakud värskes YPD (30°C) söötmes, kuhu oli lisatud Pronaas ning HU. S-faasi jooksul koguti 60 ja 120 minuti ajapunktid ning kogutud ajaproove analüüsiti qPCR-iga kasutades replikatsiooni alguspunkti spetsiifilisi primereid **A**(ARS605), **B**(ARS305) ja **C**(ARS607) ning normaliseerides sisend DNA kogus ARS501 suhtes. Veapiirid näitavad kolme iseseisva katse standardviga. * $p < 0.05$ wt sama ajapunkti suhtes.

Tulemustest (**joonis 18**) selgub, et *FKH1* piirkondade 2, 3, 4, deleteerimine vähendab replikatsiooni alguspunkti aktiivsuse $\Delta 7$ tasemeni, milles replikatsiooni alguspunktide aktivatsiooni põhimõtteliselt enam ei toimu (**joonis 12**). See langeb ühtlasi kokku kontrolltüvega, kust *FKH1* puudub ning Fkh2 on *anchor-away* meetodil rakutuumast välja transporditav ning mille tulemusena moodustub nullmutant. Antud katsest järeldub, et

fragmendid 2, 3, 4 ja 7 on olulised nii Fkh1 seoselise replikatsiooni regulatsiooniks kui ka Clb2 transkriptsiooni aktiveerimisel, kuna vastavad mutandid ei suutnud Clb2 peamise aktivaatori Fkh2 puudumisel seda asendada ning regulatsiooni säilitada.

Käesoleva töö tulemused on andnud suuna *FKH1* erinevate järjestuspiirkondade detailsemaks uurimiseks. Seitsme deletsioonimutandi põhjal saab teha esimesed järeldused, millised piirkonnad *FKH1*-s on vajalikud, et tagada Fkh1 poolne replikatsiooni alguspunktide regulatsioon. Kuigi kõigi mutantidega ei õnnestunud kahjuks Fkh1 ja Cdc45 kromatiini immunosadestamist teha, siis koopia-arvu analüüsi ja ChIP tulemused seitsmenda mutandiga ($\Delta 410\text{--}484$ ah) annavad alust arvata, et deletsioonide korral väheneb Fkh1 võime seonduda replikatsiooni alguspunktidega ning seetõttu toimub ka olulise replikatiivse helikaasi komponendi Cdc45 värbamine puudulikult. See aga omakorda mõjutab oluliselt replikatsiooni toimumist ning saadud koopia-arvu analüüsi tulemused näitavadki, et replikatsioon on tugevalt pärsitud. Replikatsiooni toimumise tase langeb sarnaselt nii deletsioon seitsme kui deletsioonide 2, 3 ja 4 korral, mis annab alust arvata, et ka nende mutantide korral on Fkh1 ja Cdc45 seondumine replikatsiooni alguspunktidele häiritud. Kuna Cdc45 värbamine oli tugevalt seotud Fkh1 seondumisega, on see oluline tulemus kinnitamaks varasemalt välja pakutud hüpoteesi, et Fkh1/2 poolne varajaste replikatsioonipunktide aktiveerimine võib tuleneda sellest, et Fkh1/2 seovad või soodustavad Cdc45 värbamist replikatsioonipunktidele.

Järgmise sammuna tulebki antud küsimusele vastus leida, kuna pole välistatud, et Fkh1 võib funktsioneerida ka mõne teise valgu- või valgukompleksiga ning Fkh1 puudulik seondumine või mõne konkreetse piirkonna deleteerimine, võib seda interaktsiooni häirida.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli kirjeldada Forkhead 1 transkriptsioonifaktori erinevate piirkondade olulisust replikatsiooni ajastuse tagamisel läbi seitsme erineva *Fkh1* deletsioonimutandi. Muutuste hindamiseks, mis leidsid aset uuritavate replikatsiooni alguspunktide replitseerumise tasemes, kasutati kromatiini immunosadestamist ja meie laboris välja töötatud koopia arvu analüüsi. Replikatsiooni toimumist hinnati kahe *Fkh1/2* poolt kontrollitava replikatsiooni alguspunkt põhjal – ARS607 ja ARS305 ning kontrollina kasutati *Fkh1/2* poolt mitte aktiveeritavat replikatsioonipunkti ARS605 ning hilist replikatsioonipunkti ARS501. Erinevate *FKH1* deletsioonimutantide iseloomustamiseks konstrueeriti kõigepealt tüved, kus *FKH1* oli muteeritud ja *FKH2* C-terminus oli osaliselt deleteeritud, vältimaks *fkh1* kompenseerimist replikatsioonil. Esimesed tulemused aga näitasid, et *fkh2:ΔC* suudab siiski *fkh1*-te replikatsioonil asendada ning seetõttu otsustati *Fkh2* tüve genoomist deleteerida.

Alustades järgmiste tüvedega katseid selgus, et *Fkh2* deleteerimine põhjustab rakkudele kasvudefekte. Kuna *Fkh2* on siiski oluline valk rakutsüklilis vajalike geenide transkriptsiooni aktivatsioonis, põhjustas *FKH2* deleteerimine rakkude agregeerunud kasvu. Samuti ei suutnud ka muteeritud *fkh1* deleteeritud *Fkh2*-te selles asendada. Nendest tüvedest kasvasid *wt* tasemel vaid deletsioonimutant 1 ja 7, mis viitab, et nende piirkondade puudumine ei pärsi *Fkh1* rolli rakutsüklilis oluliste geenide transkriptsiooni aktivatsioonis. Nende kahe deletsioonimutandiga läbi viidud koopia-arvu katsed ja kromatiini immunosadestamise tulemused näitasid, et deleteerides *fkh1* valgust viimased 74 aminohapet ($\Delta 7$), põhjustab see tugevat replikatsiooni deregulatsiooni nendel replikatsiooni alguspunktidel, mis on *Fkh1* poolt reguleeritavad. Samas esimesed 22 aminohapet ($\Delta 1$) ei näi olevat olulised ka replikatsiooni ajastuse tagamisel, kuna replikatsioon toimus sarnaselt *wt* rakkudele. Ka *Cdc45* ja *fkh1* kromatiini immunosadestamise tulemused olid koopia-arvu tulemustega kooskõlas ning näitasid, et viimaste aminohapete deleteerimine pärsib olulisel tasemel *fkh1* ja *Cdc45* värbamist replikatsiooni alguspunktile. Esimese 22 aminohappe deleteerimine küll põhjustas osalise languse *fkh1* seondumises, kuid *Cdc45* seondumine oli piisavalt tugev, et tagada replikatsiooni alguspunktide normaalsel tasemel aktiveerimine.

Agregeeruvate mutantide uurimiseks loodi ka kolmandad tüved, kus kasutati *anchor-away* meetodit, et *Fkh2* tuumast eemaldada peale seda, kui rakutsüklilis oluliste geenide transkriptsioon on aktiveeritud. Nende tüvedega läbi viidud koopia-arvu analüüs näitas, et kõik need deleteeritavad piirkonnad on vajalikud *Fkh1* funktsiooni tagamiseks replikatsiooni

alguspunktidel, kuna vastavate deletsioonimutantide puhul oli kõigi uuritud Fkh1 poolt kontrollitavate replikatsiooni alguspunktide aktiveerumine pärsitud.

Edasiste katsetega on eesmärk vaadelda erinevates fkh1 mutantide tüvedes Cdc45 seondumise dünaamikat läbi S-faasi. Selle eesmärk on teada saada, kas mõne mutandi korral on Cdc45 replikatsiooni alguspunktidele seondumise aeg muutunud, mis võib omakorda seletada väikest kuid olulist langust replikatsiooni ajastuses vaadeldud replikatsioonipunktidel. Pole ka välistatud, et mõni neist piirkondadest vahendab interaktsioone, mida pole veel kirjeldatud.

Kokkuvõttes näitavad tulemused aga selgelt, et *FKH1* ei talu järjestuses mutatsioone ning tulemuseks on replikatsiooni aktivatsiooni deregulatsioon Fkh1 poolt kontrollitavatel järjestustel ning koos fkh1 seondumise vähenemisega, värvatakse replikatsiooni alguspunktidele ka hädavajalik Cdc45 oluliselt halvema efektiivsusega. See omakorda tugevdab arusaama, et Cdc45 seondumine replikatsiooni alguspunkidega on Fkh1 sõltuv.

Characterization of Forkhead transcription factor 1 in DNA replication initiation in *Saccharomyces cerevisiae*

Kairi Koppel

SUMMARY

Chromatin structure and organization influence most every genomic process and modifications in one area inevitably alters other processes. To function concurrently, fundamental processes such as DNA replication and transcription must be coordinated to preserve genome stability and integrity. Chromosomal DNA replication is governed primarily through regulation of replication initiation at origins. Not all replisomes initiate replication synchronously at the onset of S-phase. Instead, a subset of pre-replication complexes initiate replication early while clustering into foci, each containing multiple replisomes, that constitute replication factories. Recently, a group of researchers identified the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factors Forkhead 1(Fkh1) and Forkhead 2 (Fkh2) as being required for the clustering of a subset of replication origins in G1 phase and for the early initiation of these origins in the ensuing S phase. How Fkh1 and Fkh2 promote clustering is partly unclear but it is shown that one possible way is through dimerisation of Fkh1.

One aim of this work was to determine parts of *FKH1* that contribute to its function ensuring early replication of subset origins. To accomplish this, we made seven different deletions in Fkh1 ORF and observed changes in replication timing focusing on Fkh1/2 controlled origins that replicate most early on S phase. By synchronizing cells in G1 phase and then allowing them enter into S phase in the presence of hydroxyurea, we determined changes in DNA copy number compared to wild type strain by using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). This enabled us to determine which part of Fkh1 plays most important role on replication timing, thus which parts are responsible in ensuring early replication. Also we conducted chromatin immunoprecipitation analyses to determine changes in the ability of Fkh1 to bind origins in the presence of deletions and also its ability to recruit Cdc45 onto origins. From this we found that except from first 22 amino acids, further deletions from *FKH1* sequence strongly reduced fkh1 ability to support early replication on origins controlled by it. This implies, that *FKH1* can't tolerate mutations in its sequence due to the loss of its ability to maintain replication activity on origins. It needs further inspection whether this deregulation is caused because fkh1 can't recruit onto origins or is there any possible interactions that are disturbed as a result of deletions

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Aparicio, O.M. (2013). Location, location, location: it's all in the timing for replication origins. *Genes Dev* 27, 117–128.
- Aparicio, O.M., Weinstein, D.M., and 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, 59–69.
- Aparicio, O.M., Stout, A.M., and Bell, S.P. (1999). Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9130–9135.
- Araki, H. (2010). Regulatory mechanism of the initiation step of DNA replication by CDK in budding yeast. *Biochim Biophys Acta* 1804, 520–523.
- Azvolinsky, A., Giresi, P.G., Lieb, J.D., and Zakian, V.A. (2009). Highly transcribed RNA polymerase II genes are impediments to replication fork progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 34, 722–734.
- Bandukwala, H.S., Wu, Y., Feuerer, M., Chen, Y., Barboza, B., Ghosh, S., Stroud, J.C., Benoist, C., Mathis, D., Rao, A., et al. (2011). Structure of a domain-swapped FOXP3 dimer on DNA and its function in regulatory T cells. *Immunity* 34, 479–491.
- Bell, S.P., and Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357, 128–134.
- Belsky, J.A., MacAlpine, H.K., Lubelsky, Y., Hartemink, A.J., and MacAlpine, D.M. (2015). Genome-wide chromatin footprinting reveals changes in replication origin architecture induced by pre-RC assembly. *Genes Dev* 29, 212–224.
- Berezney, R., Dubey, D.D., and Huberman, J.A. (2000). Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma* 108, 471–484.
- Bochman, M.L., and Schwacha, A. (2008). The Mcm2-7 complex has in vitro helicase activity. *Mol Cell* 31, 287–293.
- Breeden, L.L. (2000). Cyclin transcription: Timing is everything. *Curr Biol* 10, R586-8.
- Broach, J.R., Li, Y.Y., Feldman, J., Jayaram, M., Abraham, J., Nasmyth, K.A., and Hicks, J.B. (1983). Localization and sequence analysis of yeast origins of DNA replication. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 47 Pt 2, 1165–1173.
- Bruck, I., and Kaplan, D.L. (2015). The Dbf4-Cdc7 kinase promotes Mcm2-7 ring opening to allow for single-stranded DNA extrusion and helicase assembly. *J Biol Chem* 290, 1210–1221.
- Chan, C.S., and Tye, B.K. (1980). Autonomously replicating sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 6329–6333.
- Chen, S., and Bell, S.P. (2011). CDK prevents Mcm2-7 helicase loading by inhibiting Cdt1 interaction with Orc6. *Genes Dev* 25, 363–372.
- Clarey, M.G., Erzberger, J.P., Grob, P., Leschziner, A.E., Berger, J.M., Nogales, E., and Botchan, M. (2006). Nucleotide-dependent conformational changes in the DnaA-like core of the origin recognition complex. *Nat Struct Mol Biol* 13, 684–690.
- Coster, G., Frigola, J., Beuron, F., Morris, E.P., and Diffley, J.F.X. (2014). Origin licensing requires ATP binding and hydrolysis by the MCM replicative helicase. *Mol Cell* 55, 666–677.
- Diffley, J.F.X. (2004). Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol* 14, R778-86.

- Diffley, J.F.X. (2011). Quality control in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 366, 3545–3553.
- Diffley, J.F., Cocker, J.H., Dowell, S.J., and Rowley, A. (1994). Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo. *Cell* 78, 303–316.
- Dimitrova, D.S., and Gilbert, D.M. (1999). The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase. *Mol Cell* 4, 983–993.
- Drury, L.S., Perkins, G., and Diffley, J.F. (2000). The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle. *Curr Biol* 10, 231–240.
- Edwards, M.C., Tutter, A.V., Cvetic, C., Gilbert, C.H., Prokhorova, T.A., and Walter, J.C. (2002). MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts. *J Biol Chem* 277, 33049–33057.
- Enserink, J.M., and Kolodner, R.D. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div* 5, 11.
- Evrin, C., Clarke, P., Zech, J., Lurz, R., Sun, J., Uhle, S., Li, H., Stillman, B., and Speck, C. (2009). A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20240–20245.
- Fan, X., Geisberg, J.V., Wong, K.H., and Jin, Y. (2011). Conditional depletion of nuclear proteins by the Anchor Away system. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 13*, Unit13.10B.
- Ferguson, B.M., and Fangman, W.L. (1992). A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell* 68, 333–339.
- Friedman, K.L., Diller, J.D., Ferguson, B.M., Nyland, S.V., Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1996). Multiple determinants controlling activation of yeast replication origins late in S phase. *Genes Dev* 10, 1595–1607.
- Fu, Y.V., Yardimci, H., Long, D.T., Ho, T.V., Guainazzi, A., Bermudez, V.P., Hurwitz, J., van Oijen, A., Schärer, O.D., and Walter, J.C. (2011). Selective bypass of a lagging strand roadblock by the eukaryotic replicative DNA helicase. *Cell* 146, 931–941.
- Gibson, D.G., Bell, S.P., and Aparicio, O.M. (2006). Cell cycle execution point analysis of ORC function and characterization of the checkpoint response to ORC inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 11, 557–573.
- Gollosi, R., Sanders, J.T., and McCord, R.P. (2017). Genome organization during the cell cycle: unity in division. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*.
- Göndör, A., and Ohlsson, R. (2009). Replication timing and epigenetic reprogramming of gene expression: a two-way relationship? *Nat Rev Genet* 10, 269–276.
- Haruki, H., Nishikawa, J., and Laemmli, U.K. (2008). The anchor-away technique: rapid, conditional establishment of yeast mutant phenotypes. *Mol Cell* 31, 925–932.
- Hayano, M., Kanoh, Y., Matsumoto, S., Renard-Guillet, C., Shirahige, K., and Masai, H. (2012). Rif1 is a global regulator of timing of replication origin firing in fission yeast. *Genes Dev* 26, 137–150.
- Hiraga, S.I., Ly, T., Garzón, J., Hořejší, Z., Ohkubo, Y.N., Endo, A., Obuse, C., Boulton, S.J., Lamond, A.I., and Donaldson, A.D. (2017). Human RIF1 and protein phosphatase 1 stimulate DNA replication origin licensing but suppress origin activation. *EMBO Rep*.
- Hollenhorst, P.C., Bose, M.E., Mielke, M.R., Müller, U., and Fox, C.A. (2000). Forkhead genes in transcriptional silencing, cell morphology and the cell cycle. Overlapping and distinct functions for FKH1 and FKH2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154, 1533–1548.

- Hollenhorst, P.C., Pietz, G., and Fox, C.A. (2001). Mechanisms controlling differential promoter-occupancy by the yeast forkhead proteins Fkh1p and Fkh2p: implications for regulating the cell cycle and differentiation. *Genes Dev* 15, 2445–2456.
- Ibarra, A., Schwob, E., and Méndez, J. (2008). Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8956–8961.
- Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J.J., and Botchan, M.R. (2010). Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol Cell* 37, 247–258.
- Jaspersen, S.L., Charles, J.F., and Morgan, D.O. (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol* 9, 227–236.
- Kitamura, E., Blow, J.J., and Tanaka, T.U. (2006). Live-cell imaging reveals replication of individual replicons in eukaryotic replication factories. *Cell* 125, 1297–1308.
- Klemm, R.D., Austin, R.J., and Bell, S.P. (1997). Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex. *Cell* 88, 493–502.
- Knott, S.R.V., Viggiani, C.J., Tavaré, S., and Aparicio, O.M. (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 Dev* 23, 1077–1090.
- Knott, S.R.V., Peace, J.M., Ostrow, A.Z., Gan, Y., Rex, A.E., Viggiani, C.J., Tavaré, S., and Aparicio, O.M. (2012). Forkhead transcription factors establish origin timing and long-range clustering in *S. cerevisiae*. *Cell* 148, 99–111.
- Koranda, M., Schleiffer, A., Endler, L., and Ammerer, G. (2000). Forkhead-like transcription factors recruit Ndd1 to the chromatin of G2/M-specific promoters. *Nature* 406, 94–98.
- Labib, K., Tercero, J.A., and Diffley, J.F. (2000). Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science* 288, 1643–1647.
- Lalmansingh, A.S., Karmakar, S., Jin, Y., and Nagaich, A.K. (2012). Multiple modes of chromatin remodeling by Forkhead box proteins. *Biochim Biophys Acta* 1819, 707–715.
- Li, N., Zhai, Y., Zhang, Y., Li, W., Yang, M., Lei, J., Tye, B.-K., and Gao, N. (2015). Structure of the eukaryotic MCM complex at 3.8 Å. *Nature* 524, 186–191.
- Lin, S., and Kowalski, D. (1997). Functional equivalency and diversity of cis-acting elements among yeast replication origins. *Mol Cell Biol* 17, 5473–5484.
- Linke, C., Klipp, E., Lehrach, H., Barberis, M., and Krobitsch, S. (2013). Fkh1 and Fkh2 associate with Sir2 to control CLB2 transcription under normal and oxidative stress conditions. *Front Physiol* 4, 173.
- Lipford, J.R., and Bell, S.P. (2001). Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol Cell* 7, 21–30.
- Löoke, M., Kristjuhan, K., and Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques* 50, 325–328.
- Löoke, M., Kristjuhan, K., Värvi, S., and Kristjuhan, A. (2013). Chromatin-dependent and -independent regulation of DNA replication origin activation in budding yeast. *EMBO Rep* 14, 191–198.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153–166.
- Mantiero, D., Mackenzie, A., Donaldson, A., and Zegerman, P. (2011). Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast. *EMBO J* 30, 4805–4814.

- Marahrens, Y., and Stillman, B. (1992). A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science* 255, 817–823.
- Marcand, S., Wotton, D., Gilson, E., and Shore, D. (1997). Rap1p and telomere length regulation in yeast. *Ciba Found Symp* 211, 76–93; discussion 93.
- Masai, H., Taniyama, C., Ogino, K., Matsui, E., Kakusho, N., Matsumoto, S., Kim, J.-M., Ishii, A., Tanaka, T., Kobayashi, T., et al. (2006). Phosphorylation of MCM4 by Cdc7 kinase facilitates its interaction with Cdc45 on the chromatin. *J Biol Chem* 281, 39249–39261.
- Mimura, S., Seki, T., Tanaka, S., and Diffley, J.F.X. (2004). Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. *Nature* 431, 1118–1123.
- Moll, T., Tebb, G., Surana, U., Robitsch, H., and Nasmyth, K. (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, 743–758.
- Murakami, H., Aiba, H., Nakanishi, M., and Murakami-Tonami, Y. (2010). Regulation of yeast forkhead transcription factors and FoxM1 by cyclin-dependent and polo-like kinases. *Cell Cycle* 9, 3233–3242.
- Muramatsu, S., Hirai, K., Tak, Y.-S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2010). CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol (epsilon), and GINS in budding yeast. *Genes Dev* 24, 602–612.
- Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 339, 275–280.
- Myatt, S.S., and Lam, E.W.-F. (2007). The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 847–859.
- Nguyen, V.Q., Co, C., Irie, K., and Li, J.J. (2000). Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Curr Biol* 10, 195–205.
- Nguyen, V.Q., Co, C., and Li, J.J. (2001). Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature* 411, 1068–1073.
- Ostrow, A.Z., Nellimoottil, T., Knott, S.R.V., Fox, C.A., Tavaré, S., and Aparicio, O.M. (2014). Fkh1 and Fkh2 bind multiple chromosomal elements in the *S. cerevisiae* genome with distinct specificities and cell cycle dynamics. *PLoS ONE* 9, e87647.
- Ostrow, A.Z., Kalhor, R., Gan, Y., Villwock, S.K., Linke, C., Barberis, M., Chen, L., and Aparicio, O.M. (2017). Conserved forkhead dimerization motif controls DNA replication timing and spatial organization of chromosomes in *S. cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E2411–E2419.
- Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287, 821–828.
- Peace, J.M., Villwock, S.K., Zeytounian, J.L., Gan, Y., and Aparicio, O.M. (2016). Quantitative BrdU immunoprecipitation method demonstrates that Fkh1 and Fkh2 are rate-limiting activators of replication origins that reprogram replication timing in G1 phase. *Genome Res* 26, 365–375.
- Pines, J. (1994). The cell cycle kinases. *Semin Cancer Biol* 5, 305–313.
- Pohl, T.J., Brewer, B.J., and Raghuraman, M.K. (2012). Functional centromeres determine the activation time of pericentric origins of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 8, e1002677.
- Raghuraman, M.K., Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1997). Cell cycle-dependent establishment of a late replication program. *Science* 276, 806–809.
- Raghuraman, M.K., Winzler, E.A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D.J.,

- Davis, R.W., Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (2001). Replication dynamics of the yeast genome. *Science* 294, 115–121.
- Rao, H., and Stillman, B. (1995). The origin recognition complex interacts with a bipartite DNA binding site within yeast replicators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2224–2228.
- Reinapae, A., Jalakas, K., Avvakumov, N., Lõoke, M., Kristjuhan, K., and Kristjuhan, A. (2017). Recruitment of Fkh1 to replication origins requires precisely positioned Fkh1/2 binding sites and concurrent assembly of the pre-replicative complex. *PLoS Genet* 13, e1006588.
- Remus, D., and Diffley, J.F.X. (2009). Eukaryotic DNA replication control: lock and load, then fire. *Curr Opin Cell Biol* 21, 771–777.
- Reynolds, D., Shi, B.J., McLean, C., Katsis, F., Kemp, B., and Dalton, S. (2003). Recruitment of Thr 319-phosphorylated Ndd1p to the FHA domain of Fkh2p requires Clb kinase activity: a mechanism for CLB cluster gene activation. *Genes Dev* 17, 1789–1802.
- Rowley, A., Cocker, J.H., Harwood, J., and Diffley, J.F. (1995). Initiation complex assembly at budding yeast replication origins begins with the recognition of a bipartite sequence by limiting amounts of the initiator, ORC. *EMBO J* 14, 2631–2641.
- Saner, N., Karschau, J., Natsume, T., Gierlinski, M., Retkute, R., Hawkins, M., Nieduszynski, C.A., Blow, J.J., de Moura, A.P.S., and Tanaka, T.U. (2013). Stochastic association of neighboring replicons creates replication factories in budding yeast. *J Cell Biol* 202, 1001–1012.
- Sheu, Y.-J., and Stillman, B. (2010). The Dbf4-Cdc7 kinase promotes S phase by alleviating an inhibitory activity in Mcm4. *Nature* 463, 113–117.
- Shi, B.-J. (2016). Decoding common and divergent cellular functions of the domains of forkhead transcription factors Fkh1 and Fkh2. *Biochem J* 473, 3855–3869.
- Siow, C.C., Nieduszynska, S.R., Müller, C.A., and Nieduszynski, C.A. (2012). OriDB, the DNA replication origin database updated and extended. *Nucleic Acids Res* 40, D682–6.
- Stinchcomb, D.T., Struhl, K., and Davis, R.W. (1979). Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282, 39–43.
- Stroud, J.C., Wu, Y., Bates, D.L., Han, A., Nowick, K., Paabo, S., Tong, H., and Chen, L. (2006). Structure of the forkhead domain of FOXP2 bound to DNA. *Structure* 14, 159–166.
- Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S., and Davis, R.W. (1979). High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1035–1039.
- Takara, T.J., and Bell, S.P. (2011). Multiple Cdt1 molecules act at each origin to load replication-competent Mcm2-7 helicases. *EMBO J* 30, 4885–4896.
- Tanaka, S., and Araki, H. (2010). Regulation of the initiation step of DNA replication by cyclin-dependent kinases. *Chromosoma* 119, 565–574.
- Tanaka, S., and Diffley, J.F.X. (2002). Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nat Cell Biol* 4, 198–207.
- Tanaka, S., Nakato, R., Katou, Y., Shirahige, K., and Araki, H. (2011). Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing. *Curr Biol* 21, 2055–2063.
- Theis, J.F., and Newlon, C.S. (1997). The ARS309 chromosomal replicator of *Saccharomyces cerevisiae* depends on an exceptional ARS consensus sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10786–10791.
- Ticau, S., Friedman, L.J., Champasa, K., Corrêa, I.R., Gelles, J., and Bell, S.P. (2017). Mechanism and timing of Mcm2-7 ring closure during DNA replication origin licensing. *Nat Struct Mol Biol* 24, 309–

- Tourrière, H., and Pasero, P. (2007). Maintenance of fork integrity at damaged DNA and natural pause sites. *DNA Repair (Amst)* 6, 900–913.
- Tuteja, G., and Kaestner, K.H. (2007). SnapShot: forkhead transcription factors I. *Cell* 130, 1160.
- Unnikrishnan, A., Gafken, P.R., and Tsukiyama, T. (2010). Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication. *Nat Struct Mol Biol* 17, 430–437.
- Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B.J., and Grunstein, M. (2002). Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol Cell* 10, 1223–1233.
- Wäsch, R., and Cross, F.R. (2002). APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* 418, 556–562.
- Wersto, R.P., Chrest, F.J., Leary, J.F., Morris, C., Stetler-Stevenson, M.A., and Gabrielson, E. (2001). Doublet discrimination in DNA cell-cycle analysis. *Cytometry* 46, 296–306.
- Wilmes, G.M., and Bell, S.P. (2002). The B2 element of the *Saccharomyces cerevisiae* ARS1 origin of replication requires specific sequences to facilitate pre-RC formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 101–106.
- Yamashita, M., Hori, Y., Shinomiya, T., Obuse, C., Tsurimoto, T., Yoshikawa, H., and Shirahige, K. (1997). The efficiency and timing of initiation of replication of multiple replicons of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VI. *Genes Cells* 2, 655–665.
- Yang, S.C.-H., Rhind, N., and Bechhoefer, J. (2010). Modeling genome-wide replication kinetics reveals a mechanism for regulation of replication timing. *Mol Syst Biol* 6, 404.
- Zegerman, P., and Diffley, J.F.X. (2007). Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* 445, 281–285.
- Zhai, Y., Cheng, E., Wu, H., Li, N., Yung, P.Y.K., Gao, N., and Tye, B.-K. (2017). Open-ringed structure of the Cdt1-Mcm2-7 complex as a precursor of the MCM double hexamer. *Nat Struct Mol Biol* 24, 300–308.
- Zou, L., Mitchell, J., and Stillman, B. (1997). CDC45, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication. *Mol Cell Biol* 17, 553–563.

LISAD

LISA 1. Töös kasutatud pärmitüvede genotüübid ja tüvede valmistaja

Tüvi	Genotüüp	Valmistaja/Päritolu
W303	ura3 leu2-3, 112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1, can1-100	Thomas/Rothstein
1145	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2, Cdc45-3x1E2, fkh1D, Fkh2-deltaC642-3xMyc, bar1D	Allan Reinapae
1442	W303; MAT alpha;ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+; Anchor-away strain (tor1-1, fpr1D, RPL13A-2×FKBP12), Fkh2-FRB, bar1D	Kersti Kristjuhan
1356	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, Fkh2-deltaC642-3xMyc, bar1D, Fkh1-3x3F12 (wt)	Kairi Koppel
1357	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, Fkh2-deltaC642-3xMyc, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 2-22; D1)	Kairi Koppel
1358	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, Fkh2-deltaC642-3xMyc, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 23-92; D2)	Kairi Koppel
1359	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, Fkh2-deltaC642-3xMyc, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 93-171; D3)	Kairi Koppel
1360	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, Fkh2-deltaC642-3xMyc, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 172-292; D4)	Kairi Koppel
1361	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, Fkh2-deltaC642-3xMyc, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 293-344; D5)	Kairi Koppel
1362	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, Fkh2-deltaC642-3xMyc, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 345-409; D6)	Kairi Koppel
1363	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, Fkh2-deltaC642-3xMyc, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 410-484; D7)	Kairi Koppel
1477	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, fkh2D, bar1D, Fkh1-3x3F12 (wt)	Allan Reinapae
1478	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, fkh2D, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 2-22; D1)	Allan Reinapae

1479	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, fkh2D, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 23-92; D2)	Allan Reinapae
1480	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, fkh2D, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 93-171; D3)	Allan Reinapae
1481	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, fkh2D, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 172-292; D4)	Allan Reinapae
1482	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, fkh2D, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 293-344; D5)	Allan Reinapae
1483	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, fkh2D, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 345-409; D6)	Allan Reinapae
1484	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Cdc45-3x1E2, fkh2D, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 410-484; D7)	Allan Reinapae
1573	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Fkh2-FRB (anchor-away), Cdc45-3x1E2, bar1D, Fkh1-3x3F12 (wt)	Kairi Koppel
1574	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Fkh2-FRB (anchor-away), Cdc45-3x1E2, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 23-92; D2)	Kairi Koppel
1575	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Fkh2-FRB (anchor-away), Cdc45-3x1E2, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 93-171; D3)	Kairi Koppel
1576	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Fkh2-FRB (anchor-away), Cdc45-3x1E2, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 172-292; D4)	Kairi Koppel
1577	W303; MAT a; ura3 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100, lys2; Fkh2-FRB (anchor-away), Cdc45-3x1E2, bar1D, Fkh1-3x3F12 (delta 410-484; D7)	Kairi Koppel
1444	W303; MAT a ;ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ Anchor-away strain (tor1-1, fpr1D, RPL13A-2×FKBP12), Cdc45-3x1E2, bar1D, Fkh2-FRB	Kersti Kristjuhan
1436	W303; MAT a; ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+; Anchor-away strain (tor1-1, fpr1D, RPL13A-2×FKBP12), Fkh1-FRB, fkh2D, Cdc45-3x1E2, bar1D	Kersti Kristjuhan
1439	W303; MAT a; ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+;Anchor-away strain (tor1-1, fpr1D, RPL13A-2×FKBP12), Cdc45-3x1E2, bar1D, fkh1D, Fkh2-FRB	Kersti Kristjuhan
DC14	matA, his1	Brad Cairns/Fred Winston
DC17	mat alpha, his1	Brad Cairns/Fred Winston

LISA 2. PCR programm ja praimerid deletsiooniga ala amplifitseerimiseks plasmiidilt

Maht: 50 µl	Lõpp-kontsentratsioon	Tsükliid: 30	°C	Aeg
Plasmiid	~4 ng	Denaturatsioon	99	1 min
Praimer Fkh1 TR_F	0,3 µmol	Denaturatsioon 2	95	25 sek
Praimer Fkh1 Term R	0,3 µmol	Praimerite seondumine	58	40 sek
dNTP	0,2 mM	DNA süntees	68	12 min
MgCl ₂	0,5 mM	Lõplik süntees	68	15 min
DMSO	6%			
<i>Phusion</i> HF puhver 5X	1X			
<i>Phusion</i> polümeraas	1U			
H ₂ O	lõppmahuni			
Fkh1 TR_F	ATAGAGAGAACAGGATGGTAAGAG			
Fkh1 Term R	TTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATT AAGTTCTGTCACAGCGTCTTC			

LISA 3. PCR programm ja praimerid pärmikolooniate kontrollimiseks

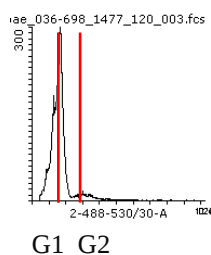
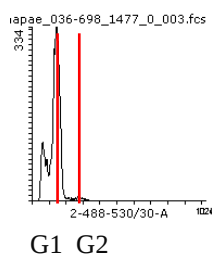
Maht: 10 µl	Lõpp-kontsentratsioon	Tsükliid: 30	°C	Aeg
DNA	~30 ng	Denaturatsioon	95	3 min
Praimer F	0,3 µmol	Denaturatsioon 2	95	30 sek
Praimer R	0,3 µmol	Praimerite seondumine	54	54 sek
Firepol 5x	1X	DNA süntees	72	5 min
H ₂ O	lõppmahuni	Lõplik süntees	72	8 min

Del nr	Praimerid deletsioonide insertiooni kontrollimiseks
1	Fkh1 prom+ ORF F GTTGGGTAACGCCAGGG TTTTCCCAGTCAC GACGTTGTAAAACGACAAGGTCATGTCCAGGTAGAC Fkh1Δ 3 R TTTCTTGTTACCGGGCACAGCATTC
2	Fkh1 prom+ ORF F GTTGGGTAACGCCAGGG TTTTCCCAGTCAC GACGTTGTAAAACGACAAGGTCATGTCCAGGTAGAC Fkh1Δ 4 R GCGACAAGTCCGGCAATATAAAGATCATTG
3	Fkh1 prom+ ORF F GTTGGGTAACGCCAGGG TTTTCCCAGTCAC GACGTTGTAAAACGACAAGGTCATGTCCAGGTAGAC Fkh1Δ 5 R GCCACGCCATTGATGGATTTTCTATATGGGGT
4	Fkh1 prom+ ORF F GTTGGGTAACGCCAGGG TTTTCCCAGTCAC GACGTTGTAAAACGACAAGGTCATGTCCAGGTAGAC Fkh1Δ 6 R TGTGCAATTGTTGAGAAAACCTGTAAAATGCG
5	Fkh1Δ 3 F TGTGCCCCGGTGAACAAGAACTATTATATCGGATTAT FBA kntrp ATGACAAAAGATGAGCTAGGCT
6	Fkh1Δ 4 F TATATTGCCGGACTTGTCGCTGGATGAAAA FBA kntrp ATGACAAAAGATGAGCTAGGCT
7	Fkh1Δ 5 F AAATCCATCAATGGCGTGGCAGAACTC FBA kntrp ATGACAAAAGATGAGCTAGGCT

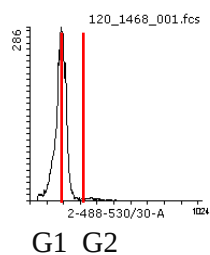
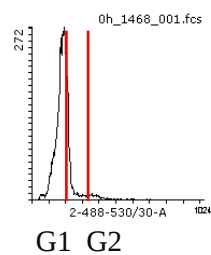
LISA 4. FACS graafikud

1. WT, *fkh1:Δ1*+*fkh2Δ* ja *fkh1:Δ7*+*fkh2Δ* tüvede G1 arresti hindamine koopia-arvu analüüsil (KA) ja ChIP katsetes

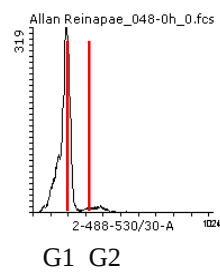
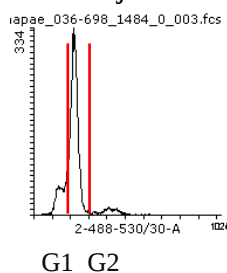
WT KA ja ChIP



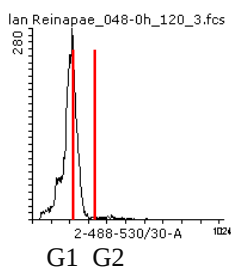
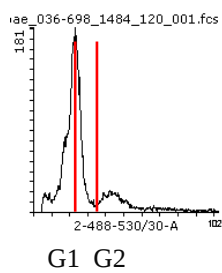
Δ1 KA



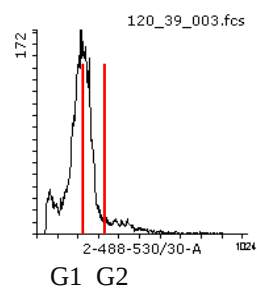
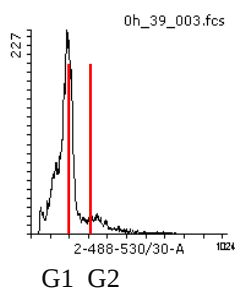
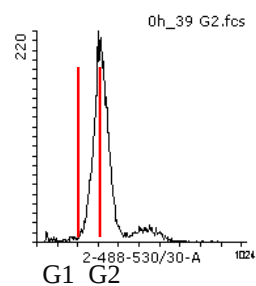
Δ7 KA ja ChIP



Δ1 ChIP

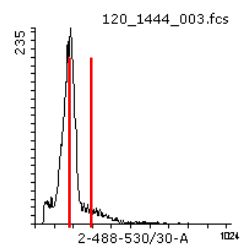
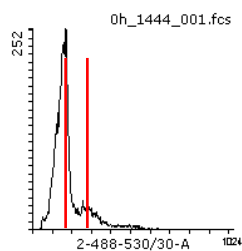
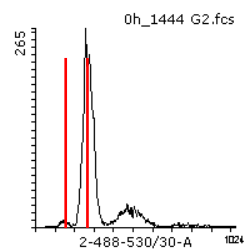


2. Kontrolltüve *fkh1Δ* + Fkh2-FRB koopia-arvu analüüs

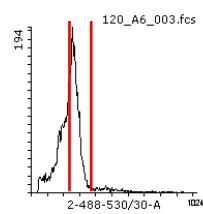
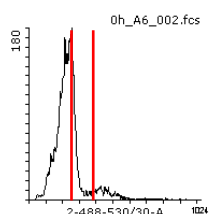
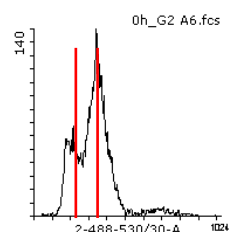


3. G2 ja G1 faasi arresti kontrollimine *anchor-away* tüvede koopia arvu analüüsil

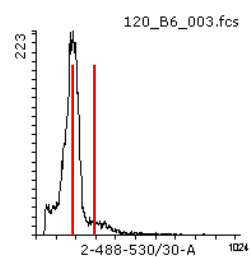
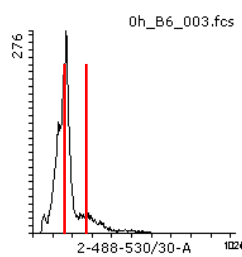
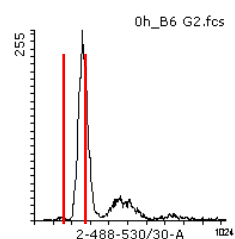
WT



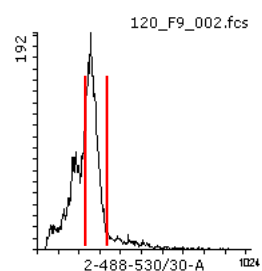
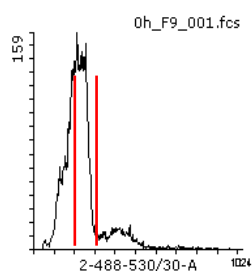
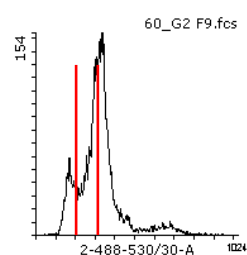
$\Delta 2$



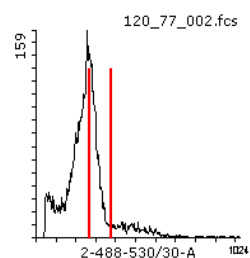
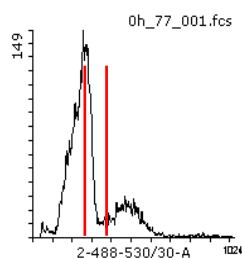
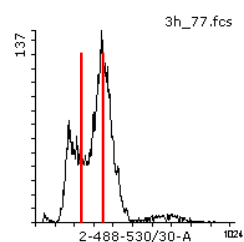
$\Delta 3$



$\Delta 4$



$\Delta 7$



G1 G2

G1 G2

G2 G1

LISA 5. Kromatiini immunosadestamisel kasutatud puhvrid:

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

2 g KCl

80 g NaCl

17,8 g Na₂HPO₄·2H₂O

2,4 g KH₂PO₄

LiCl pesulahus

10 mM Tris-HCl pH 8

250 mM LiCl (M_w 42,39)

0,5% NP-40

0,5% Na deoksühoolhape

1 mM EDTA

FA-lüüsipuhver

50 mM Hepes-KOH pH 7,5

140 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X-100

0,1% Na deoksühoolhape

TES

10 mM Tris-HCl pH 7,5

1 mM EDTA

100 mM NaCl

FA500

50 mM Hepes-KOH pH 7,5

500 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X-100

0,1% Na deoksühoolhape

Elueerimispuhver

100 mM tris pH 7,8

10 mM EDTA

1% SDS

200 mM NaCl

LISA 6: qPCR-il kasutatud praimerid ja PCR programm

Praimer	Järjestus
ARS305_F	GCAGTGCTTGTAACCTGGTGC
ARS305_R	TAGTTATTACGGCGTCGGGC
ARS501_F	ATTGAGCATTACCTAACGCCATA
ARS501_R	TGGATCTGAAACCGAGCAGTT
ARS605_F	CTGCCCCTATCAGTTAATGGCT
ARS605_R	ACCGTCAGAGGTTTAGAACTTGTAGA
ARS737_F	TGCTTATTAAGGGTCTAGGACATTT
ARS737_R	ACTTTTGCTTAAGCGGCAGAAT
ARS607 F	ACCCAGCGTAAGGTAAATATTATG
ARS607 R	TGCTTTCTAGTACCTACTGTGCC
PAU II F	TCAACTTGGTTAAATTGGGTGT
PAU II R	GTAGTTGAAAACGGCTTCAGCA
CLB2 F	CCGCCAAAAGACAGATTTTATTC
CLB2 R	ATATCGCGAACTTCGTTGTTGA

Programm	Temperatuur °C	Kestus	Tsüklite arv
Ensüümi aktivatsioon	95	15 min	
Denaturatsioon	95	15 sek	
Praimerite seondumine ja elongatsioon	60 72	1 min	45
Dissotsiatsiooni mõõtmine	95 60 95	15 sek 15 sek 15 sek	

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajaid Allan Reinapaed ja Arnold Kristjuhanit igakülgse juhendamise ja kasulike nõuannete eest! Veel soovin tänada väga abivalmist rakubioloogia kollektiivi ja Dimitri Lubenetsi läbivoolutütomeetria analüüside läbiviimise eest.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ Kairi Koppel _____

(autori nimi)

(sünnikuupäev: _____ 05.05.1991 _____)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Forkhead 1 transkriptsioonifaktori iseloomustamine replikatsioonil *Saccharomyces cerevisiae* näitel

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on _____ Allan Reinapae _____ ja _____ Arnold Kristjuhan _____,

(juhendajate nimed)

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 1.06.2020 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, ____31.05.2017____ (kuupäev)