

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

TEHNOLOOGIA INSTITUUT

Carmen Kivisild

**Oksüdatiivse stressi sensorvalk Keap1 kui replikatiivse helikaasi alaühikute
MCM3 ja MCM7 ubikvitineerimise ja taseme regulaator**

Magistritöö

Juhendaja PhD Ivar Ilves

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. Replikatsiooni initsiatsioon.....	7
1.1.1 Pre-RC kokkupanek.....	7
1.1.2 Helikaasi aktiveerimine	8
1.2. Ubikvitineerimine kui substraatvalkude post-translatsiooniline modifitseerimine	9
1.2.1 Klassikaline ubikvitineerimine	10
1.2.2 Erinevused klassikalisest ubikvitineerimisest	10
1.2.3 Ubikvitineerimises osalevad ensüümid	12
1.3. Keap1 kui ubikvitineerimise substraadi spetsiifilisuse faktor ja selle roll oksüdatiivse stressi vastusradades	14
1.3.1 Keap1 struktuur	14
1.3.2 Keap1-sõltuv Nrf2 regulatsioon	15
1.3.3 Keap1-Nrf2 raja roll kasvajakudedes.....	16
1.4. Replikatiivse MCM2-7 helikaasi alaühikud Keap1 interaktsioonipartneritena.....	17
1.4.1 MCM-i struktuur	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	19
2.1. Töö eesmärgid.....	19
2.2. Materjal ja meetodika	20
2.2.1 Kasutatud ekspressioonivektorid.....	20
2.2.2 Ekspressioonivektorite klonimine	21
2.2.3 Mutatsiooni sisseviimine Flag-Nrf2 plasmidi PCR meetodil.....	23
2.2.4 Erinevad ubikvitiini mutandid	24
2.2.5 Rakuliinid	25
2.2.6 Transfektsioon	25

2.2.7	Proteosoomi inhibiitorid ja oksüdatiivne stress.....	26
2.2.8	Rakkude lüüsimine ja immunosadestamine	26
2.2.9	Western-blot analüüs	27
2.3.	Tulemused.....	29
2.3.1	CMG helikaasi alaühikuid MCM3 ja MCM7 ubikvitineeritakse Keap1 juuresolekul ning nende valkude tase on reguleeritud üle lüsiin 48 moodustunud polüubikvitiiniahelatest sõltuvalt.....	29
2.3.2	MCM3 ja MCM7 valkude tase ning ubikvitineerimine on rakus reguleeritud Keap1 poolt	33
2.3.3	Keap1 sõltuv MCM3 taseme vähenemine on seotud degradatsiooniga 26S proteosoomi poolt ja neid protsesse ei reguleerita vastusena oksüdatiivsele stressile	37
2.4.	Arutelu	42
	KOKKUVÕTE	46
	SUMMARY	47
	KIRJANDUSE LOETELU.....	48
	TÄNUSÕNAD	56
	LIHTLITSENTS.....	57

KASUTATUD LÜHENDID

AAA+	<i><u>A</u>TPases <u>A</u>ssociated with diverse cellular <u>A</u>ctivities</i>
Ah	Aminohape
ARE	Antioksidatiivne vastuselement
BTB	<i><u>B</u>road-Complex, <u>T</u>ramtrack and <u>B</u>ric-a-brac</i>
Cdc45	<i><u>C</u>ell <u>d</u>ivision <u>c</u>ycle 45</i>
Cdc6	<i><u>C</u>ell <u>d</u>ivision <u>c</u>ycle 6</i>
CDK	<i><u>C</u>yclin-<u>d</u>eependent <u>k</u>inase</i>
CR	Laengu suhe
CRL	<i><u>C</u>ullin-<u>R</u>ING <u>l</u>igases</i>
Cdt1	<i><u>C</u>hromatin <u>l</u>icensing and <u>D</u>NA replication factor 1</i>
CTR	C-terminaalne regioon
Cul3	<i><u>C</u>ullin 3</i>
DDK	<i><u>D</u>bf4-<u>d</u>eependent <u>k</u>inase</i>
DGR	<i><u>D</u>ouble <u>g</u>lycine <u>r</u>epeat</i>
DMEM	<i><u>D</u>ulbecco's <u>m</u>odified <u>e</u>agle's rakusööde</i>
E1	Ubikvitiini-aktiveeriv ensüüm
E2	Ubikvitiini-konjugeeriv ensüüm
E3	Ubikvitiin-proteiin ligaas
ERAD	Endoplasmaatilise retiikulumi-sõltuv degradatsioon
GINS	Jaapani keeles <i>go</i> , <i>ichi</i> , <i>ni</i> , <i>san</i>
H2I	<i><u>h</u>elix-2 <u>i</u>nsert</i>

HECT	<i><u>H</u>omologous to <u>E</u>6-AP <u>C</u>-<u>T</u>erminus</i>
IP	Immunosadestamine
IVR	<i><u>I</u>nter<u>v</u>ening <u>r</u>egion</i>
Keap1	<i><u>K</u>elch-like <u>E</u>CH-<u>a</u>ssociated <u>p</u>rotein 1</i>
MCM2-7	<i><u>M</u>ini <u>c</u>hromosome <u>m</u>aintenance complex 2-7</i>
MEF	<i><u>M</u>ouse <u>e</u>mbryonic <u>f</u>ibroblast</i>
NES	Tuumast ekspordi signaali
NF-κB	<i><u>N</u>uclear <u>f</u>actor-<u>κ</u>B</i>
Nrf2	<i><u>N</u>uclear <u>f</u>actor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
NTR	N-terminaalne regioon
ORC	<i><u>O</u>igin'i ära tudev kompleks</i>
Pre-RC	Pre-replikatiivne kompleks
Rbx1	<i><u>R</u>ING-<u>b</u>ox <u>p</u>rotein 1</i>
RING	<i><u>R</u>eally <u>I</u>nteresting <u>N</u>ew <u>G</u>ene</i>
RXRα	<i><u>R</u>etinoic <u>X</u> <u>r</u>eceptor <u>α</u></i>
U2OS	Inimese osteosarkoomi epiteeli rakud
Ubi	Ubikvitiin
β-TrCP	<i><u>β</u>-<u>t</u>ransducin <u>r</u>epeat-<u>c</u>ontaining <u>p</u>rotein</i>

SISSEJUHATUS

Eukarüootides on genoomse DNA replikatsiooni initsiatsioon rangelt kontrollitud protsess, mis kindlustab kogu genoomi duplitseerimise vaid ühe korra rakutsükli jooksul (Bell and Dutta, 2002). Replikatsiooni initsiatsioon algab juba M faasi lõpus ja varajases G1 faasis, kui inaktiivne kaksikheksameerne helikaas MCM2-7 laetakse kromatiinile (Riera et al., 2014). Raku sisenemisel S faasi liituvad helikaasiga valk Cdc45 ja valgukompleks GINS, moodustub aktiivne CMG kompleks (Ilves et al., 2010). Inaktiivse helikaasi laadimine ja aktivatsioon on mitmel erineval tasandil reguleeritud kompleksed molekulaarsed protsessid, kus osalevad erinevad abi- ja kontrollfaktorid (Labib, 2010).

Rakud puutuvad kokku mitmesuguste nii eksogeensete kui endogeensete mõjuritega, mis võivad kahjustada rakulisi struktuure ja protsesse (Valko et al., 2007). Nende kahjustavate mõjuritega toimetulekuks on rakus välja kujunenud mitmed erinevad kaitsemehhanismid. Keap1-Nrf2 rada on raku primaarne kaitsemehhanism vastusena oksüdatiivsele ja elektrofiilsele stressile (Itoh et al., 1999). Normaalingimustes Nrf2 ubikvitineeritakse Keap1-Cul3-Rbx1 E3 ligaaskompleksi poolt (Kobayashi et al., 2004) ja degradeeritakse 26S proteosoomis (Nguyen et al., 2003). Oksüdatiivse stressi olukorras valku Nrf2 enam ei ubikvitineerita, Nrf2 akumulereerub ja translokaliseerub tuuma ning reguleerib positiivselt mitmete geenide ekspressiooni (Itoh et al., 1999).

Valgus Nrf2 on Keap1-ga interaktsiooniks vajalikud kaks motiivi, DLG ja ETGE. Valk MCM3 sisaldab MCM-idele omast insertiooni, mis oma struktuurilt on väga sarnane Nrf2 ETGE motiiviga ning sisaldab konserveerunud ETGE järjestuselementi. Teistest MCM2-7 helikaasi alaühikutest sisaldab mõnevõrra sarnast järjestuselementi (VSGE) veel vaid MCM7. Sellel järjestuselemendil põhinevat MCM3 ja Keap1 vahelist interaktsiooni on biokeemilistes katsetes näidatud nii meie laboris (Ivar Ilves, avaldamata andmed) kui teiste poolt (Hast et al., 2013), Keap1 ja MCM7 vahelist interaktsiooni ainult meie laboris. Lähtudes võimalikust analoogiast eelnevalt kirjeldatud Keap1-Nrf2 rajaga, püstitati magistritöö eesmärgiks uurida, kas ja kuidas on valk Keap1 seotud replikatiivse helikaasi kompleksi alaühikute MCM3 ja MCM7 ubikvitineerimise ning sellest sõltuva degradatsiooniga 26S proteosoomis. Kuna Keap1-Nrf2 rada on oksüdatiivse stressi sensor rakus, siis uuriti, kas võimalik ubikvitineerimine ja valgu degradatsioon on rakus reguleeritud oksüdatiivse stressi poolt.

Antud magistritöö on valminud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis Ivar Ilvese uurimisrühmas. Märksõnad: replikatsioon, degradatsioon, ubikvitineerimine, Keap1.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

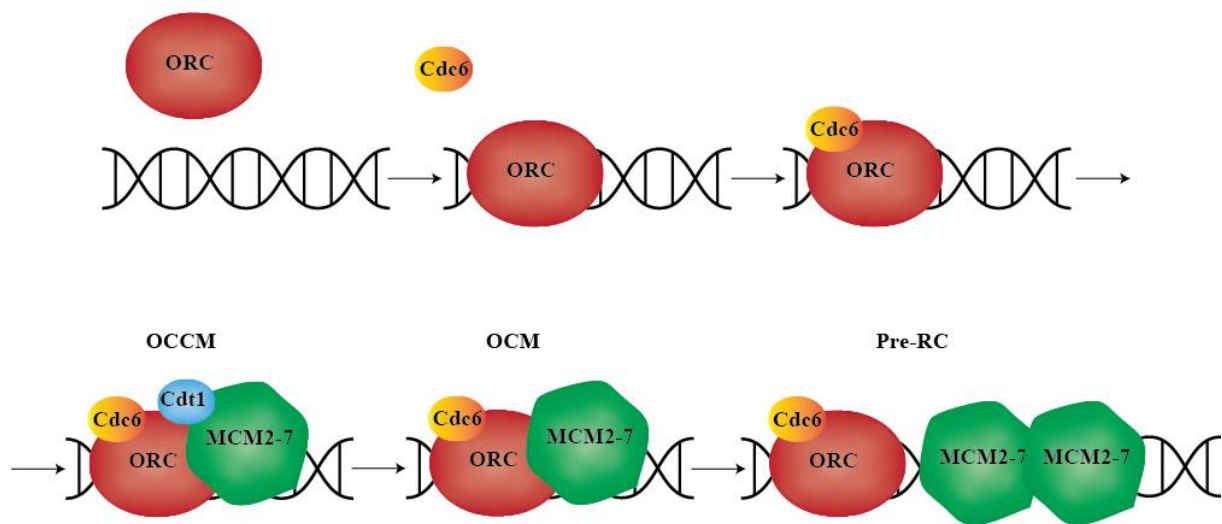
1.1. Replikatsiooni initsiatsioon

Genoomse DNA replikatsiooni initsiatsioon on eukarüootides rangelt kontrollitud protsess, mis kindlustab kogu genoomi duplitseerimise vaid ühe korra rakutsükli jooksul (Bell ja Dutta, 2002). Täpne replikatsioon on eukarüootse organismi jaoks hädavajalik ning replikatsiooni deregulatsioon võib viia genoomi ebastabiilsuse ja kasvajate tekkeni (ülevaade Truong ja Wu, 2011). Replikatsiooni initsiatsioon on eukarüootides üldjoontes konserveerunud protsess, mis on kõige paremini kirjeldatud lihtsas mudelorganismis, pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* (Evrin et al., 2009; Remus et al., 2009; Yeeles et al., 2015). Sel aastal ilmus esimene töö, kus näidati minimaalne replikatsiooni initsiatsiooniks vajalike valkude, kinaaside ja kofaktorite komplekt pagaripärmi süsteemis (Yeeles et al., 2015). See on oluliseks verstapostiks replikatsiooni initsiatsiooni edasisel uurimisel.

1.1.1 Pre-RC kokkupanek

Replikatsiooni initsiatsioon on kaheetapiline protsess, millest esimene algab juba hilises mitoosis ja varajases G1 faasis (Blow and Dutta, 2005). Selleks on pre-replikatiivse kompleksi pre-RC (ingl *pre-replication complex*) moodustumine, kus kasutades ORC (Orc1-6, ingl *origin recognition complex*), Cdc6 (ingl *cell division cycle 6*) ja Cdt1 (ingl *chromatin licensing and DNA replication factor 1*) kombineeritud aktiivsust, laetakse replikatiivne helikaas MCM2-7 kromatiinile (Joonis 1) (ülevaade Riera et al., 2014).

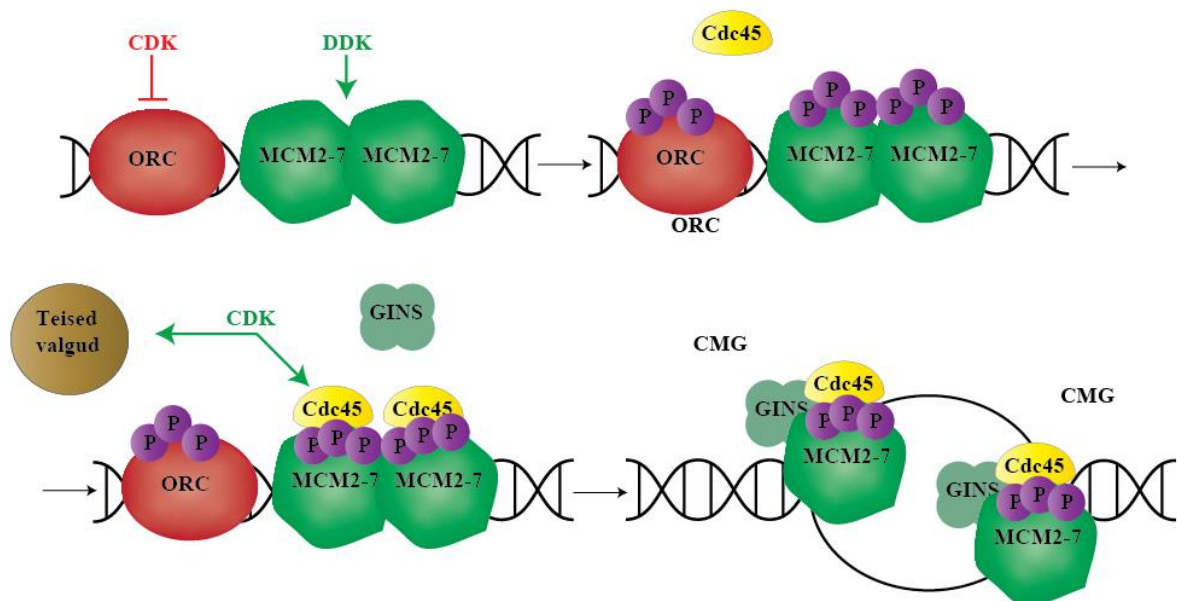
Kuuest alaühikust koosnev Orc1-6 kompleks seondub DNA-le ja määrab sellega ära replikatsiooni alguspunkti ehk *origin*'i (Bell ja Stillman, 1992). Järgmisena liitub ORC-DNA kompleksile valk Cdc6 (Liang et al., 1995), nii ORC kui Cdc6 seandumine kromatiinile on ATP-st sõltuv protsess (Speck et al., 2005). Seejärel seondub ORC-Cdc6 kompleksile Cdt1-MCM2-7 heptameerne kompleks (Evrin et al., 2009; Remus et al., 2009) ning moodustub ORC-Cdc6-Cdt1-MCM2-7 (OCCM) kompleks (Sun et al., 2013), mis omakorda indutseerib ATP hüdrolüüsi Orc1 ja Cdc6 poolt ning Cdt1 vabastatakse kompleksist, moodustub ORC-Cdc6-MCM2-7 (OCM) kompleks (Fernández-Cid et al., 2013; Randell et al., 2006). OCM on vahekompleks, mis seob ka teise MCM2-7 heksameeri kromatiinile ning moodustub stabiilne, kuid veel inaktiivne vastassuunalise orientatsiooniga MCM2-7 kaksikheksameer (Evrin et al., 2014; Fernández-Cid et al., 2013). Pre-RC kokkupanek litsentseerib *origin*'i potentsiaalseks aktivatsiooniks (Riera et al., 2014).



Joonis 1. MCM2-7 helikaasi laadimine kromatiinile. Pärast ORC-i seondumist replikatsiooni alguspunkti, liituvad kompleksiga Cdc6 ja heptameerne Cdt1-MCM2-7 (OCCM). Teise MCM2-7 heksameeri laadimiseks kromatiinile, peab Cdt1 kompleksist lahkuma (OCM). Vastassuunalise orientatsiooniga kaksikheksameerne helikaas jääb Pre-RC-s inaktiivseks kuni G1 faasi lõpuni (Riera et al., 2014; Yeeles et al., 2015, kohandatud joonis).

1.1.2 Helikaasi aktiveerimine

Raku sisenemisel S faasi aktiveeritakse MCM2-7 kompleksi helikaasne aktiivsus protsessi abil, mida kontrollitakse kahe rakutsükli regulaatorkinaasi – CDK (ingl *cyclin-dependent kinase*) ja DDK (ingl *Dbf4-dependent kinase*) - poolt (Joonis 2). Sellega käivitatakse replikatsiooni initsiatsiooni teine samm, *origin*'i tulistamine (ingl *origin firing*) (Labib, 2010). Inaktiivsele MCM2-7 kompleksile liitub valk Cdc45 (ingl *cell division cycle 45*) ja neljast valgust (Psf1-3; Sld5) koosnev GINS (jaapani keeles *go, ichi, ni, san*) ning moodustub aktiivne CMG (Cdc45-MCM2-7-GINS) helikaas (Ilves et al., 2010; Moyer et al., 2006). Aktiveerimisel läbib helikaas suured konformatsioonilised muutused, kusjuures pre-RC-s on inaktiivne kaksikheksameerne MCM2-7 kompleks ümber kaheahelalise DNA (Evrin et al., 2009; Remus et al., 2009), CMG-s on aktiveeritud monoheksameerne MCM2-7 ümber üheahelalise DNA (Costa et al., 2011; Fu et al., 2011). CDK inhibeerib otseselt *de novo* MCM2-7 laadimist S faasis fosforüleerides ORC-i (Yeeles et al., 2015), lisaks on CDK vajalik ka helikaasi aktivatsiooniks fosforüleerides teisi *origin*'i tulistamises osalevaid valke (ingl *firing factors*) (Tanaka et al., 2007; Zegerman ja Diffley, 2007). Tänu sellele saab MCM2-7 kompleksi laadimine toimuda ainult G1 faasis, mil CDK aktiivsus on madal ning *origin*'id saavad tulistada ainult S1 faasis, mil CDK tase on tõusnud (Siddiqui et al., 2013). MCM2-7 alaühikute fosforüleerimine DDK poolt on samuti vajalik *origin*'i tulistamiseks (Sheu and Stillman, 2006, 2010).



Joonis 2. Helikaasi aktiveerimine. Helikaasi aktiveerimises rakutsükli S faasis osalevad kaks kinaasi, CDK ja DDK. CDK inhibeerib S faasis ORC kompleksile uute MCM-ide laadimist ja osaleb CMG moodustamises fosforüleerides erinevaid *origin*'i tulistamises osalevaid valke. DDK osaleb samuti CMG moodustamises fosforüleerides MCM-e. CMG moodustamiseks peavad inaktiivsele MCM2-7 kompleksile seonduma veel valk Cdc45 ja GINS valgukompleks. Inaktiivne helikaas läbib aktiveerimisel suured konformatsioonilised muutused ja toimub DNA alusahelate esialgne lahti sulandumine (Yeeles et al., 2015, kohandatud joonis).

Sellega on helikaas aktiveeritud, kuid aktiivse replisoomi kokkupanekuks peavad seonduma veel mõned valgud, kaasa arvatud DNA polümeraasid (ülevaade Tognetti et al., 2015). Kui kogu replikatsiooni kompleks on kokkupanud, liigub helikaas replikatsioonikahvli ees ning avab kaheahelalise DNA, mis võimaldab polümeraasidel sünteesida uut DNA ahelat (Tanaka ja Araki, 2013).

1.2. Ubikvitineerimine kui substraatvalkude post-translatsiooniline modifitseerimine

Ubikvitineerimine on valkude post-translatsiooniline modifikatsioon, kus substraat valgule lisatakse üks ubikvitiini molekul (monoubikvitineerimine), mitu üksikut ubikvitiini molekuli (multi-monoubikvitineerimine) või mitmest ubikvitiinist moodustunud kett (polüubikvitineerimine). Valkude ubikvitineerimise resultaat võib olla väga erinev sõltuvalt sellest, mitu ubikvitiini molekuli substraadile lisati, milliseid aminohappeid sideme moodustamisel kasutati ning milline on polüubikvitineerimisel keti ehitus (ülevaade Ciechanover ja Stanhill, 2014).

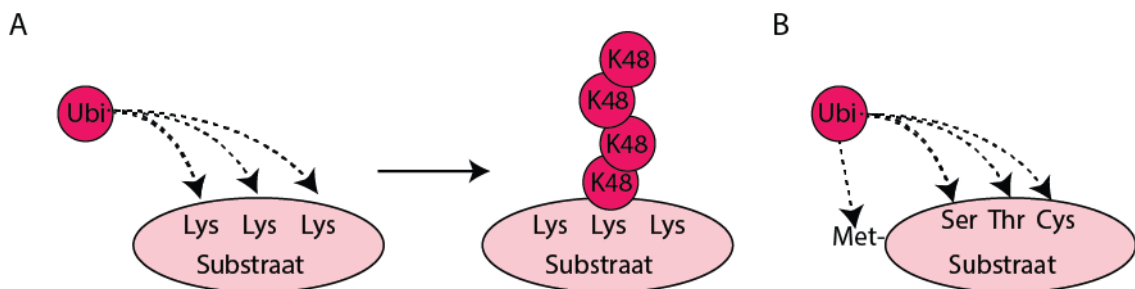
1.2.1 Klassikaline ubikvitineerimine

Ubikvitiini kovalentselt lisamine substraatvalgule sisaldab endas mitmeid erinevaid ensümaatilisi reaktsioone, kus klassikaliselt moodustub isopeptiidside substraadi lüsiini (Lys, K) epsilon-aminorühma $\epsilon\text{-NH}_2$ ja ubikvitiini C-terminaalse glütsiini (Gly, G) karboksüülrühma -COOH vahel (Hershko ja Ciechanover, 1998). Ubikvitiin on väike, 76 ah pikkune valk, mis sisaldab seitset lüsiini (K6, K11, K27, K29, K29, K33, K48 ja K63). Klassikalises ubikvitineerimise reaktsioonis moodustatakse esimene isopeptiidside Lys-Gly76 ubikvitineeritava substraatvalgu ja ubikvitiini vahel ning järgneval polüubikvitiinketi pikendamisel kahe ubikvitiini vahel, kasutades eelneva ubikvitiini Lys48 ja järgneva ubikvitiini Gly76 (Joonis 3A). Selliselt polüubikvitineeritud substraat tuntakse ära ja lagundatakse 26S proteosoomi poolt (Hershko ja Ciechanover, 1998). 2004. aastal said Aaron Ciechanover, Avram Hershko ja Irwin Rose Nobeli preemia keemias ubikvitiin-vahendatud valkude degradatsioonisüsteemi avastamise eest.

1.2.2 Erinevused klassikalisest ubikvitineerimisest

1.2.2.1 Ubikvitineerimisel kasutatavad aminohapped substraatvalgus

Mitte alati ei kasutata ubikvitineerimisel substraatvalgus lüsiine. Näiteks substraatvalk p21 ubikvitineeritakse sisemistest lüsiinidest sõltumatult ning see on vajalik valgu p21 proteosomaalseks degradatsiooniks (Bloom et al., 2003). Ka teiste valkude puhul on näidatud klassikalisest erinevat ubikvitineerimist, kus substraadi polüubikvitineerimisel pannakse esimene ubikvitiini molekul substraadi N-terminaalse aminohappe $\alpha\text{-NH}_2$ rühma külge ning seejärel pikeneb polüubikvitiini kett üle klassikalise Lys48-Gly76 isopeptiidside (Breitschopf et al., 1998; ülevaade Ciechanover ja Ben-Saadon, 2004). Lisaks on kirjeldatud ka ubikvitineerimist, kus ubikvitiini konjugeerimiseks substraadile moodustatakse esterside substraadi seriini või treoniini hüdroksüülrühma -OH ja ubikvitiini vahel (Wang et al., 2007) või tioolesterside substraadi tsüsteiini tiolrühma -SH ja ubikvitiini vahel (Joonis 3B) (Cadwell ja Coscoy, 2005). Igal juhul, ükskõik millist teist aminohapet peale lüsiini substraatvalgus ubikvitineerimiseks kasutatakse, sedasi mitte-klassikaliselt ubikvitineeritud substraat saadetakse degradatsiooni (ülevaade McDowell ja Philpott, 2013).



Joonis 3. Ubikvitineerimisel kasutatavad aminohapped substraatvalgus. Substraatvalk on kujutatud heleroosaga ja peale on märgitud võimalikud ubikvitineerimisel kasutatavad aminohapped. Ubikvitiin (Ubi) on kujutatud tumeroosaga. **(A)** Klassikalisel ubikvitineerimisel lisatakse esimene ubikvitiin kovalentselt substraadi sisemise lüsiini (Lys) külge ning seejärel pikendatakse ubikvitiini ketti üle lüsiin 48 (K48). Polüubikvitineeritud substraat degradeeritakse 26S proteosoomis. **(B)** Lisaks klassikalisele lüsiinile võidakse ubikvitineerimisel substraatvalgus kasutada kas metioniini (Met), seriini (Ser), treoniini (Thr) või tsüsteiini (Cys) (Ciechanover ja Stanhill, 2014, kohandatud joonis).

1.2.2.2 Ubikvitiini lüsiinide spetsiifilisus polüubikvitiini ketis

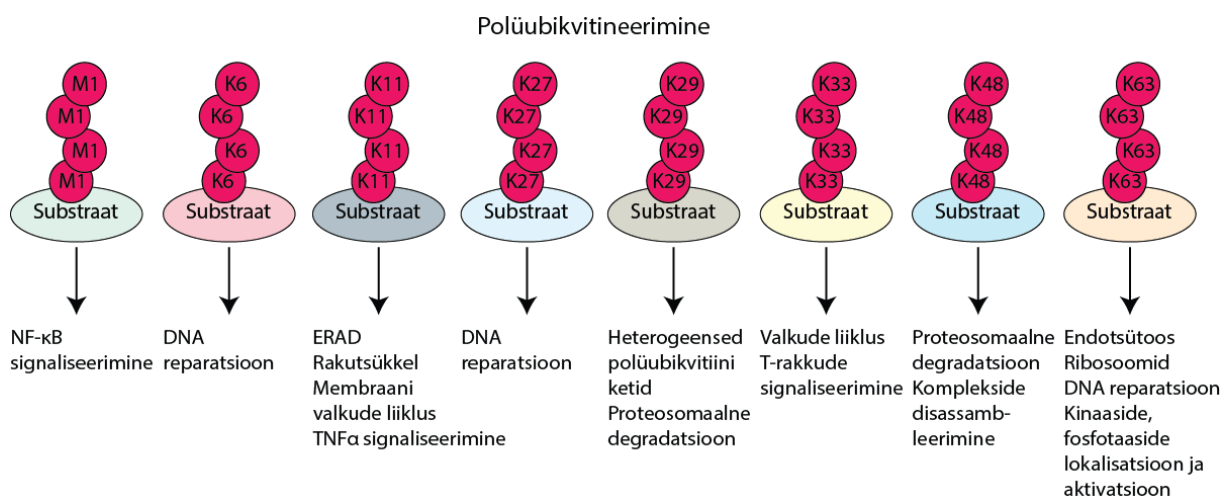
Klassikalises valkude polüubikvitineerimises kasutatakse keti moodustamiseks ubikvitiini molekulis Lys48, kuid kasutada saab ka kõiki teisi ubikvitiini molekulis olevaid lüsiine (Peng et al., 2003). Pagaripärmis on ubikvitiini lüsiinide kasutus polüubikvitiinketi moodustamisel jaotunud järgmiselt: K48 29,1%; K11 28%; K63 16,3%; K6 10,9%; K27 9%; K33 3,5%; K29 3,2% (Xu et al., 2009). Lisaks lüsiinidele võib polüubikvitiini keti moodustamiseks kasutada ka ubikvitiini esimest aminohapet, metioniini (Met1) (Kirisako et al., 2006).

Lys48 polüubikvitiini ketid on kõige levinumad (Xu et al., 2009) ja see on polüubikvitineerimise kanooniline vorm (Hershko ja Ciechanover, 1998). Lys48 polüubikvitiini ketid reguleerivad mitmeid erinevaid rakulisi protsesse enamasti märgistades valke 26S sõltuva proteosomaalse degradatsiooni jaoks (Hershko ja Ciechanover, 1998; Thrower et al., 2000). Lisaks võivad Lys48 polüubikvitiini ketid olla ka mitte-proteolüütilise funktsiooniga. Näiteks segregatsioon p97 tunneb ära Lys48 polüubikvitiini kette immobiliseerunud rakulistes kompartmentides või mõnes suures valgukompleksis ning põhjustab ubikvitineeritud substraadi eraldumise kompleksist (Li and Ye, 2008). Valk p97 osaleb ka CMG kompleksi disassembleerumises DNA replikatsiooni lõpus (Maric et al., 2014; Moreno et al., 2014).

Lys11 polüubikvitiini ketid on proteosomaalse degradatsiooni signaaliks rakutsükli regulatsioonis (ülevaade Wickliffe et al., 2011). Lisaks osalevad Lys11 polüubikvitiini ketid valkude endoplasmaatilise retiikulumi-sõltuvas degradatsioonis ERAD (ingl *endoplasmic reticulum-associated degradation*) (Xu et al., 2009), membraani valkude liikluses (ingl membraane trafficking) (Goto et al., 2010) ja TNF α signaliseerimises (Dynek et al., 2010).

Lys63 polüubikvitiini ketid reguleerivad plasmamembraani valkude endotsütoosi, kusjuures ka Lys63 monoubikvitineerimine on piisav (Galan ja Haguenaer-Tsapis, 1997). Lys63 polüubikvitiini keti rolli on näidatud ka ribosoomide funktsioonis (Spence et al., 2000), DNA kahjustuste parandamises (Spence et al., 1995) ja mitmete kinaaside, fosfotaaside lokaliseerimises ning aktivatsioonis (Yang et al., 2010).

Ülejäänud lüsiinide polüubikvitiini kettide funktsiooni kohta rakus on suhteliselt vähe teada. Nii Lys6 kui Lys27 polüubikvitiini ketid omavad rolli DNA kahjustustega toimetulekus (Gatti et al., 2015; Nishikawa et al., 2004) ning Lys27 osaleb ka mitokondri kahjustuste äratundmises (Geisler et al., 2010). Lys33 polüubikvitineerimine on oluline valkude liikluses (ingl *protein trafficking*) (Yuan et al., 2014) ja T-rakkude signalseerimises (Huang et al., 2010). Lys29 osaleb proteosomaalses lagundamises, kuigi keti moodustamiseks on vaja lisaks ka Lys48 (Johnson et al., 1995). Met1 kaudu moodustunud lineaarsed polüubikvitiini ketid (Kirisako et al., 2006) on olulised NF- κ B (ingl *nuclear factor- κ B*) signalseerimises (Iwai ja Tokunaga, 2009). Näiteid võib leida veel mitmeid, kus spetsiifilisel polüubikvitiini ketil on rakus kindel roll (Joonis 4) (Kulathu ja Komander, 2012).

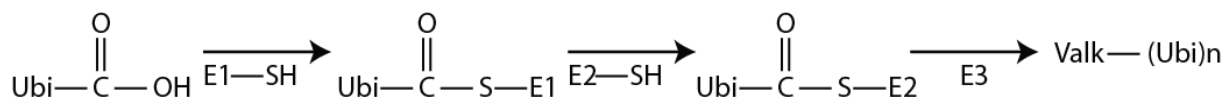


Joonis 4. Polüubikvitineeritud valkude füsioloogiline roll. Substraatvalgud on tähistatud eri värvidega, ubikvitiini molekulid tumeroosaga, kus peale on kirjutatud, millist ubikvitiini aminohapet polüubikvitiini keti moodustamisel kasutati (metioniin – M, lüsiin – K). Numbriga on tähistatud mitmes aminohape see ubikvitiini molekulis on. Iga polüubikvitiini keti kohta on ära toodud selle levinumad teadaolevad füsioloogilised rollid (Kulathu ja Komander, 2012, kohandatud joonis).

1.2.3 Ubikvitineerimises osalevad ensüümid

Ubikvitineerimine on kolme-sammuline ensümaatiline reaktsioon, milles osalevad ubikvitiini-aktiveeriv ensüüm E1, ubikvitiini-konjugeeriv ensüüm E2 ja ubikvitiin-proteiin ligaas E3 (Joonis 5) (Hershko et al., 1983). Esimese sammuna aktiveeritakse ubikvitiini C-terminaalne Gly ATP-sõltuvalt E1 poolt ning seejärel seondub aktiveeritud ubikvitiin tiolestersidemega

E1 aktiivsai Cys külge. Edasi kantakse aktiveeritud ubikvitiin üle E2 aktiivsai Cys külge ning E3 katalüüsib ubikvitiini ülekannet E2-lt substraadile. Klassikalises ubikvitineerimises moodustub ubikvitiini C-terminuse Gly -COOH ja substraatvalgu Lys ϵ -NH₂ vahel isopeptiidside (Hershko ja Ciechanover, 1998). Monoubikvitineerimisel lisatakse substraadi Lys jäägi külge üks ubikvitiin, poliubikvitineerimisel mitu ubikvitiini, kusjuures iga järgneva ubikvitiini lisamisel toimuvad samad ensümaatilised reaktsioonid, aga substraadiks on ketis eelnev ubikvitiin (Hershko ja Ciechanover, 1998).



Joonis 5. Ubikvitineerimise ensümaatiliste reaktsioonide skeem. Ubikvitineerimine on kolme-sammuline ensümaatiline reaktsioon, milles osalevad ubikvitiini-aktiveeriv ensüüm E1, ubikvitiini-konjugeeriv ensüüm E2 ja ubikvitiin-proteiin ligaas E3 (Hershko ja Ciechanover, 1998, kohandatud joonis).

Inimese proteoom sisaldab kahte E1 (Groettrup et al., 2008), 38 E2 (Ye ja Rape, 2009) ja üle 600 E3 (Deshaies ja Joazeiro, 2009) ensüümi. E3 ligaasid on kas valgud või valgukompleksid, mis jaotatakse kahte klassi vastavalt sellele, millist katalüütilist domääni nad sisaldavad, kas HECT domääni (ingl *Homologous to E6-AP C-Terminus*) (Huibregtse et al., 1995) või RING domääni (ingl *Really Interesting New Gene*) (Lorick et al., 1999). Erinevus seisneb selles, et HECT domääniga E3 ligaasi puhul kantakse ubikvitiin tiolestersidemega üle kõigepealt E3 aktiivsai ja siis alles substraadile, kuid RING domääniga E3 ligaasid vahendavad ubikvitiini otsest ülekannet E2-lt substraadile (Petroski ja Deshaies, 2005).

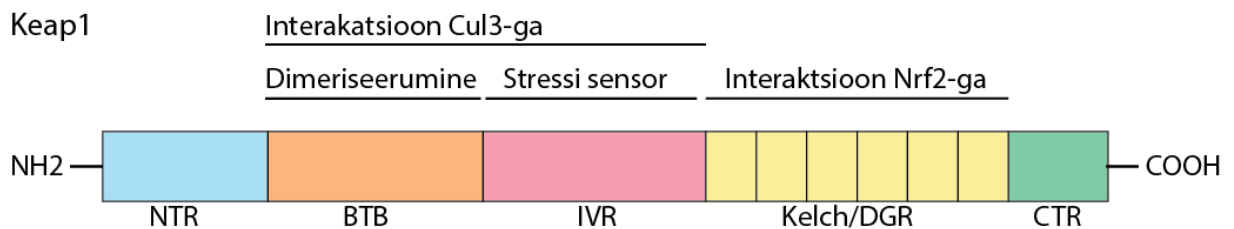
Kulliin-RING ligaasid CRL (ingl *Cullin-RING ligases*) on suurim E3 ubikvitiini ligaaside superperekkond eukarüootides (Bulatov ja Ciulli, 2015). CRL-id koosnevad mitmest alaühikust, kus kulliinid moodustavad platvormi E3 ligaaskompleksi kokkupanekuks ja RING domääniga valgul on katalüütiline aktiivsus (Petroski ja Deshaies, 2005). Kirjeldatud on seitse kulliini, mis moodustavad erinevaid CRL komplekse (Dias et al., 2002). CRL3 on üks alamperekondadest, mis koosneb platvormvalgust Cul3 (ingl *Cullin 3*) ja RING-domääniga valgust Rbx1 (ingl *RING-box protein 1*) (Kamura et al., 1999) ning kompleksi kuulub ka BTB-domääniga substraadi spetsiifilisuse faktor (Geyer et al., 2003; Pintard et al., 2003). BTB domääniga valgud kasutavad N-terminuses olevat BTB domääni Cul3-ga seondumiseks ja C-terminuses olevat valk-valk interaktsiooni domääni substraadiga seondumiseks (Stogios et al., 2005). Cul3-le seonduva BTB domääniga substraadi spetsiifilisuse faktorite hulka kuulub ka oksüdatiivse stressi sensorvalk Keap1 (ingl *Kelch-like ECH-associated proteiin 1*) (Cullinan et al., 2004; Kobayashi et al., 2004), millele keskenduti antud uurimistöös.

1.3. Keap1 kui ubikvitineerimise substraadi spetsiifilisuse faktor ja selle roll oksüdatiivse stressi vastusradades

Rakud puutuvad kokku mitmesuguste nii eksogeensete kui endogeensete mõjuritega, mis võivad kahjustada rakulisi struktuure ja protsesse. Oksüdatiivne stress mängib olulist rolli paljude haiguste, sealhulgas kasvajate tekkes ja arengus (ülevaade Valko et al., 2007). Keap1-Nrf2 rada on raku primaarne kaitsemehhanism vastusena oksüdatiivsele ja elektrofiilsele stressile (Itoh et al., 1999).

1.3.1 Keap1 struktuur

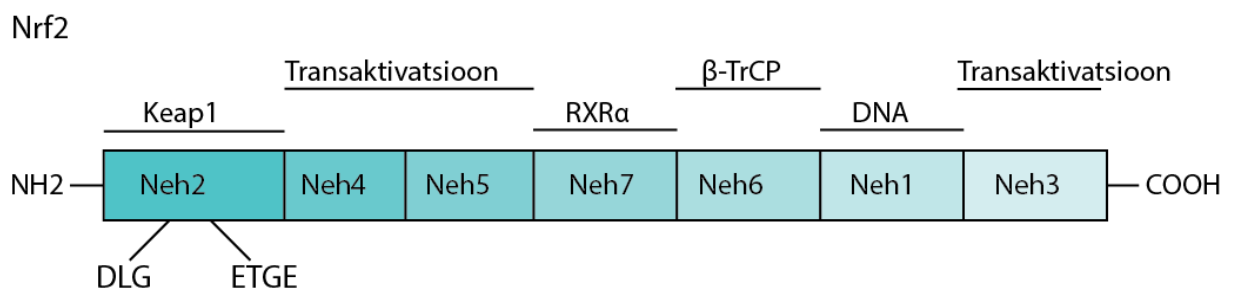
Inimese Keap1 on 624 ah pikkune valk, mis koosneb viiest domäänist: (1) N-terminaalne regioon NTR, (2) BTB domään (ingl *Broad-Complex*, *Tramtrack* and *Bric-a-brac*), (3) IVR domään (ingl *Intervening region*), (4) Kelch/DGR domään (ingl *Kelch domain/double glycine repeat*) ja (5) C-terminaalne regioon CTR (Ogura et al., 2010) (Joonis 6). BTB on vajalik Keap1 homodimeriseerumiseks ja Cul3-ga interaktsiooniks (Furukawa ja Xiong, 2005; Zipper ja Mulcahy, 2002). IVR on oksüdatsiooni tundlik ja omab kriitilisi, väga reaktiivseid tsüsteiini jääke, mis toimivad Keap1 valgus redoks-sensoritena (Dinkova-Kostova et al., 2002). IVR domään on samuti vajalik Cul3-E3 ligaaskompleksiga interakteerumiseks (Kobayashi et al., 2004). Kelch/DGR seondub spetsiifiliselt Nrf2 konserveerunud Neh2 domääni ja aktiiniga (Itoh et al., 1999; Kang et al., 2004). CTR ja IVR on mõlemad vajalikud Nrf2 hoidmiseks tsütoplasmas (Kang et al., 2004). Lisaks on Keap1 IVR domäänis tuumast ekspordi signaal NES, mille kaudu reguleeritakse Keap1-Nrf2 kompleksi transporti tuumast tsütoplasmasse (Sun et al., 2007).



Joonis 6. Keap1 struktuur. Keap1 koosneb viiest domäänist: (1) NTR; (2) BTB domään, mis vastutab Keap1 homodimeriseerumise ja Cul3-ga interaktsiooni eest; (3) IVR on stressile väga tundlik regioon, lisaks osaleb samuti Cul3-ga interakteerumisel; (4) Kelch/DGR domään on vajalik nii aktiiviga kui Nrf2-ga interaktsiooniks; (5) CTR osaleb koos IVR-iga normaaltingimustes Nrf2 tsütoplasmas hoidmises (Namani et al., 2014, kohandatud joonis).

1.3.2 Keap1-sõltuv Nrf2 regulatsioon

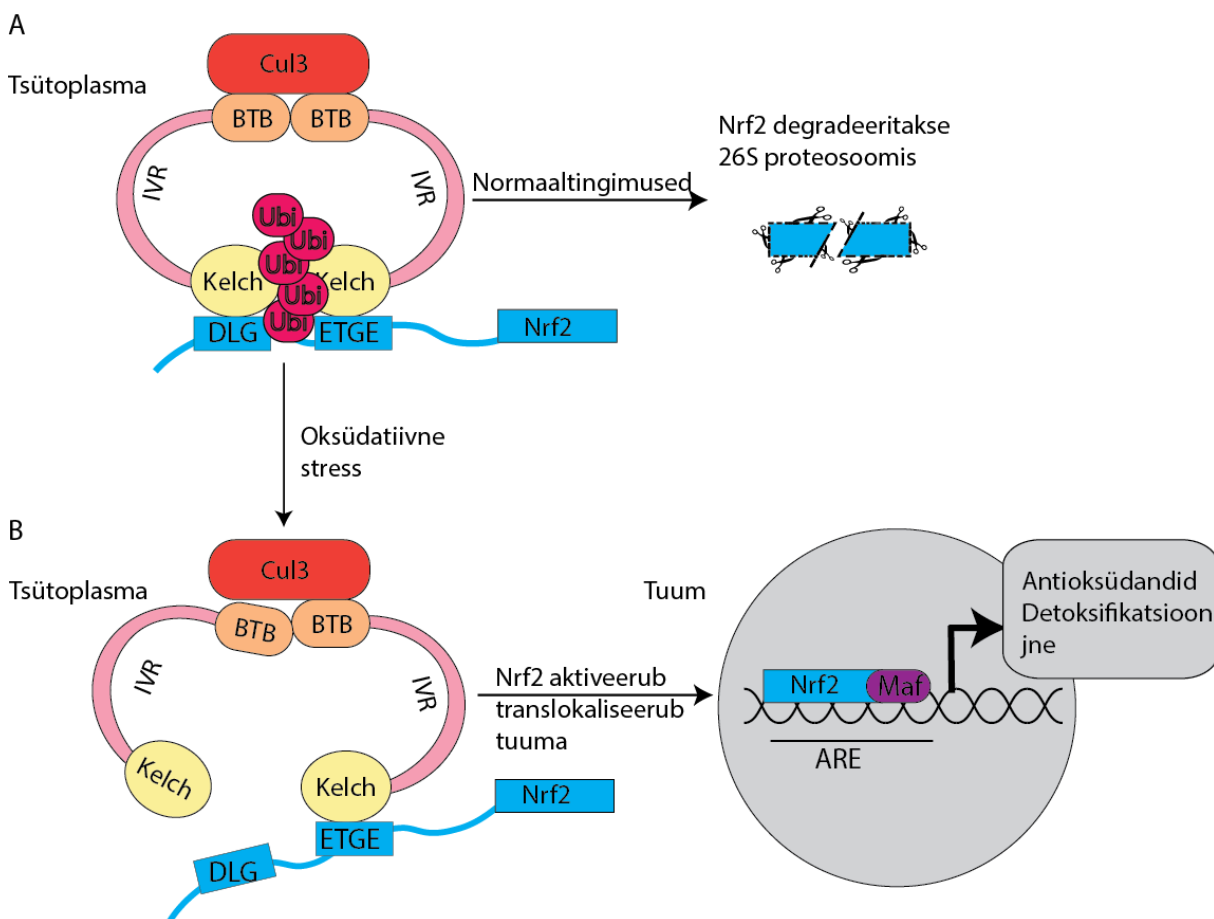
Inimese Nrf2 on 605 ah pikkune valk, mis koosneb seitsmest funktsionaalsest domäänist: Neh1-Neh7 (*Nrf2-ECH homology*) (Joonis 7) (Itoh et al., 1999; Wang et al., 2013). Nrf2 N-terminaalne domään Neh2 sisaldab kahte motiivi DLG ja ETGE, mis mõlemad on vajalikud Keap1-ga interaktsiooniks. DLG motiiv on nõrgema afiinsusega ja ETGE tugevama afiinsusega Keap1 suhtes (Kato et al., 2005; Tong et al., 2006a).



Joonis 7. Nrf2 struktuur. Transkriptsioonifaktor Nrf2 koosneb seitsmest domäänist: Neh1-7. Valgu kõige N-terminaalsem domään Neh2 sisaldab kahte motiivi, DLG ja ETGE, mis mõlemad on vajalikud Keap1-ga interaktsiooniks. Neh3, Neh4 ja Neh5 on olulised Nrf2 interaktsiooniks teiste transkriptsiooni koaktivaatoritega. Neh6 on vajalik Nrf2 Keap1-st sõltumatu Nrf2 degradatsiooni jaoks ning Neh7 on hiljuti kirjeldatud domään, mis osaleb seondumisel tuumaretseptori RXR α -ga. Neh1 on vajalik väikeste Maf valkudega heterodimeriseerumiseks ja DNA-ga seondumiseks (Namani et al., 2014, kohandatud joonis).

Keap1 on raku tsütoskeleti aktiini külge aheldatud multifunktsionaalne valk, mis normaaltingimustes represserib Nrf2 aktiivsust (Itoh et al., 1999; Kang et al., 2004). Homodimeerne „kirsipaari“ (ingl *Cherry-bob*) struktuuriga Keap1 tunneb ära ja seondub Nrf2 molekulis kahele evolutsiooniliselt konserveerunud degronile, DLG ja ETGE-le (Kato et al., 2005; Kobayashi et al., 2002; Ogura et al., 2010). Normaaltingimustes Nrf2 ubiquitineeritakse Keap1-Cul3-E3 ligaaskompleksi poolt ja degradeeritakse proteosomaalselt (Joonis 8A). Oksüdatiivse/elektrofiilse stressi olukorras modifitseeritakse kovalentselt Keap1 molekulis olevaid tsüsteiini jääke, Keap1 laseb DLG motiivist lahti ja sellega inaktiveeritakse Keap1

inhibitoorne mõju valgule Nrf2. (Dinkova-Kostova et al., 2002; Tong et al., 2006b; Zhang et al., 2004). Rakus akumulunud Nrf2 translokaliseerub tuuma, kus ta heterodimeriseerub väikeste Maf valkudega ning aktiveerib erinevate ARE-sõltuvate detoksifitseerivate, antioksüdeerivate ensüümide ja teiste valkude geeniekspressiooni (Joonis 8B) (Itoh et al., 1997).



Joonis 8. Keap1-Nrf2 rada rakus. (A) Homodimeerne Keap1 on Cul3-E3 ligaaskompleksis substraadi spetsiifilisuse faktor. Normaalingimustes Nrf2 ubikvitineeritakse ja degradeeritakse 26S proteosoomist sõltuvalt. (B) Oksüdatiivse/elektrofilise stressi olukorras modifitseeritakse kovalentselt Keap1 valgus olevaid tsüsteiini jääke, mille tulemusena Nrf2-te ei ubikvitineerita ega lagundata enam proteosoomis. Rakus kuhjunud Nrf2 liigub tuuma, heterodimeriseerub erinevate Maf valkudega ning aktiveerib mitmete ARE-sõltuvate geenide ekspressiooni (Kansanen et al., 2012, kohandatud joonis)

1.3.3 Keap1-Nrf2 raja roll kasvajakud

Valgul Nrf2 on kaitsev roll mitte ainult normaalsetes rakkudes aga ka kasvaja rakkudes, kus vead Keap1-Nrf2 rajas põhjustavad konstitutiivset Nrf2 aktivatsiooni ja tema sihtmärkgeenide ülesregulatsiooni (ülevaade Leinonen et al., 2014). Enamus inimese kasvajates kirjeldatud somaatilisi mutatsioone Keap1 valgus rikuvad ära interaktsiooni Nrf2-ga (Singh et al., 2006). Samuti on somaatilised mutatsioonid Nrf2-s jaotunud DLG ja ETGE motiivide vahel, mis on otseselt vajalikud Keap1-ga seondumiseks (Shibata et al., 2008). Mõlemal juhul on

tulemuseks Nrf2 sihtmärkgeenide pidev ekspressioon, mis põhjustab kasvajakakkude resistentsust oksüdatiivsele ja ksenobiootilisele stressile ja paremat ellujäämist kemoterapia ning kiiritusravi tingimustes (ülevaade Taguchi et al., 2011).

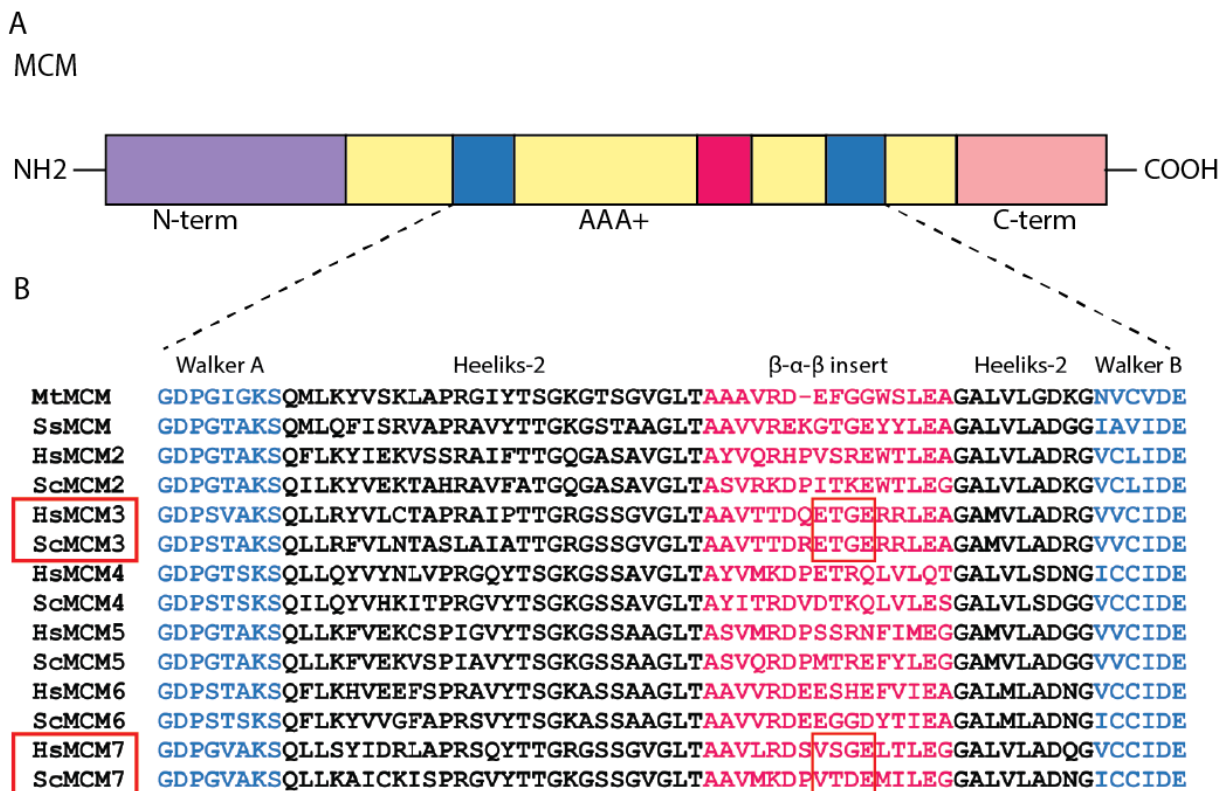
1.4. Replikatiivse MCM2-7 helikaasi alaühikud Keap1 interaktsioonipartneritena

Proteoomi analüüsid on näidanud, et valgul Keap1 on veel mitmeid interaktsiooni partnereid, mis sisaldavad ETGE motiivi sarnaselt Nrf2-le. Üks nendest on replikatiivse helikaasi alaühik MCM3, mis interakteerub Keap1-ga läbi ETGE motiivi (Hast et al., 2013). MCM3-Keap1 vahelist interaktsiooni on kinnitatud ka meie laboris varem läbi viidud biokeemilistes katsetes, kus lisaks leiti ka, et Keap1 interakteerub veel teise replikatiivse helikaasi alaühiku MCM7-ga (Ivar Ilves, avaldamata andmed).

1.4.1 MCM-i struktuur

Kõik kuus helikaasi alaühikut MCM2-7 kuuluvad funktsioonilt heterogeensesse AAA+ (ingl *ATPases Associated with diverse cellular Activities*) valguperekonda, mida iseloomustab struktuurilt konserveerunud ATPaasne moodul (Neuwald et al., 1999; Ogura ja Wilkinson, 2001). Lisaks AAA+ ATPaasale domäänile sisaldavad MCM valgud ka N-terminaalset ja C-terminaalset domääni (Joonis 9A) (ülevaade Sakakibara et al., 2009). N-terminaalne domään vahendab heksameeri moodustumist, seondub DNA-le ning reguleerib helikaasi protsessiivsust ja polaarsust. AAA+ on valguperekonda iseloomustav domään, mis vastutab helikaasi katalüütilise aktiivsuse eest (Barry et al., 2007; Jenkinson ja Chong, 2006). Kõik kolm domääni sisaldavad mitmeid erinevaid funktsionaalselt olulisi motiive (Costa ja Onesti, 2009). MCM-idele ja teistele H2I alamperekonna liikmetele on omane, et Walker A ja Walker B järjestuste vahele jäävas heeliks-2 motiivis on β - α - β insert (H2I, ingl *helix-2 insert*) (Iyer et al., 2004). Keap1-ga interaktsiooniks vajalikud aminohapped ETGE asuvad MCM3 primaarjärjestuses just selles inserdis ning on osa inserdist moodustunud β -juuksenõela sekundaarstruktuurist (H2I-hp, ingl *helix-2 insert hairpin*) (Joonis 9B) (Jenkinson ja Chong, 2006). Kokku on MCM-ides neli β -juuksenõela, millest kolm on AAA+ domäänis (Brewster et al., 2008). MCM3 H2I-juuksenõel, mis sisaldab endas Keap1-ga interaktsiooniks vajalikku ETGE aminohappejärjestust, ulatub välja MCM helikaasi kompleksi keskel olevasse kanalisse, mida mööda jookseb replikatsioonil ssDNA ahel (Brewster et al., 2008; Jenkinson ja Chong, 2006). Ainsana teistest inimese MCM2-7 helikaasi kompleksi alaühikutest sisaldab sarnast motiivi valk MCM7, millel on samas kohas sarnane VSGE motiiv. Keap1-ga

interakteerumiseks ei pea ETGE motiiv olema täiuslik, näiteks valk p62/SQSTM1 interakteerub Keap1-ga läbi STGE motiivi ja konkureerib seeläbi Nrf2-ga (Jain et al., 2010; Komatsu et al., 2010). Seega võiks valgus MCM7 olev VSGE olla samuti sobilik Keap1-ga interakteerumiseks.



Joonis 9. MCM-ide struktuur. (A) MCM-id koosnevad kolmest domäänist: N-terminaalne (N-term), AAA+ ja C-terminaalne (C-term) domään. (B) MCM-ide joondus Walker A motiivist kuni Walker B motiivi lõpuni. Walker motiivid on tähistatud oranžiga, β - α - β insert roosaga. Referentsjärjestused on võetud NCBI andmebaasist ja joondamisel on kasutatud BioEdit programmi. MCM-ide joondamisel kasutati järgmisi järjestusi: *MtMCM*, *Methanothermobacter thermautotrophicus* MCM (NP_276876.1); *SsMCM*, *Sulfolobus solfataricus* MCM (NP_342281.1); *HsMCM2-7* *Homo Sapiens* MCM2-7 (MCM2 NP_004517.2, MCM3 NM_002388.4, MCM4 NP_005905.2, MCM5 NP_006730.2, MCM6 NP_005906.2, MCM7 NP_005907.3); *ScMCM2-7*, *Saccharomyces cerevisiae* MCM2-7 (MCM2 NP_009530.1, MCM3 NP_010882.1, MCM4 NP_015344.1, MCM5 NP_013376.1, MCM6 NP_011314.2, MCM7 NP_009761.4) (Jenkinson ja Chong, 2006, kohandatud joonis).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Antud magistritöö eesmärgiks oli uurida:

- 1) kas ja kuidas on valk Keap1 seotud replikatiivse helikaasi kompleksi alaühikute MCM3 ja MCM7 ubikvitineerimise ning ubikvitineerimisest sõltuva degradatsiooniga 26S proteosoomis;
- 2) kui MCM3 ubikvitineerimine ja degradatsioon on Keap1 sõltuv, siis kas see on rakus reguleeritud oksüdatiivse stressi poolt.

Keap1 ja MCM3 vahelist interaktsiooni on varem näidatud nii meie laboris kui teiste poolt (Hast et al., 2013), kuid Keap1 ja MCM7 vahelist interaktsiooni ainult meie laboris (Ivar Ilves, avaldamata andmed). Hüpootees MCM3 ja MCM7 ubikvitineerimisest ning 26S proteosomaalsest degradatsioonist, samuti selle reguleerimisest oksüdatiivse stressi poolt, tuleneb analoogiast Nrf2-ga, mis on seni kõige tuntum Keap1 substraat. Nii nagu valgul Nrf2, on ka valgul MCM3 Keap1-ga interakteerumiseks vajalik ETGE motiiv, valgul MCM7 on sarnane VSGE motiiv. Töö eesmärkide saavutamiseks kasutati U2OS rakkude transfekteerimist, valkude immuunosadestamist ja *Western-blot* meetodit.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud ekspressioonivektorid

Antud töös kasutati kaheksaüksikut ekspressioonivektoreid, metsiktüüpi valku ekspresseerivad vektorid on tähistatud wt (või pole üldse märget taga) ja mutantset valku ekspresseerivad vektorid on tähistatud mut. Aminohapped, mis on kriitilised Keap1-ga interaktsiooniks, on muteeritud MCM3, MCM7 ja Nrf2 valkudes asendatudalaniinidega. Muteeritud Keap1-s on samuti vastavate valkudega interaktsiooniks vajalikud aminohapped asendatudalaniinidega. Meie laboris on tõestatud, et antud mutatsioonid on piisavad interaktsiooni ära lõhkumiseks *in vitro* (Ivar ilves, avaldamata andmed). Tabelis 1 on esitatud kokkuvõtvalt kasutatavate vektorite andmed.

Tabel 1. Antud töös kasutatavad ekspressioonivektorid. Lühend wt tähistab metsiktüüpi ja mut muteeritud valku. Viite veerus on näidatud täpselt ära, missugused vektorid tegi antud töö autor, millised on tehtud meie laboris kolleegide poolt ning millised on tellitud. Samuti on tabelis ära toodud referents järjestuse kood NCBI andmebaasis. Selgituse veerus on sulgudes näidatud, mis aminohape on antud valgus milliselega asendatud. Antud magistritöö autori poolt tehtud HA-Ubi konstrukti kasutati ainult metsiktüüpi ubikvitiini ekspresseerimiseks ja sellepärast pole HA-Ubi tähistatud. pRK5 vektoris olevad ubikvitiini mutandid on täpsemalt lahti seletatud järgnevas alapunktides.

Vektor	Viide	Referents järjestus NCBI andmebaasis	Selgitus
Flag-MCM3 wt	Siret Somarokov	NM_002388.4	Ekspresseerib metsiktüüpi Flag-märgisega MCM3 valku
Flag-MCM3 mut	Siret Somarokov	NM_002388.4	Ekspresseerib muteeritud (T388A) Flag-märgisega MCM3 valku
Flag-Nrf2 wt	Antud töö	NM_006164.4	Ekspresseerib metsiktüüpi Flag-märgisega Nrf2 valku
Flag-Nrf2 mut	Antud töö	NM_006164.4	Ekspresseerib muteeritud (T80A) Flag-märgisega Nrf2 valku
E2-MCM7 wt	Antud töö	NM_005916.4	Ekspresseerib metsiktüüpi E2-märgisega MCM7 valku
E2-MCM7 mut	Antud töö	NM_005916.4	Ekspresseerib muteeritud (E426A) E2-märgisega MCM7 valku
Strep-Keap1 wt	Siret Somarokov	NM_203500.1	Ekspresseerib metsiktüüpi Strep-märgisega Keap1 valku
Strep-Keap1 mut	Siret Somarokov	NM_203500.1	Ekspresseerib muteeritud (R380A ja R415A) Strep-märgisega Keap1 valku

HA-Ubi	Antud töö	NM_021009.6	Ekspressseerib metsiktüüpi HA-märgisega poliubikvitiin C valku
pRK5-HA-Ubiquitin-WT	Addgene plasmiid # 17608	NM_021009.6	Ekspressseerib metsiktüüpi HA-märgisega poliubikvitiin C valku
pRK5-HA-Ubiquitin-KO	Addgene plasmiid # 17603	NM_021009.6	Ekspressseerib muteeritud HA-märgisega poliubikvitiin C valku
pRK5-HA-Ubiquitin-K48R	Addgene plasmiid # 17604	NM_021009.6	Ekspressseerib muteeritud HA-märgisega poliubikvitiin C valku
pRK5-HA-Ubiquitin-K48	Addgene plasmiid # 17605	NM_021009.6	Ekspressseerib muteeritud HA-märgisega poliubikvitiin C valku
pRK5-HA-Ubiquitin-K63	Addgene plasmiid # 17606	NM_021009.6	Ekspressseerib muteeritud HA-märgisega poliubikvitiin C valku
pRK5-HA-Ubiquitin-K11	Addgene plasmiid # 22901	NM_021009.6	Ekspressseerib muteeritud HA-märgisega poliubikvitiin C valku

2.2.2 Ekspressioonivektorite kloneerimine

2.2.2.1 Polümeraasi ahelreaktsioon

Ekspressioonivektorite valmistamist alustati sobivate restriiktaasi äratundmisjärjestuste ja epitoopmärgiste (HA- ja Flag-märgised) lisamisega kloneeritavale cDNA-le kasutades polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR). Amplifitseerimisel kasutati Phusion DNA polümeraasi (Finnzymes) ja vastavaid praimereid, mis on ära toodud Tabel 2. Reaktsioon viidi läbi termotsükleris (TProfessional Thermocycler, Biometra) kasutades järgnevat programmi: 30 sekundit 98°C, 33 tsüklit 10 sekundit 98°C ja 1 minut 72°C ning viimane ekstensioon 7 minutit 72°C juures. PCR produkte analüüsiti 1% agarosgeelis DNA geelektroforeesil ja õige pikkusega fragmendid lõigati geelist välja ning puhastati kasutades NucleoSpin® Gel ja PCR Clean-up (Machery-Nagel) kolonne vastavalt tootjapoolsele juhendile.

Flag-Nrf2 konstrukti valmistamiseks PCR-is matriitsina kasutatud cDNA on pärit firma PlasmID Dana-Farber/Harvard Cancer Center plasmidikogust (HsCD00079566). E2-MCM7 konstrukti valmistamiseks kasutatud Flag-MCM7 wt ja Flag-MCM7 mut plasmiidid on pärit meie labori kollektsioonist. Ubikvitiini cDNA-d sisaldav plasmiid saadi kingitusena A. Meritsa laborist. Kõik PCR-is kasutatud praimerid (Microsynth), nende abil lisatud

epitoomärgised ja restriктаasi äratundmisjärjestused, on kirjeldatud Tabel 2. MCM7 puhul polnud vaja märgist lisada, sest E2-märgis tuleb vektorist, kuhu hiljem konstruktid kloneeriti.

Tabel 2. PCR-is kasutatavad praimerid ning nende abil lisatud epitoomärgised ja restriктаaside äratundmisjärjestused. Lühend Fw tähistab *forward* ja Rev *reverse* praimerit. Esimeses veerus on ära toodud valmistatud konstruktid nimesed, teises kasutatud praimerid ja kolmandas veerus on näidatud praimerid järjestus, mis sisaldab endas lisatavat märgist (veerg 4) ja restriктаasi äratundmisjärjestust (veerg 5).

Konstrukt	Praimer	Järjestus 5' - 3' orientatsioonis	Lisatav märgis	Restriктаas
Flag-Nrf2	FlagHsNRF2-Fw	GCGGGATCCATGGATTA CAAGGATGACGACGAT AAGGGCGCTATGATGG ACTTGGAGCTGCCG	Flag	BamHI
	HsNRF2-Rev	CGGGTACCCTAGTTTTT CTTAACATCTGGCTTCT TACTTTTGGGAAC	puudub	KpnI
E2-MCM7 wt	HsMCM7-Fw	CGCAGATCTATGGCACT GAAGGACTACGCG	puudub	BglII
	HsMCM7-Rev	GCCCGGGTCAGACAAA AGTGATCCGTGTCCG	puudub	SmaI
E2-MCM7 mut	HsMCM7-Fw	CGCAGATCTATGGCACT GAAGGACTACGCG	puudub	BglII
	HsMCM7-Rev	GCCCGGGTCAGACAAA AGTGATCCGTGTCCG	puudub	SmaI
HA-Ubi	HAHsUbi-fw	CGCGGATCCATGTACCC ATACGATGTTCCGGATT ACGCTGGAATGCAGATC TTCGTGAAAACCCTTAC	HA	BamHI
	HsUbi-rev	CGCAAGCTTCTAACCAC CTCTCAGACGCAGGAC	puudub	HindIII

2.2.2.2 Restriksioon

Puhastatud PCR produktid restrikteeriti kasutades vastavaid FastDigest ensüüme (Thermo Scientific), mille äratundmisjärjestus PCR-is lisati (Tabel 2). Restrikteeritud PCR produkt puhastati uuesti kasutades NucleoSpin® Gel ja PCR Clean-up (Machery-Nagel) kolonne.

Konstruktid Flag-Nrf2 ja HA-Ubi kloneeriti pQM-C_{Tag}/A_i⁺ plasmidi (Quattromed) ning E2-MCM7 wt ja E2-MCM7 mut pQM-N_{Tag}/A_i⁺ plasmidi (Quattromed) multikloneerimisalasse. Mõlemad plasmiidid sisaldavad Simian viirus 40-e (SV40) replikatsiooni alguspiirkonda, polü-A järjestust, ampitsilliini resistentsusgeeni, tsütomegaloviiruse (CMV) promooterit ja E2 märgist. Plasmiidide erinevus seisneb selles, kas E2-märgis asub C- või N- terminuses. Flag-Nrf2 konstrukti lõppu disainiti STOP-koodon ehk

E2-märgist C-terminusse ei lisatud. E2-MCM7 konstruktid disainiti nii, et N-terminuses olev E2-märgis jooksis samas lugemisraamis MCM7 cDNA-ga.

Kloneerimisel kasutatud plasmide, pQM-C_{Tag}/Ai⁺ ja pQM-N_{Tag}/Ai⁺, restrikteeriti vastavate ensüümide või nende isokaudomeeridega (äratundmisjärjestus on erinev, kuid annavad restrikteerimisel sama kleepuva otsa) kui puhastatud kloneeritavaid PCR produkte. Et tühi vektor tagasi kokku ei läheks, teostati plasmiididele fosfotaasi töötlus kasutades FastAP (Fermentas) fosfotaasi. Tulemusi analüüsiti 1% agarosgeelis DNA geelektroforeesi ja õige pikkusega fragmendid lõigati geelist välja ning puhastati kasutades NucleoSpin® Gel ja PCR Clean-up (Machery-Nagel) kolonne.

2.2.2.3 Ligatsioon ja transformatsioon

Restrikteeritud vektori ja PCR produkti ligeerimiseks kasutati T4 ligaasi (Thermo Scientific). Transformatsiooniks kasutati *E.coli* tüve DH5 α kompetentseid rakke, mis valmistati meie laboris kolleegide poolt. 100 μ l rakkudele lisati 10 μ l ligatsioonisegu, suspendeeriti õrnalt ning inkubeeriti jääl 30 minutit. Seejärel teostati kuumašokk 90 sekundit 42 °C juures ning inkubeeriti jääl 3 minutit. Plasmiidne DNA eraldati kasutades FavorPrep Plasmid DNA Extraction reagentide komplekti vastavalt tootjapoolsele juhendile.

2.2.2.4 Plasmiidse DNA kontroll

Kloneerimise õnnestumist kontrolliti kas restriksioon analüüsil või koloonia-PCR meetodil. Flag-Nrf2 valmis konstrukti restriksioon analüüsil kasutati restriктаase HindIII ja XhoI. E2-MCM7 wt, E2-MCM7 mut ja HA-Ubi valmis konstrukte kontrolliti koloonia-PCR meetodil. Amplifitseerimisel kasutati Taq polümeraasi (Finnzymes) ja samu praimereid, millega PCR produktid kloneeriti (Tabel 2). Matriits DNA saadi otse LB-agarplaatidel kasvanud bakterikolooniatest. Reaktsiooniks kasutati järgnevat programmi: 3 minutit 95°C, 30 tsüklit 45 sekundit 94°C, 45 sekundit 58 °C ja 1 minut 72°C ning viimane ekstensioon 7 minutit 72°C juures. Nii restriksioon analüüsi kui koloonia-PCR tulemusi analüüsiti 1% agarosgeelis DNA elektroforeesil ja õige pikkusega inserti sisaldavad plasmiidid transformeeriti uuesti. DNA eraldati kasutades endotoksiinide vaba NucleoBond® Xtra Midi EF plasmiidse DNA puhastamise reagentide komplekti vastavalt tootjapoolsele juhendile.

2.2.3 Mutatsiooni sisseviimine Flag-Nrf2 plasmidi PCR meetodil

MCM7 valgu puhul oli meie laboris olemas juba valmis metsiktüüpi ja mutantsed ekspressioonivektorid, kuid nendelt plasmiididelt ekspresseeriti Flag-märgisega MCM7

valku. Antud töö katsete jaoks oli vaja aga E2-märgisega MCM7 valku, sellepärast kloneeriti MCM7 ümber pQM-NTag/Ai+ vektorisse.

Nrf2 puhul valmistati esimesena metsiktüüpi konstrukt ja seejärel mutantne. Mutatsioon viidi sisse PCR meetodid, kus matriitsina kasutati juba valmis tehtud metsikrüüpi Flag-Nrf2 konstrukti. Amplifitseerimisel kasutati Phusion DNA polümeraasi (Finnzymes) ning praimereid HsNRF2T80A-Fw ja HsNRF2T80A-Rev (Microsynth) (Tabel 3). Reaktsiooniks kasutati järgnevat programmi: 30 sekundit 98°C, 33 tsüklit 10 sekundit 98°C, 10 sekundit 62°C ja 3,5 minut 72°C. Viimast ekstensiooni ei tehtud, et soodustada kleepuvate otste tekkimist. PCR produkti töödeldi DpnI restriктаasiga, mis tunneb ära ja restrikteerib bakteriaalse päritoluga metüleeritud DNA-d. Seega pärast restriктаasi töötlust jäi segusse ainult mutatsiooniga lineaarne Flag-Nrf2 plasmid. Produkti olemasolu kontrolliti geelelektroforeesil. Mutatsiooniga PCR produkt transformeeriti ja DNA eraldati kasutades endotoksiinide vaba NucleoBond® Xtra Midi EF plasmidse DNA puhastamise reagentide komplekti.

Tabel 3. Flag-Nrf2 mut konstrukti tegemisel kasutatud praimerid. Tabelis on ära toodud Flag-Nrf2 mut konstrukti tegemisel PCR-is kasutatud praimerid.

Konstrukt	Praimer	Järjestus 5' - 3' orientatsioonis
Flag-Nrf2 mut	HsNRF2T80A-Fw	CAACTAGATGAAGAGGCAGGTGA ATTTCTCCCA
	HsNRF2T80A-Rev	TGGGAGAAATTCACCTGCCTCTTC ATCTAGTTG

2.2.4 Erinevad ubikvitiini mutandid

Erinevaid mutantseid ubikvitiini cDNA-sid sisaldavad plasmidid saadi AddGene plasmiidikogust (Tabel 1). Vastavad ubikvitiini cDNA-d olid kloneeritud pRK5 plasmidi ja transformeeritud bakteritesse. DNA eraldati kasutades endotoksiinide vaba NucleoBond® Xtra Midi EF plasmidse DNA puhastamise reagentide komplekti. Kõiki selle seeria plasmide kasutati koos, ka metsiktüüpi ubikvitiin ekspresseeriti pRK5 vektoris olevalt cDNA-lt. Lihtsuse mõttes tähistati antud konstruktid lihtsat HA-Ubi ja siis mäрге, kas tegu on metsiktüüpi (Wt) või mutantse ubikvitiiniga.

Joonis 10 on skemaatiliselt näidatud, mida erinevad ubikvitiini mutandid tähendavad. Ekspresseeritav valk koosneb kolmest osast – HA-märgisest, linker osast ja ubikvitiinist. Mutatsioonid on sisse viidud ubikvitiini ossa.

HA-tag	Linker	Ubikvitiin																																																																											
		1	6	11	27	29	33	48	63																																																																				
HA-Ubi Wt		M	Q	I	F	V	K	T	L	T	G	K	T	I	T	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I	F	A	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	Q	K	E	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G
HA-Ubi KO		M	Q	I	F	V	R	T	L	T	G	R	T	I	T	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	R	A	R	I	Q	D	R	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I	F	A	G	R	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	Q	R	E	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G
HA-Ubi K48R		M	Q	I	F	V	K	T	L	T	G	K	T	I	T	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	K	A	K	I	Q	D	K	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I	F	A	G	R	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	Q	K	E	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G
HA-Ubi K48		M	Q	I	F	V	R	T	L	T	G	R	T	I	T	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	R	A	R	I	Q	D	R	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I	F	A	G	K	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	Q	R	E	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G
HA-Ubi K63		M	Q	I	F	V	R	T	L	T	G	R	T	I	T	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	R	A	R	I	Q	D	R	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I	F	A	G	R	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	Q	K	E	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G
HA-Ubi K11		M	Q	I	F	V	R	T	L	T	G	K	T	I	T	L	E	V	E	P	S	D	T	I	E	N	V	R	A	R	I	Q	D	R	E	G	I	P	P	D	Q	Q	R	L	I	F	A	G	R	Q	L	E	D	G	R	T	L	S	D	Y	N	I	Q	R	E	S	T	L	H	L	V	L	R	L	R	G	G

Joonis 10. Erinevatelt HA-Ubi plasmiididelt ekspresseeritavad ubikvitiini valgud. Joonisel näidatakse skemaatiliselt, mida tähendavad erinevad ubikvitiini mutandid. Ubikvitiini esimene aminohape metioniin on tähistatud number ühega (M), teised numbrid näidavad mitmes aminohape konkreetne lüsiin (K) on ubikvitiini valgus. Selguse huvides on kõik numbriga tähistatud aminohapped suurema kirjaga. Muteeritud aminohapped on tähistatud punasega. HA-Ubi Wt – kõik lüsiinid on alles; HA-Ubi KO – kõik lüsiinid on muteeritud arginiinideks; HA-Ubi K48R – ainult 48. lüsiin on muteeritud arginiiniks, teised on alles; HA-Ubi K48 – ainult 48. lüsiin on alles, teised on muteeritud arginiinideks; HA-Ubi K63 – ainult 63. lüsiin on alles, teised on muteeritud arginiinideks; HA-Ubi K11 – ainult 11. lüsiin on alles, teised on muteeritud arginiinideks.

Kõik töös kasutatavad konstruktid sekveneeriti Eesti Biokeskuse Tuumiklaboris. Sekveneerimisel kasutatud praimerid olid pärit meie labori kollektsioonist. Tulemusi võrreldi NCBI andmebaasis toodud referentsjärjestustega. Kõik konstruktid olid õiged ja neid kasutati edasistes transfektsiooni katsetes.

2.2.5 Rakuliinid

Töös kasutati inimese sääreluu osteosarkoomist eraldatud U2OS rakuliini. Rakke kasvatati 100 mm läbimõõduga koekultuuri tassidel DMEM (*Dulbecco's modified eagle's meedium*; GE Healthcare, PAA) söötmes, kuhu oli lisatud 10% vasika loote seerumit (Imperial). Rakke inkubeeriti temperatuuril 37°C ja 5% CO₂ sisalduse juures.

2.2.6 Transfektsioon

U2OS rakud külvati eelneval öhtul 60 mm läbimõõduga koekultuuri tassidele, lasti üleöö kasvada ja järgmisel päeval, kui rakud olid saavutanud ligikaudu 70-80% konfluentsuse, siis rakud transfekteriti kasutades Reagent 007 (Icosagen). Reagent 007 on katioonne peptiidil põhinev transfekterimise reagent, mis moodustab negatiivselt laetud plasmidse DNA-ga kompleksi ja on efektiivne transportvektor DNA viimiseks rakukultuuridesse. Transfektsioonisegu maht oli 100 µl, mis sisaldas endas vastavaid plasmide, transfektsiooni reagenti (CR=2) ja vett. Rakkude transfekterimisel kasutati järgmisi plasmidi

konsentratsioone väljendatuna 60 mm koekultuuri tassi kohta: Flag-MCM3 wt, Flag-MCM3 mut, E2-MCM7 wt, E2-MCM7 mut, Flag-Nrf2 wt ja Flag-Nrf2 mut 1,5 µg; Strep-Keap1 wt ja Strep-Keap1 mut 2 µg; HA-Ubi erinevad plasmiidid 1 µg. Segu inkubeeriti toatemperatuuril kümme minuti. Samal ajal vahetati rakkudel sööde ära värskelt seerumi vaba DMEM söötme vastu. Seejärel lisati rakkudele kogu valmistatud transfektsioonisegu, segati hoolikalt ning rakud pandi tagasi inkubaatorisse. Kolme tunni pärast vahetati rakkudel uuesti sööde, aga seekord seerumiga DMEM söötme vastu. Rakke inkubeeriti lisaks veel kas 33 või 45 tundi (totaalne inkubatsiooni aeg 36 või 48 tundi).

2.2.7 Proteosoomi inhibiitorid ja oksüdatiivne stress

Proteosoomi inhibeerimiseks kasutati kahte erinevat inhibiitorit – MG-132 (Calbiochem) ja Bortezomibi (Santa Cruz). Mõlemad olid lahustatud DMSO-s, mida kasutati ka negatiivse kontrollina. Kaksteist tundi enne rakkude lüüsimist lisati üks nimetatud inhibiitoritest söötmesse lõppkonsentratsiooniga 20 µM, segati korralikult ning jätkati inkubatsiooniga. Oksüdatiivse stressi tekitamiseks rakkudes kasutati vesinikperoksiidi H₂O₂ (Sigma) lõppkonsentratsiooniga 300 µM, mis lisati söötmesse koos proteosoomi inhibiitoriga. Vajalik H₂O₂ lahjendus tehti PBS-is.

2.2.8 Rakkude lüüsimine ja immunosadestamine

Pärast inkubatsiooni rakud pesti PBS-is ja töödeldi 3-5 minutit trüpsiin-EDTA-ga (0.05/0.02%, Naxo) 37°C juures. Trüpsiini inhibeerimiseks rakud suspendeeriti seerumiga DMEM söötmes ja tsentrifuugiti 5 minutit kiirusel 1500 rpm toatemperatuuril. Rakud pesti PBS-is ja tsentrifuugiti 3 minutit kiirusel 2500 rpm toatemperatuuril ning lüüsi 10 minutit 100 °C juures lüüsi puhvris (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% SDS, 1mM EDTA ja 1x proteaasi inhibiitorite segu (Roche)). Seejärel tsentrifuugiti 10 minutit maksimum pööratel. Sademelt võeti supernatant pealt ära, sellest 24 µl tõsteti teise tuubi inputi jaoks. Inputile lisati 2x Laemmli puhvrit (100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4 mM EDTA (pH 8,0), 4% SDS, 20% glütserool, 288 mM β-merkaptopetaanool, 0,016% broomfenoolsinine) ja proov pandi -20°C juurde. Ülejäänud proov lahjendati immunosadestamise jaoks 1 ml-ni kasutades lüüsilahjenduspuhvrit (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 1mM EDTA ja 1x proteaasi inhibiitorite segu (Roche)). Lahust inkubeeriti 15 minutit +4°C juures. Samal ajal valmistati ette sadestamisel kasutatavad kerakesed.

Flag- märgisega valkude immunosadestamiseks kasutati Sigma ANTI-FLAG® M2 magnetilisi kerakesi ja HA-märgisega valkude immunosadestamiseks kasutati Thermo

Scientific Pierce™ Anti-HA magnetilisi või agaros kerakesi vastavalt tootjapoolsele juhendile. Sõltumata märgisest, võeti ühe proovi kohta 10 µl kerakesi. Kerakesed pesti kaks korda lüüsilahjenduspuhvril ning lisati proovi hulka. Proovid jäeti üle öö +4°C juurde *end-over-end* stiilis keerutajale. Järgmisel päeval pesti kerakesi 2x1 ml IP-pesupuhvriga (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.5% NP40, 1mM EDTA) ja 1x1 ml lüüsilahjenduspuhvriga. Kerakesi keedeti 5 minutit 100°C juures 30 µl ilma β-merkaptotanolita 2x Laemmli puhvril. Pärast keetmist võeti proov kerakeste pealt ära kasutades magnetit. Proovile lisati 1,5 µl β-merkaptotanol ja keedeti veel 5 minutit 100°C juures.

Kui immuunosadestamist ei tehtud, siis lüüsi rakud otse tassil. Selleks pesti rakke eelnevalt 2 ml PBS-is, pärast seda pandi 60 mm läbimõõduga koekultuuri tassil kasvavatele rakkudele peale 100 µl 2x Laemmli puhvrit, kraabiti kummimiilitsaga kõik rakud kokku, tõsteti tuubi ning kuumutati 10 minutit 100 °C juures.

2.2.9 Western-blot analüüs

Valgud lahutati geelelektroforeesil 8% SDS-polüakrüülamiidgeelis ja kasutades poolkuiva ülekande meetodit, kanti valgud üle PVDF membraanile (Immobilon™, Millipore). Membraani blokeeriti 5% lõssipulbriga TBS-Tween 20 lahuses (50 mM Tris-HCl (pH7,5), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) 1 tund toatemperatuuril. Siis inkubeeriti membraani 1 tund toatemperatuuril või üleöö 4 °C juures primaarse antikeha lahuses ning seejärel kuni 2 tundi sekundaarse antikeha lahuses. Iga inkubatsiooni järel pesti membraani mitmeid kordi TBS-Tween 20 lahusega. Signaal detekteeriti kasutades firma GE Healthcare Amersham ECL või Thermo Scientific SuperSignal® West Fempto reagentide komplekti ning eksponeeriti röntgenfilmile (AGFA). Kõik kasutatud antikehad ja nende lahjendused on ära toodud Tabel 4.

Tabel 4. Töös kasutatud antikehad. Prim on lühend sõnale primaarne, sec on lühend sõnale sekundaarne. Tabelis on ära toodud, missuguseid antikehasid antud töös kasutati. Samuti on ära märgitud nende lahjendused ja firma, kust antikehad osteti.

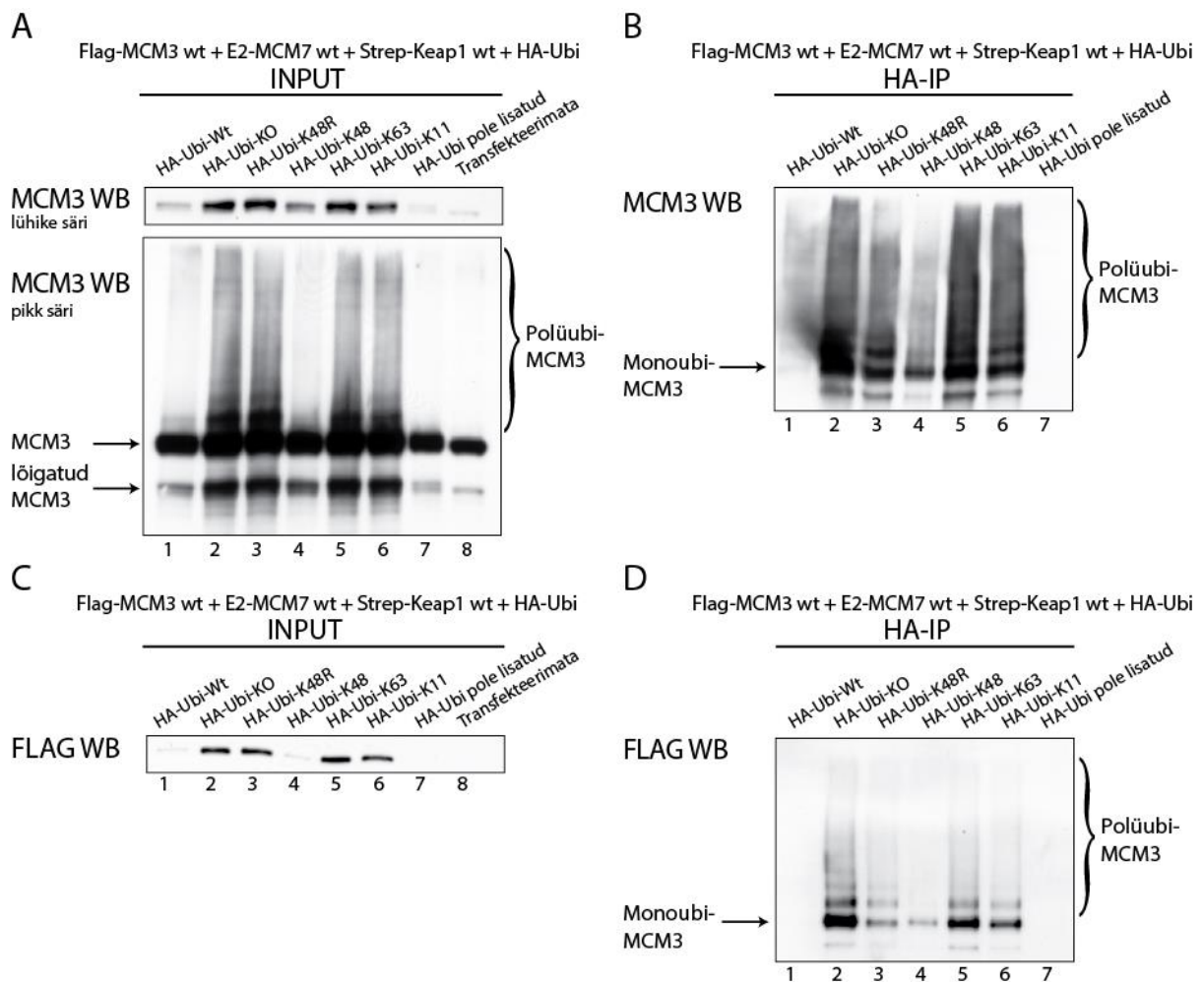
Prim antikeha		Lahjendus	Firma	Sec antikeha	Lahjendus	Firma
E2 (5E11)	Monoklonaalne, toodetud hiires	1:2400	Icosagen	Hiire vastane	1:10000	LabAS
FLAG	Monoklonaalne, toodetud hiires	1:1000	Sigma-aldrich, F1804	Hiire vastane	1:10000	LabAS
HA (F-7)	Monoklonaalne, toodetud hiires	1:400	Santa Cruz, sc-7392	Hiire vastane	1:10000	LabAS
Keap1 (E-20)	Polükloonaalne, toodetud kitses	1:400	Santa Cruz, sc-15246	Kitse vastane	1:10000	LabAS
MCM3 (N-19)	Polükloonaalne, toodetud kitses	1:400	Santa Cruz, sc-9850	Kitse vastane	1:10000	LabAS
MCM7 (H-5)	Monoklonaalne, toodetud hiires	1:400	Santa Cruz, sc-374403	Hiire vastane	1:10000	LabAS
Nrf2 (C-20)	Polükloonaalne, toodetud jäneses	1:400	Santa Cruz, sc-722	Jänese vastane	1:10000	LabAS

2.3. Tulemused

U2OS rakud transfekteeriti erinevates kombinatsioonides plasmiididega, millelt ekspresseeriti nii metsiktüüpi kui muteeritud valke. Rakkudes olid olemas ka vastavad endogeensed valgud, kuid kasutades valkude küljes olevaid Flag-, E2- ja HA-epitoomärgiseid, oli võimalik juurde-ekspresseeritud valke endogeensetest eristada. Selleks kasutati märgiste vastaseid primaarseid antikehasid, nii *Western-blot* meetodis kui immunosadestamisel, kus vastav primaarne antikeha oli juba tootja poolt konjugeeritud kerakeste külge. Lisaks kasutati *Western-blot* meetodis ka uuritavate valkude vastaseid primaarseid antikehasid, mis näitasid totaalset, nii endogeense kui juurde-ekspresseeritud, valkude hulka. Katsetes, kus hinnati ubikvitineeritud MCM3 ja MCM7 tasemeid, immunosadestati kõik ubikvitineeritud valgud kasutades ubikvitiini küljes olevat HA-märgist ning seejärel teostati *Western-blot* analüüs. Järgnevalt kirjeldatakse, mida saadi teada Keap1 mõjust valkudele MCM3 ja MCM7.

2.3.1 CMG helikaasi alaühikuid MCM3 ja MCM7 ubikvitineeritakse Keap1 juuresolekul ning nende valkude tase on reguleeritud üle lüsiini 48 moodustunud polüubikvitiiniahelatest sõltuvalt

Ubikvitiini molekulis on seitse lüsiini, üle mille saab polüubikvitiini ketti moodustada. Sõltuvalt kasutatud lüsiinist, võib ubikvitiini ketil olla erinevaid tähendusi. Esimese katsega taheti teada saada, kas Keap1 juuresolekul valgud MCM3 ja MCM7 ubikvitineeritakse, kas tegu on mono- või polüubikvitineerimisega ja viimasel juhul ka missugust lüsiini ubikvitiinis kasutatakse polüubikvitiini keti moodustamisel. Selleks kasutati transfekteerimisel erinevaid ubikvitiini mutante, kus üks või mitu lüsiini olid muteeritud. Rakud transfekteeriti metsiktüüpi Flag-MCM3, E2-MCM7 ja Strep-Keap1 ning erinevate HA-Ubi plasmiididega. Tulemusi analüüsiti kasutades immunosadestamist ja *Western-blot* meetodit.

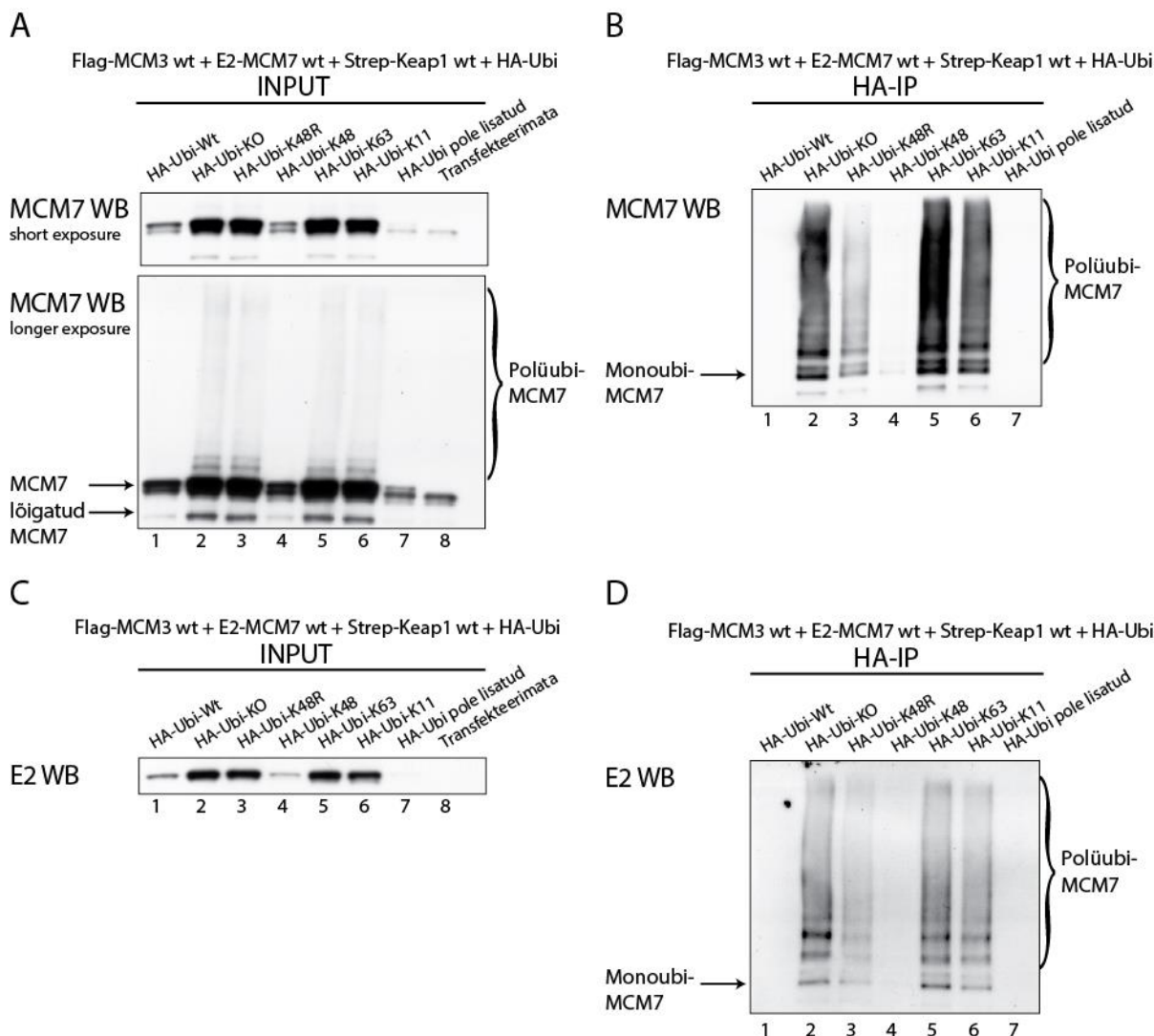


Joonis 11. MCM3 ubikvitineerimine. Rakke transfekeeriti metsiktüüpi Flag-MCM3, E2-MCM7 ja Strep-Keap1 ning erinevate HA-Ubi plasmiididega ja lüüsi 48 tunni pärast. **(A)** Input, *Western-blot* meetodis kasutati α -MCM3 primaarset antikeha. **(B)** HA-IP, *Western-blot* meetodis kasutati α -MCM3 primaarset antikeha. **(C)** Input, *Western-blot* meetodis kasutati α -FLAG primaarset antikeha. **(D)** HA-IP, *Western-blot* meetodis kasutati α -Flag primaarset antikeha.

Kuna nii inputis kui HA-IP-is, kus immunosadestati ainult ubikvitineeritud valgud, oli *Western-blot*'is näha samasuguseid valguredelid, siis järelitati, et inputi pildil nähtavad MCM3 valgu redelid (Joonis 11A) vastasid erinevatele polüubikvitineeritud MCM3 vormidele (Joonis 11B).

Metsiktüüpi ubikvitiini korral oli Keap1 juuresolekul nii täispika kui ubikvitineeritud MCM3 tase madalam kui HA-Ubi KO plasmiidilt ekspresseeritud ubikvitiini korral, kus kõik lüsiinid ubikvitiini molekulis olid muteeritud arginiinideks (Joonis 11A-D, rada 1 vs 2). Ka kõigi ülejäänud ubikvitiini mutantide korral, kus K48 oli muteeritud arginiiniks, oli MCM3 valgu tase kõrgem võrreldes metsiktüüpi ubikvitiiniga (Joonis 11A ja Joonis 11C, rajad 2,3,5,6 vs 1). Ainukesena kasutatud ubikvitiini mutantidest, mõjutas MCM3 valgu taset sarnaselt metsiktüüpi ubikvitiiniga HA-Ubi K48 plasmiidilt ekspresseeritud ubikvitiin, kus K48 oli ainuke alles olev lüsiin ubikvitiini molekulis (Joonis 11A ja Joonis 11C, rada 1 vs 4). Kuna

MCM3 valgu tase oli madalam, kui MCM3 poliubikvitineerimisel Keap1 juuresolekul kasutati ubikvitiini, kus K48 oli alles (Joonis 11A ja Joonis 11C, rajad 1 ja 4) ning kõrgem, kui kasutati ubikvitiini, kus K48 oli muteeritud arginiiniks (Joonis 11A ja Joonis 11C, rajad 2,3,5,6), siis järeldati, et K48 poliubikvitiinketid on vajalikud MCM3 taseme negatiivseks regulatsiooniks. Huvitav oli see, et kõikides transfektsioonides, kus ekspresseeriti muteeritud ubikvitiini, kuhjus lisaks ka üks ja sama ubikvitineeritud MCM3 vorm, mis võis tõenäoliselt võis olla monoubikvitineeritud MCM3 (Joonis 11B ja Joonis 11D, rajad 2-6).



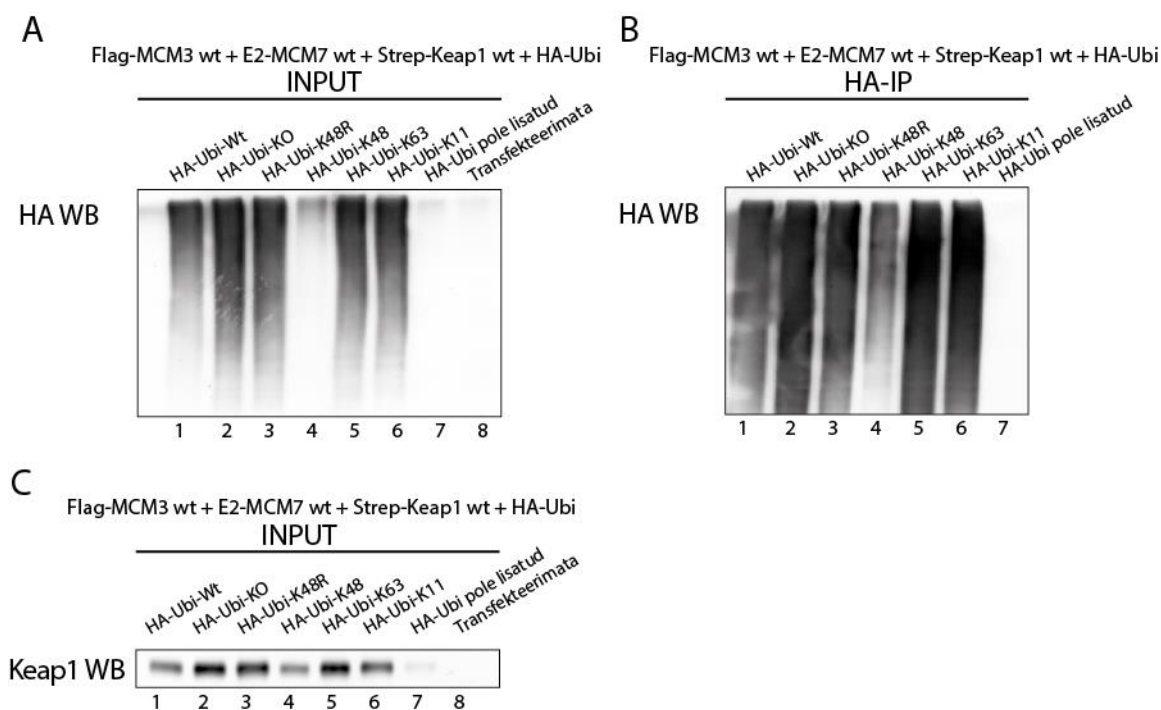
Joonis 12. MCM7 ubikvitineerimine. Rakke transfekseeriti metsiktüüpi Flag-MCM3, E2-MCM7 ja Strep-Keap1 ning erinevate HA-Ubi plasmiididega ja lüüsi 48 tunni pärast. **(A)** Input, *Western-blot* meetodis kasutati α -MCM7 primaarset antikeha. **(B)** HA-IP, *Western-blot* meetodis kasutati α -MCM7 primaarset antikeha. **(C)** Input, *Western-blot* meetodis kasutati α -E2 primaarset antikeha. **(D)** HA-IP, *Western-blot* meetodis kasutati α -E2 primaarset antikeha.

Ka MCM7 puhul järeldati, et inputis nähtavad MCM7 valgu redelid (Joonis 12A) vastavad erinevatele poliubikvitineeritud MCM7 vormidele (Joonis 12B ja Joonis 12D), kuna nii

inputis kui HA-IP-is, kus immunosadestati ainult ubikvitineeritud valgud, on *Western-blot*'is näha samasuguseid valguredelid.

Nii täispika kui ubikvitineeritud MCM7 valgu tasemete kohta tehti samasugused järeldused nagu MCM3 kohta – Keap1 juuresolekul oli MCM7 valgu tase madalam, kui valgu poliubikvitineerimisel kasutati ubikvitiini, kus K48 oli alles (Joonis 12A ja Joonis 12C, rajad 1 ja 4) ning kõrgem, kui kasutati ubikvitiini, kus K48 oli muteeritud arginiiniks (Joonis 12A ja Joonis 12C, rajad 2,3,5,6). Seega HA-Ubi K48 plasmiidilt ekspresseeritud mutantne ubikvitiin oli ainukene, mille puhul oli MCM7 valgu tase võrreldav transfektsiooniga, kus ekspresseeriti metsiktüüpi ubikvitiini (Joonis 12A ja Joonis 12C, rada 4 vs 1).

Lisaks, nii valgu MCM3 kui MCM7 *Western-blot*'is oli näha lühemat vormi, mis järgis täpselt täispika valgu mustrit (Joonis 11A ja Joonis 12A). Mõlema valgu puhul võis tegemist olla proteolüütiliselt trunkeeritud vormidega. Kuna erinevate vormide identifitseerimine ei kuulunud antud töö eesmärkide hulka, siis rohkem sellega ei tegeletud.



Joonis 13. Ubikvitineeritud valgud ja Keap1. Rakke transfekteeeriti metsiktüüpi Flag-MCM3, E2-MCM7 ja Strep-Keap1 ning erinevate HA-Ubi plasmiididega ja lüüsi 48 tunni pärast. (A) Input, *Western-blot* meetodis kasutati α -HA primaarset antikeha. (B) HA-IP, *Western-blot* meetodis kasutati α -HA primaarset antikeha. (C) Input, *Western-blot* meetodis kasutati α -Keap1 primaarset antikeha.

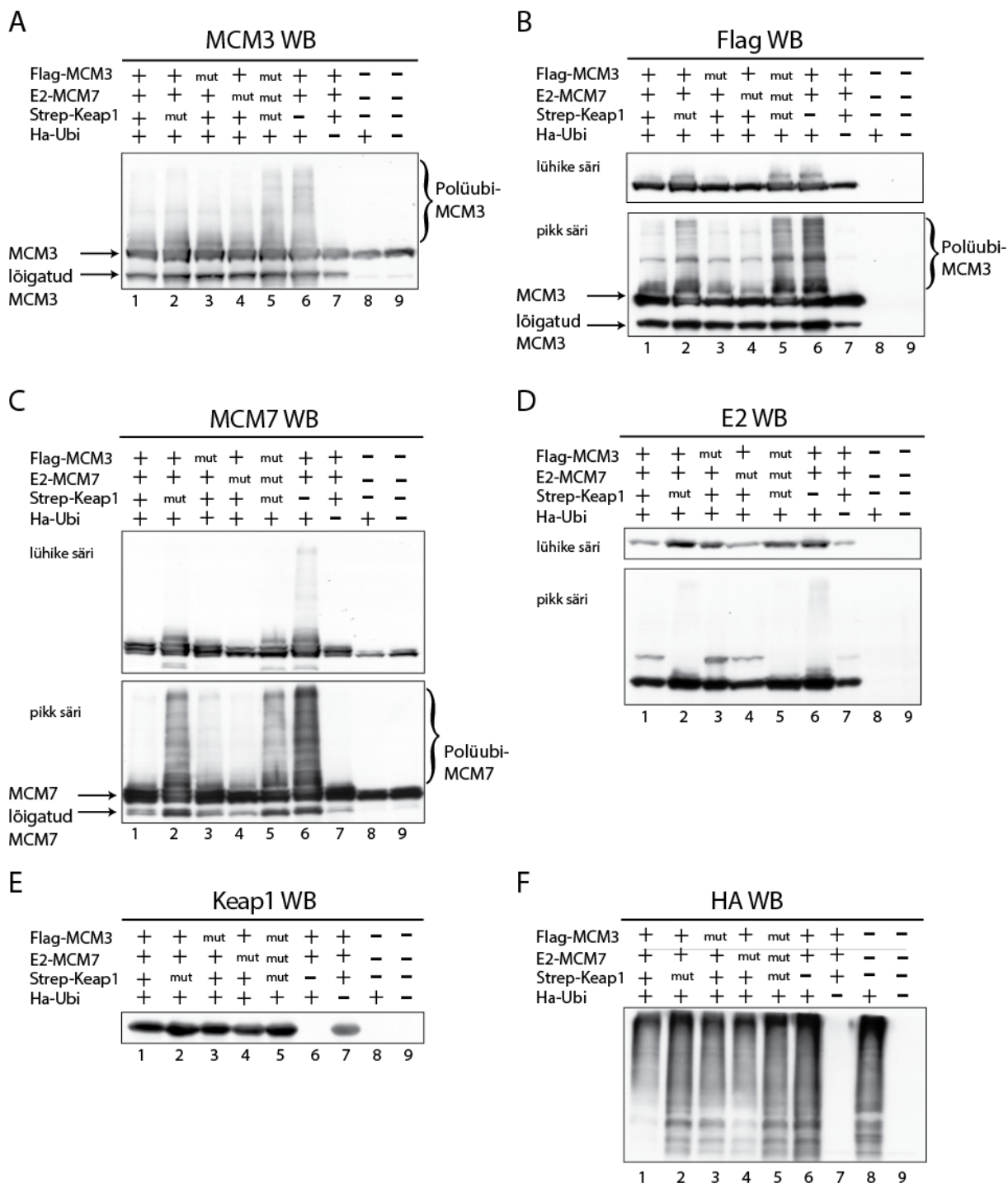
Joonis 13A-B on näha, et ubikvitiini mutandid mõjutasid kõikide ubikvitineeritud valkude hulka. Ubikvitiini mutantidel pole efekti ainult töös uuritud valkudele, vaid neid lülitatakse ka kõigi teiste ubikvitineeritud valkude kettidesse. HA-Ubi K48 plasmiidilt ekspresseeritud

ubikvitiini oli teiste mutantsete ubikvitiinidega võrreldes vähem (Joonis 13A-B, rada 4 vs rajad 2,3,5,6), sest valgud, mille küljes on üle K48 moodustatud polüubikvitiini kett, tuntakse ära ja degradeeritakse kiirelt 26S proteosoomi poolt. Joonis 13C on näidatud, et Keap1 oli ekspresseeritud igas katses, kus vastavat plasmiid transfekteeriti.

Katse tulemustest järeldati, et K48 polüubikvitiinketid on vajalikud nii MCM3 kui MCM7 taseme negatiivseks regulatsiooniks. Kirjandusest on teada, et üle K48 polüubikvitiineeritud valgud saadetakse enamasti 26S proteosomaalsesse degradatsiooni. Kui polüubikvitiineerimisel kasutati metsiktüüpi või HA-Ubi K48 plasmiidilt ekspresseeritud ubikvitiini, siis MCM3 ja MCM7 tõenäoliselt lagundati proteosoomis ning sellepärast olid valgu tasemed madalamad. Teistelt plasmiididelt ekspresseeritud mutantse ubikvitiini lülitamisel polüubikvitiini ketti, polnud nähtavasti enam võimalik ei MCM3 ega MCM7 lagundada ning sellepärast nimetatud valgud kuhjusid. Seega tulemused viitasid MCM3 ja MCM7 klassikalisele ubikvitiinist sõltuvale degradatsioonile 26S proteosoomis. Lisaks oli kõigi transfekteeritud plasmiidide puhul näha, et ekspressioonisüsteem töötas, plasmiididelt ekspresseeriti vastavaid valke koos märgisega.

2.3.2 MCM3 ja MCM7 valkude tase ning ubikvitiineerimine on rakus reguleeritud Keap1 poolt

Järgmisena uuriti, kas eelmises katses nähtud MCM3 ja MCM7 valgu tasemete ning ubikvitiineerimise regulatsioon võis olla seotud nende valkude otsese interaktsiooniga katses juurde ekspresseeritud Keap1 valguga. Selleks transfekteeriti rakke erinevas kombinatsioonis metsiktüüpi ja mutantseid valke ekspresseerivate plasmiididega. Nii muteeritud valgus MCM3 kui MCM7 on üks Keap1-ga interaktsiooniks vajalikest aminohapetest asendatudalaniiniga (MCM3 puhul ETGE→EAGE ja MCM7 puhul VSGE→VSGA). Muteeritud Keap1-s on samuti vastavate valkudega interaktsiooniks vajalikud kaks aminohapet asendatudalaniiniga. Kõikide töös kasutatavate mutantsete valkude puhul on meie laboris biokeemilistes analüüsides näidatud, et interaktsioon Keap1 ja MCM3 või MCM7 vahel on rikutud (Ivar Ilves, avaldamata andmed). Valgu tasemeid analüüsiti *Western-blot* meetodil.



Joonis 14. MCM3 ja MCM7 valkude taseme ja ubikvitineerimise sõltuvus interaktsioonist Keap1-ga. Rakud transfekteeriti erinevate metsiktüüpi ja mutantseid valke ekspresseerivate plasmiididega ning lüüsi 48 tunni pärast. **(A)** Western-blot meetodis kasutati α -MCM3 primaarset antikeha. **(B)** Western-blot meetodis kasutati α -Flag primaarset antikeha. **(C)** Western-blot meetodis kasutati α -MCM7 primaarset antikeha. **(D)** Western-blot meetodis kasutati α -E2 primaarset antikeha. **(E)** Western-blot meetodis kasutati α -Keap1 primaarset antikeha. **(F)** Western-blot meetodis kasutati α -HA primaarset antikeha.

Kuigi selles katses vaadati ainult totaalset valku ja HA-IP-d ei tehtud, on eelnevatest katsetest teada, et valgu redelid nii MCM3 kui MCM7 kohal vastavad erinevatele ubikvitineeritud vormidele (Joonis 11B ja Joonis 11D ning Joonis 12B ja Joonis 12D). MCM3 valgu tasemeid

uuriti *Western-blot* meetodil kasutades nii Flag-epitoomärgise vastast kui MCM3 vastast primaarset antikeha. Täispika MCM3 valgu tasemes muutusi ei nähtud (Joonis 14A-B), küll aga oli muutusi näha ubikvitineeritud MCM3 hulgas. Tegelikult järgnevas katsetes nähti, et ka MCM3 täispika valgu tase on reguleeritud Keap1 poolt (Joonis 15A), kusjuures valgu tase reageeris Keap1-le paremini siis, kui MCM7 polnud juurde transfekteeritud (Joonis 17A-B). Transfektsioonides, kus ekspresseeriti metsiktüüpi Keap1 (Joonis 14B, rajad 1,3,4), oli ubikvitineeritud MCM3 valgu tase madalam võrreldes transfektsioonidega, kus ekspresseeriti mutantset Keap1 (Joonis 14B, rajad 2 ja 5) või Keap1 ei ekspresseeritud üldse (Joonis 14B, rada 6).

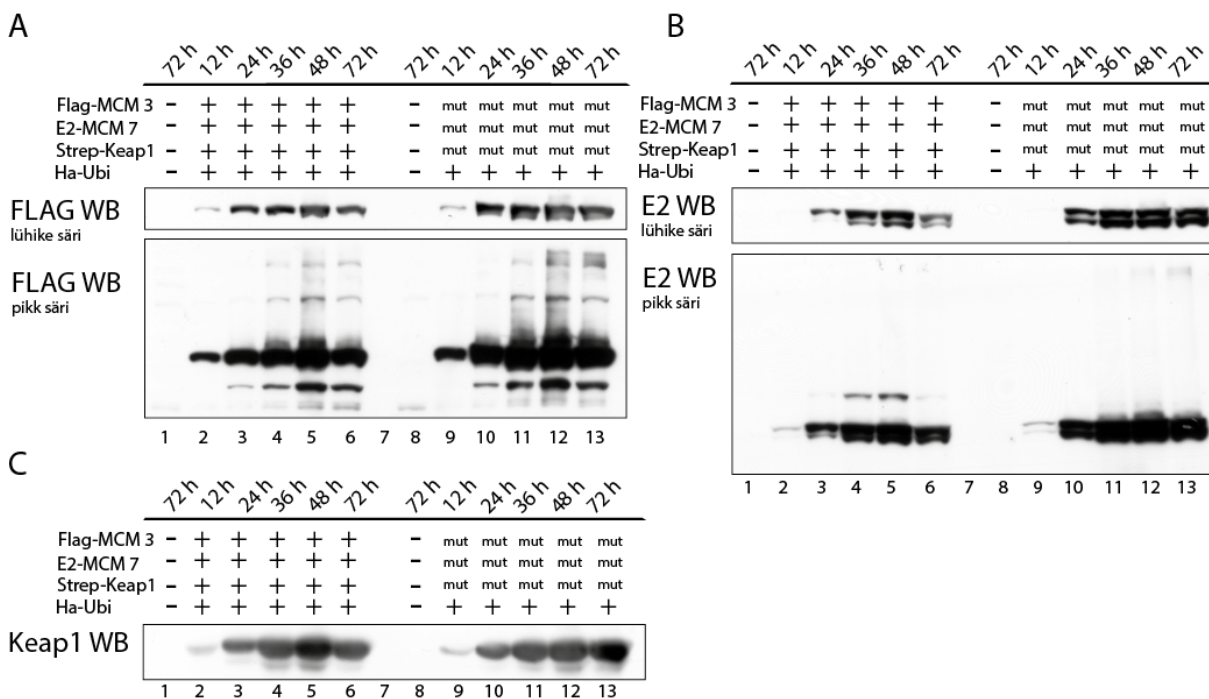
MCM7 valgu tasemete uurimisel kasutati nii E2-epitoomärgise vastast kui MCM7 vastast primaarset antikeha, kuid tulemused olid mõnevõrra erinevad. Transfektsioonides, kus ekspresseeriti metsiktüüpi Keap1 (Joonis 14C, rajad 1,3,4), oli ubikvitineeritud MCM7 valgu tase madalam võrreldes transfektsioonidega, kus ekspresseeriti mutantset Keap1 (Joonis 14C, rajad 2 ja 5) või Keap1 ei ekspresseeritud üldse (Joonis 14C, rada 6). Joonis 14D kuhjuvaid valgu redeleid muteeritud Keap1 korral ei nähtud, mida võis seletada antikeha vähesel tundlikkusega. Mõlema kasutatud antikeha puhul oli näha, et lisaks MCM7 ubikvitineeritud vormidele, oli ka täispika valgu tase Keap1 poolt reguleeritud (Joonis 14C-D).

Huvitav oli see, et nii MCM3 kui MCM7 valgu mutatsioonil polnud mõju vastava valgu enda tasemele ega ubikvitineerimisele (Joonis 14A-B, rada 3 ning Joonis 14C-D, rada 4). Igal juhul, kasutades kas muteeritud Keap1 või muteeritud MCM3 ja MCM7, on interaktsioon vastavate valkude vahel lõhnutud. Keap1 mutatsioonil oli mõju MCM3 ja MCM7 valgu tasemele ning ubikvitineerimisele, aga vastavalt MCM3 ja MCM7 mutatsioonidel polnud. Järelikult on MCM3 ja MCM7 valgu ubikvitineerimine ja tasemete regulatsioon Keap1 sõltuv, aga vastava valgu MCM3 ETGE või MCM7 VSGE motiivist sõltumatu.

Valgu Keap1 puhul *Western-blot* meetodis Strep-epitoomärgise vastast primaarset antikeha ei kasutatud, sest antikeha ei töötanud. Joonis 14E on näidatud, et valku Keap1 ekspresseeriti igas seerias, kus vastavat plasmidi transfekteeriti (rajad 1-5 ja 7) ning nendel radadel, kus Keap1 juurde ei transfekteeritud (rajad 6,8,9), polnud Keap1 *Western-blot*'is detekteeritav. Seega vaadates *Western-blot*'is totaalset Keap1valgu taset, saab aru, kas transfekteeritud Keap1 ekspresseeriti või ei. Joonis 14F on näidatud HA-märgisega ubikvitiini ekspressioon.

Järgmisena uuriti, kuidas MCM3 ja MCM7 tasemed muutuvad ajas sõltuvalt Keap1 valgu ekspressioonist. Selleks valiti viis ajapunkti - 12 h, 24 h, 36 h, 48 h ja 72 h. Kuna katse

eismärgiks oli kinnitada eelmises katses nähtud MCM3 ja MCM7 valkude sõltuvus Keap1-st, siis kasutati transfekdeerimisel kahte seeriat, kus esimeses olid kõik ekspresseeritavad valgud metsiktüüpi ja teises seerias olid Flag-MCM3, E2-MCM7 ja Strep-Keap1 muteeritud. Kõik kolm valku muteeriti, et mutantidest tulenev efekt oleks tugevam. Lisaks sooviti saada infot uuritavate valkude ekspressioonidünaamika kohta ajas. Valgu tasemeid analüüsiti *Western-blot* meetodil.



Joonis 15. MCM3 ja MCM7 valgu tasemete sõltuvus metsiktüüpi ja muteeritud Keap1-st ajas. Transfekdeerimisel kasutati kahte erinevat seeriat. Esimene sisaldas endas metsiktüüpi ja teine mutantseid konstrukte. Ekspresseeritud valgu hulka vaadati viiel erineval ajapunktil pärast transfekdeerimist. **(A)** *Western-blot* meetodis kasutati α -Flag primaarset antikeha. **(B)** *Western-blot* meetodis kasutati α -E2 primaarset antikeha. **(C)** *Western-blot* meetodis kasutati α -Keap1 primaarset antikeha.

Selles katses uuriti ainult juurde-ekspresseeritud valgu hulka, kasutades *Western-blot* meetodis vastavat epitoopmärgise vastast primaarset antikeha. Valgu Keap1 puhul vaadati totaalset Keap1 hulka. *Western-blot* analüüsil nähti, et Flag-märgisega MCM3 valgu tase oli Keap1 sõltuv. Metsiktüüpi seerias oli MCM3 valgu tase madalam võrreldes mutantse seeriaga (Joonis 15A, rajad 2-6 vs rajad 9-13). Sama kehtis E2-märgisega MCM7 kohta (Joonis 15B, rajad 2-6 vs rajad 9-13).

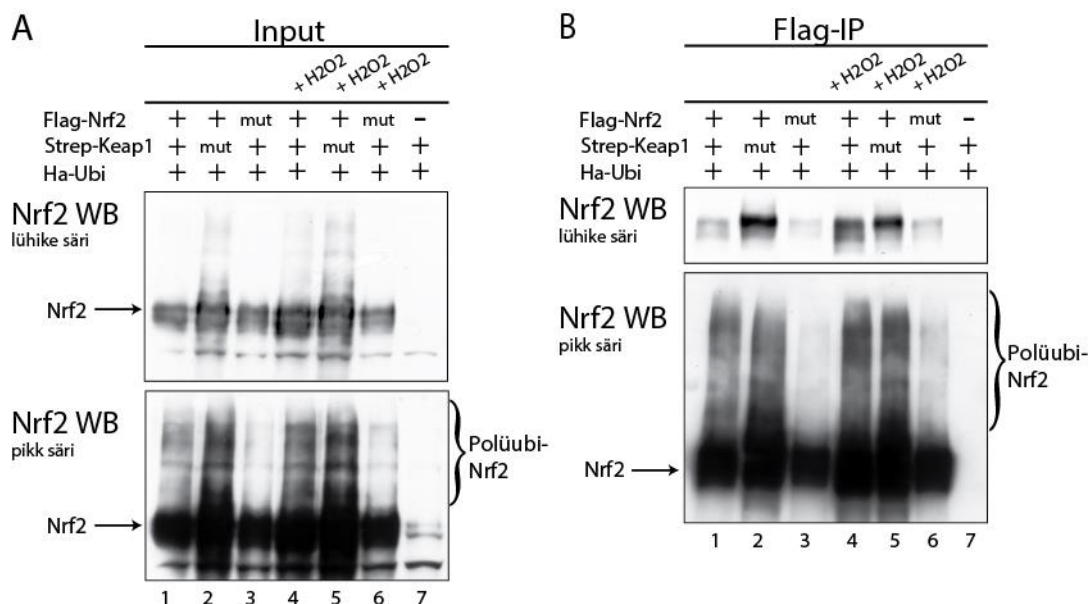
Valgu ekspressioonidünaamika oli kõigil transfekteeritud plasmiididel väga sarnane. Transfekteeritud plasmiidilt hakati valku tootma 12 tunni jooksul pärast transfekdeerimist (Joonis 15A-C, rada 2). Valgu ekspressioon suurenes ajas, kusjuures kõige rohkem oli juurde-ekspresseeritud valku 36 kuni 48 tunni pärast. (Joonis 15A-C, rajad 4 ja 5). 72 tunni pärast oli

valgu ekspressioon vähenema hakanud, mida võis seletada plasmidi kontsentratsiooni vähenemisega jagunevates rakkudes aja jooksul (Joonis 15A-C, rajad 6 ja 13).

2.3.3 Keap1 sõltuv MCM3 taseme vähenemine on seotud degradatsiooniga 26S proteosoomi poolt ja neid protsesse ei reguleerita vastusena oksüdatiivsele stressile

Järgmisena taheti uurida, kas ja kuidas on MCM3 valgu tase ning ubiquitineerimine mõjutatud oksüdatiivse stressi poolt. MCM3 ja MCM7 sõltuvust oksüdatiivsest stressist otsustati uurida eraldi. Kirjanduse ja meie laboris tehtud interaktsioonikatsete tulemuste põhjal oli teada, et valgul MCM3 on tugevam afiinsus Keap1 suhtes kui valgul MCM7, seega keskenduti selles magistritöös ainult valgule MCM3. Keap1 on sensorvalk, mis kiiresti reageerib rakus muutuvatele tingimustele. Oksüdatiivse stressi korral Nrf2 ei ubiquitineerita enam Keap1 sõltuvalt ning Nrf2 stabiliseerub. Kuna MCM3 on analoogne Keap1 interaktsioonipartner, siis eeldati oksüdatiivse stressi korral samasugust MCM3 valgu taseme tõusu.

Enne seda sooviti kasutatavat süsteemi testida positiivse kontrolliga, milleks oli hästi kirjeldatud Keap1-Nrf2 rada (Kirjanduse ülevaade). Selle katsega taheti esiteks vaadata, kas U2OS rakud reageerivad oksüdatiivsele stressile ja teiseks sooviti kontrollida mutantsete valkude efektiivsust antud katsesüsteemis. Kõikide töös kasutatavate mutantsete valkude puhul on meie laboris näidatud *in vitro*, et interaktsioon on rikutud (Ivar Ilves, avaldamata andmed). Rakud transfekteeriti ja 12 tundi enne rakkude lüüsimist pandi oksüdatiivse stressi tekitamiseks rakkudele peale 300 μM H_2O_2 . Vesinikperoksiid on looduslik reaktiivne hapniku ühend ROS, mis difundeerub kergesti rakkudesse. Rakud lüüsiiti 48 tundi pärast transfektsiooni ning tulemusi analüüsiti immunosadestamise ja *Western-blot* meetodil.



Joonis 16. Keap1-Nrf2 raja vastus oksüdatiivsele stressile. Rakud transfecteeriti ja 12 tundi enne transfectsiooni lõppu pandi rakkudele peale 300 μ M H₂O₂. (A) Input, *Western-blot* meetodis kasutati α -Nrf2 primaarset antikeha. (B) Flag-IP, *Western-blot* meetodis kasutati α -Nrf2 primaarset antikeha.

Juurde-ekspresseritud Nrf2 eristas endogeensest valgust Flag-epitoomärgis, mida seekord kasutati ära immunosadestamisel. Flag-IP-s kasutati *Western-blot*'is Nrf2 vastast primaarset antikeha, mis näitas juurde ekspresseeritud valgu hulka (Joonis 16B). Inputis kasutati samuti Nrf2 vastast primaarset antikeha, kuid inputis iseloomustas see totaalse Nrf2 valgu taseme muutusi (Joonis 16A).

Normaaltingimustes oli metsiktüüpi Keap1 juuresolekul nii metsiktüüpi kui muteeritud Nrf2 valgu tase madalam võrreldes transfectsiooniga, kus ekspresseeriti mutantset Keap1 valku (Joonis 16A-B, rajad 1 ja 3 vs rada 2). Kuigi muteeritud Nrf2 ei saa ubiquitineerida Keap1 sõltuvalt, sest interaktsioon Keap1-Nrf2 vahel on rikutud, reguleeriti valgu tase siiski alla (Joonis 16B, rada 3). Järelikult metsiktüüpi Keap1 juuresolekul on ka teised Keap1 sõltuvad rajad võimelised Keap1 interaktsioonipartnereid lagundama. See oli mõnevõrra üllatav, et mutatsioonid valkudes Keap1 ja Nrf2 ei omanud sama efekti Nrf2 valgu tasemele, kuigi mõlemal juhul on nende valkude vaheline interaktsioon rikutud. Sama nähti tegelikult ka eelnevas MCM3 seerias, kus mutatsioonil Keap1 või MCM3 valgus oli erinev efekt MCM3 valgu tasemele (Joonis 14B, rada 2 vs rada 3).

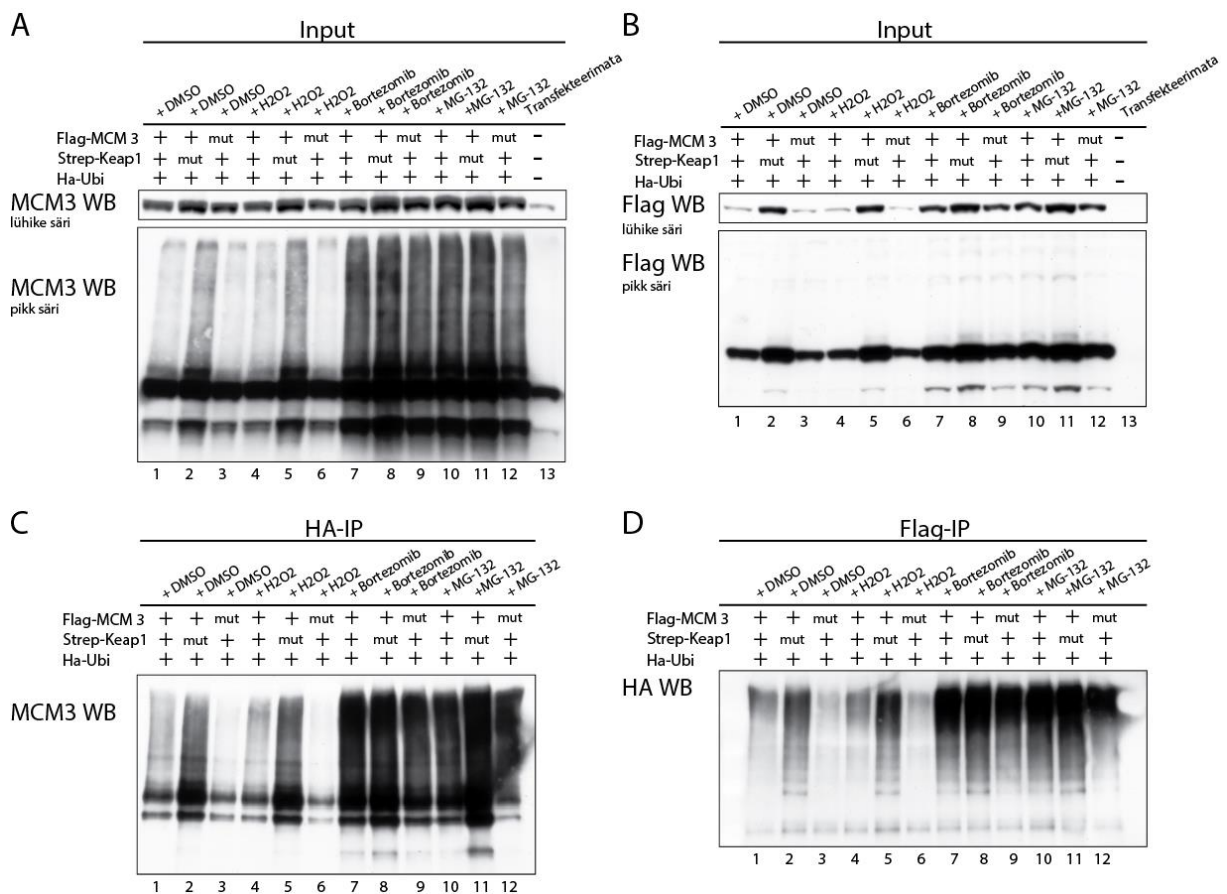
Oksüdatiivse stressi positiivne kontroll töötas väga hästi, sest vastus stressile oli Nrf2 puhul olemas. Kirjandusest on teada, et oksüdatiivse stressi korral Nrf2 stabiliseerub ja just seda ongi katse tulemustes näha (Joonis 16A-B, rada 1 vs 4). Vastus stressile puudus muteeritud Keap1 korral, kus Nrf2 valgu tase oli püsivalt kõrgem võrreldes transfectsiooniga, kus

ekspresseeriti ainult metsiktüüpi valke (Joonis 16A-B, rajad 2 ja 5 vs rajad 1 ja 4). Samuti puudus vastus stressile muteeritud Nrf2 korral, kus valgu tase oli püsivalt madalam võrreldes transfektsiooniga, kus ekspresseeriti ainult metsiktüüpi valke (Joonis 16A-B, rajad 3 ja 6 vs rajad 1 ja 4).

Antud katse tulemustest on selgelt näha, et Nrf2 valgu tase on reguleeritud vähemalt kahe erineva Keap1 sõltuva raja poolt. Üks radadest, mis vastab oksüdatiivsele stressile, on sõltuv Nrf2 ETGE juuksenõelast ja seega otsesest Keap1-ga interaktsioonist. Teine rada, mis ei vasta oksüdatiivsele stressile, sõltub küll Keap1-st aga ei sõltu Nrf2 ETGE juuksenõelast ja tõenäoliselt ka mitte Keap1-Nrf2 vahelisest otsesest interaktsioonist.

Lisaks saadi kinnitust, et mutatsioon Nrf2 ETGE motiivis (\rightarrow EAGE) on piisav Keap1-Nrf2 interaktsiooni lõhkumiseks. Kuna mutatsioon Nrf2 ETGE juuksenõelas rikkus ära interaktsiooni Keap1-ga ja mutantse MCM3 puhul on samuti antud aminohape ETGE juuksenõelas asendatud, siis järeldati, et see mutatsioon lõhub ära ka MCM3 ja Keap1 vahelise interaktsiooni.

Kuna positiivne kontroll töötas ja Nrf2 valgu tase reageeris stressile, siis järgmisena uuriti, kas MCM3 reageerib Keap1-sõltuvalt oksüdatiivsele stressile. Lisaks uuriti, kas MCM3 lagundatakse 26S proteosoomist sõltuvalt. Rakud transfekteeriti ja 24 tundi pärast transfektsiooni pandi rakkudele 12 tunniks peale 300 μ M H₂O₂ stress ning 20 μ M proteosoomi inhibiitor Bortezomib või MG-132. Stressi tulemusena peaks täispikk MCM3 stabiliseeruma, nagu eelmises katses oli näha Nrf2 puhul. Proteosoomi inhibiitorite korral peaksid stabiliseeruma nii täispikk valk kui ubikvitineeritud vormid. Tulemusi analüüsiti *Western-blot* meetodil.



Joonis 17. Keap1 sõltuv MCM3 vastus stressile ja proteosoomi inhibiitoritele. Rakud transfekteeriti ja 12 tundi enne rakkude lüüsimist lisati rakkudele 300 μM H₂O₂ ning 20 μM proteosoomi inhibiitorid Bortezomib ja MG-132. **(A)** Input, *Western-blot* meetodis kasutati α -MCM3 primaarset antikeha. **(B)** Input, *Western-blot* meetodis kasutati α -Flag primaarset antikeha. **(C)** HA-IP, *Western-blot* meetodis kasutati α -MCM3 primaarset antikeha. **(D)** Flag-IP, *Western-blot* meetodis kasutati α -HA primaarset antikeha.

Sarnaselt eelnevatele Nrf2 katseseria tulemustele, oli normaaltingimustes metsiktüüpi Keap1 juuresolekul nii metsiktüüpi kui muteeritud MCM3 valgu tase madalam võrreldes transfektsiooniga, kus ekspresseeriti mutantset Keap1 valku (Joonis 17A-B, rajad 1 ja 3 vs rada 2). Mutantse MCM3 valgu tase reguleeriti siiski alla, kuigi interaktsioon Keap1-MCM3 vahel oli rikutud (Joonis 17A-B, rada 3). Antud katse tõestab järjekordselt, et metsiktüüpi Keap1 juuresolekul on ka teised Keap1 sõltuvad, aga ETGE motiivist sõltumatud rajad võimelised Keap1 interaktsioonipartnereid lagundama.

Väga huvitav oli see, et kuigi normaaltingimustes mutatsioon MCM3 valgus ei mõjutanud täispika MCM3 valgu taset (Joonis 17A-B, rada 3 vs 1), vähendas see ubikvitineeritud MCM3 taset võrreldes metsiktüüpi seeriaga (Joonis 17C-D, rada 3 vs 1). Tulemus oli erinev positiivsest kontrollist, kus mutatsioon Nrf2 valgus põhjustas nii täispika kui ubikvitineeritud Nrf2 taseme languse võrreldes metsiktüüpi seeriaga (Joonis 16B ja Joonis 16C, rada 3 vs 1).

Lisaks oli erinevus positiivsest kontrollist ka see, et MCM3 valgu tase ei muutunud vastusena stressile. Muutusi polnud näha ei täispika valgu ega ubikvitineeritud MCM3 tasemetes.

Kui lisati kas Bortezomibi või MG-132 (proteosoomi inhibiitoreid), siis metsiktüüp Keap1 juuresolekul stabiliseerus nii metsiktüüpi kui muteeritud MCM3 valgu tase peaaegu samale tasemele, mis muteeritud Keap1 korral (Joonis 17A-B, rajad 7 ja 9 vs 8 ning rajad 10 ja 12 vs 11). Tulemus viitab sellele, et metsiktüüpi Keap1 juuresolekul nii metsiktüüpi kui muteeritud MCM3 degradeeriti. Valgu tasemete tõusuga korreleerus ka ubikvitineeritud vormide kuhjumine (Joonis 17C-D, rajad 7 ja 9 vs 8 ning rajad 10 ja 12 vs 11), mis tõestab, et MCM3 lagundati 26S proteosoomist sõltuvalt. Kuna ka muteeritud MCM3 lagundati metsiktüüpi Keap1 juuresolekul proteosomaalselt, siis järeldati, et mingid teised Keap1 sõltuvad, aga MCM3 ETGE motiivist sõltumatud rajad on võimelised MCM3 ubikvitineerimise ja lagundamise üle võtma, kui interaktsioon Keap1 ja MCM3 vahel on rikutud.

Katses kasutati kahte erinevat proteosoomi inhibiitorit, kusjuures mõlemad töötasid ja andsid sama efekti - stabiliseerisid MCM3 valgu taseme ja ubikvitineeritud MCM3 kuhjus. Arvestades kõiki katsetes saadud tulemusi järeldati, et Keap1 sõltuv MCM3 valgu taseme vähenemine on seotud degradatsiooniga 26S proteosoomi poolt ja neid protsesse ei reguleerita vastusena oksüdatiivsele stressile.

2.4. Arutelu

Antud magistritöös kirjeldatakse Keap1 ning MCM3 ja MCM7 interaktsiooni võimalikku resultaati inimese rakkudes. Katsetulemused näitasid, et replikatiivse helikaasi kompleksi alaühikuid MCM3 ja MCM7 polüubikvitineeritakse Keap1 sõltuvalt üle K48 ning suunatakse 26S proteosomaalsesse degradatsiooni, kusjuures MCM3 ubikvitineerimine ja degradatsioon pole oksüdatiivsest stressist sõltuv.

Seda, et Keap1 juuresolekul MCM3 ja MCM7 polüubikvitineeritakse kasutades klassikalist üle K48 moodustuvat ubikvitiini ketti, näitasid katsed erinevate ubikvitiini mutantsete vormidega, kus K48 oli alles või muteeritud arginiiniks. Ka Nrf2, mis on Keap1 tuntuim substraat, polüubikvitineeritakse Keap1 sõltuvalt üle K48, kuigi ka teisi lüsiine saab kasutada keti moodustamisel (Zhang et al., 2005). Kirjandusest on teada, et polüubikvitiini ketid, mis on moodustatud üle K48, enamasti suunavad substraatvalgud 26S proteosomaalsesse degradatsiooni (Hershko ja Ciechanover, 1998).

Tegelikult oli MCM3 puhul näha, et ka HA-Ubi K48 plasmiidilt ekspresseeritud ubikvitiini juuresolekul tõusis nii täispika kui ubikvitineeritud MCM3 tase võrreldes metsiktüüpi ubikvitiiniga, kuigi märgatavalt vähem, kui teiste kasutatud ubikvitiini mutantide juuresolekul. Lisaks, kui K48 oleks olnud ainukene lüsiin ubikvitiini molekulis, mida oli vaja MCM3 substraatvalgul polüubikvitiini keti moodustamiseks, siis oleks pidanud HA-Ubi KO ja HA-Ubi K48R plasmiidilt ekspresseeritud ubikvitiinid andma täpselt sama tulemuse, sest mõlemal juhul on K48 muteeritud arginiiniks. Nii see aga ei olnud. HA-Ubi KO plasmiidilt ekspresseeritud ubikvitiini korral kuhjusid ubikvitineeritud MCM3 ja MCM7 rohkem kui HA-Ubi K48R puhul. Kuigi järeldati, et Keap1 juuresolekul MCM3 ja MCM7 ubikvitineeritakse üle K48, nähti siiski ka teistsugust polüubikvitineerimist. See võis olla ka nõ pealesurutud ubikvitineerimine, kus eelistatud lüsiini puudumisel ubikvitiini molekulis leiti teine võimalus polüubikvitiini keti moodustamiseks (Kulathu ja Komander, 2012).

Valkude MCM3 ja MCM7 tasemete sõltuvust Keap1-st näidati mitmes erinevas katses, kus kasutati mutantseid valke, mis lõhkusid ära interaktsiooni Keap1 ja MCM3 või MCM7 vahel. Tulemustest oli selgelt näha, et metsiktüüpi Keap1 aktiivselt reguleeris MCM3 ja MCM7 valgu taseme alla, kusjuures MCM3 valgu tase oli Keap1 poolt rohkem mõjutatud, kui MCM7 polnud juurde ekspresseeritud. Kirjandusest on teada, et Keap1 on substraadi spetsiifilisuse faktor Keap1-Cul3-Rbx1 E3 ligaaskompleksis, mis normaaltingimustes

vahendab Keap1 sõltuvat Nrf2 ubikvitineerimist (Kobayashi et al., 2004). Seega järeldati, et Keap1 võiks olla substraadi spetsiifilisuse faktor ka MCM3 ja MCM7 ubikvitineerimises.

Sellele järeldusele oli vastuargumendiks see, et metsiktüüpi Keap1 juuresolekul oli nii metsiktüüpi kui muteeritud MCM3, MCM7 ja ka Nrf2 valgu tase madalam võrreldes transfektsiooniga, kus ekspresseeriti mutantset Keap1 valku. Järelikult MCM3, MCM7 ja Nrf2 valgu taset võidakse täiendavalt kontrollida mingi alternatiivse Keap1 sõltuva, ent märklaudvalgus Keap1-ga interakteeruvast ETGE juuksenõelast sõltumatu raja kaudu. Seega võib Keap1 nimetatud valkudele seonduda kaudselt, mingite teiste faktorite kaudu. Kuna Keap1 peab MCM3, MCM7 ja Nrf2 valgu tasemete alla reguleerimiseks olema metsiktüüpi, siis järelikult on ikkagi vaja Kelch domääni, mis viitab sellele, et need teised faktorid peavad omama ETGE motiivi või sarnast juuksenõela struktuuri.

Kuigi meie laboris on varasemates *in vitro* biokeemilistes katsetes kõikide kasutatud mutatsioonide puhul näidatud, et need lõhuvad ära Keap1 interaktsiooni vastava märklaudvalguga, jääb siiski ka võimalus, et rakkudes on kasutatud MCM3 (ETGE→EAGE) ja MCM7 (VSGE→VSGA) mutatsioonid liiga nõrgad lõhkumaks MCM3 või MCM7 ja Keap1 vahelist interaktsiooni. Lähtudes kirjandusest on see vähetõenäoline, sest Nrf2 puhul on näidatud, et konkreetne mutatsioon (ETGE→EAGE) β -juuksenõelas lõhub interaktsiooni Keap1-ga (Lo et al., 2006). Lisaks näidati antud magistritöös, et ETGE mutatsiooniga Nrf2 polnud võimeline oksüdatiivsele stressile reageerima, kuigi metsiktüüpi Nrf2 puhul oli vastus stressile olemas. See on otsene tõend sellele, et mutantse ETGE motiiviga Nrf2 ja Keap1 vaheline interaktsioon oli rikutud. Samas on tegu erinevate valkudega ja isegi, kui muteeritud on konserveerunud aminohape, ei pruugi see erinevate valkude kontekstis anda sama efekti. Sellepärast on plaanis testida ka tugevamaid mutante, kus interaktsiooniks vajalikku ETGE motiivi on sisse viidud ühe asemel mitu mutatsiooni.

Erinevate katsete käigus saadud tulemused viitasid sellele, et MCM3 ja MCM7 polüubikvitineeritakse Keap1 sõltuvalt üle K48 ning see võib suunata MCM3 ja MCM7 26S proteosoomist sõltuvasse degradatsiooni. Hüpotees sai MCM3 puhul kinnitust, kui transfekteeritud rakke töödeldi proteosoomi inhibiitoriga, kas Bortezomibi või MG-132-ga. Muutused MCM3 valgu tasemes tulenesid sellest, kui suur osa ubikvitineeritud valgust proteosoomis lagundati. Kui lisati proteosoomi inhibiitoreid, siis metsiktüüpi Keap1 juuresolekul nii metsiktüüpi kui muteeritud MCM3 stabiliseerusid peaaegu samale tasemele, mis muteeritud Keap1 korral. Järelikult MCM3 polüubikvitineeriti Keap1 sõltuvalt ning degradeeriti 26S proteosoomis. Mutantne Keap1 seevastu kas takistas ubikvitineeritud MCM3

lagundamist 26S proteosoomis või Keap1 mutandiga sai domineerivaks selline polüubikvitineerimine, mis ei ole 26S proteosoomiga seotud, näiteks kasutati teisi lüsiine peale K48. Kuigi selles magistritöös proteosoomi inhibiitorite mõju valgule MCM7 ei vaadatud, võis teiste katsete tulemuste puhul siiski järeldada, et ka MCM7 polüubikvitineeritakse Keap1 sõltuvalt ning lagundatakse seejärel 26S proteosoomis. See seletaks MCM7 madala taseme metsiktüüpi Keap1 juuresolekul.

Kuna Keap1-Nrf2 on rakus primaarne kaitsemehhanism oksüdatiivse stressi vastu, siis uuriti, kas Keap1 sõltuv MCM3 ubikvitineerimine ja degradatsioon on reguleeritud oksüdatiivse stressi poolt. Positiivse kontrollina kasutati Keap1 tuntuimat substraatvalku Nrf2. Nrf2 valgu tasemeid reguleeriti kahe erineva Keap1 sõltuva raja poolt, millest stressile reageeris ainult ETGE motiivist sõltuv rada. Erinevalt positiivsest kontrollist, MCM3 ei reageerinud stressile. Muutusi polnud näha ei MCM3 valgu tasemetes ega ubikvitineerimises.

Keap1-Nrf2 raja puhul on teada, et stressi olukorras modifitseeritakse Keap1 tsüsteiini jääke kovalentselt ning seetõttu katkeb nõrk side Keap1 ja Nrf2 DLG motiivi vahel, ETGE motiiv jääb Keap1-ga seotuks (Kobayashi et al., 2006; Tong et al., 2006a). Valgus MCM3 on ainult ETGE motiiv ja seega Keap1-Nrf2 rajaga samasugust erinevate motiividega interaktsioonist tulenevat regulatsiooni ei saa olla. Valgus MCM7, mis helikaasi heksameeris asub valgu MCM3 kõrval (Costa et al., 2011), on VSGE motiiv, mis võiks olla teiseks, nõrgema afiinsusega motiiviks, millega Keap1 seondub. Antud magistritöös kasutatakse Keap1-Nrf2 rada analoogina Keap1-MCM3 interaktsioonile, kuid tegu on siiski täiesti teise rajaga ning kõike ei saa alati üks-ühele üle kanda.

Saadud tulemused on väga heaks aluseks edasise Keap1 ning MCM3 ja MCM7 vahelise interaktsiooni uurimiseks. Juba kasutusel olevaid meetodeid võiks kombineerida uutega. Näiteks erinevate polüubikvitiini kettide identifitseerimiseks on kommertsiaalselt saadavad spetsiifilised antikehad, mida saaks kasutada erinevate Keap1 sõltuvate radade eristamiseks. Viimasel ajal kasutatakse ubikvitineerimise uurimisel aina rohkem mass-spektromeetriat, mis võimaldab täpselt kindlaks määrata, missuguseid aminohappeid substraatvalgus polüubikvitiini keti moodustamisel kasutati. Lisaks muteeritud Keap1-le võiks kasutada ka Keap1^{-/-} MEF-e (ingl *mouse embryonic fibroblast*), mis lubaks endogeensete valkude abil uurida MCM3 ja MCM7 ubikvitineerimise ja degradatsiooni sõltuvust Keap1-st nii normaaltingimustes kui vastusena oksüdatiivsele stressile.

Replikatsiooni initsiatsioon on inimese rakkudes mitmel tasandil reguleeritud ja Keap1 sõltuv helikaasi alaühikute degradatsioon võiks olla üheks neist tasanditest. Keap1 võib hoida MCM3 ja MCM7 tsütoplasmas ning vahendada nende valkude ubiquitineerimist. Sellega takistaks Keap1 MCM-ide liikumist tuuma, mis võiks olla lisa kontrolliks replikatsiooni initsiatsioonile. Teema on väga aktuaalne nii üldises kui vähi kontekstis ning edasised katsed selgitavad detailsemalt Keap1 sõltuva MCM3 ja MCM7 ubiquitineerimise rolli genoomi replikatsiooni regulatsioonis.

KOKKUVÕTE

Täpne genoomi duplikatsioon on eukarüootide jaoks hädavajalik ning vead DNA replikatsioonis viivad genoomi ebastabiilsuse ja paljude haiguste tekkeni. Replikatsiooni initsiatsioon on lahutatud kaheks eri ajal toimuvaks protsessiks, kus kõigepealt G1 faasis laetakse inaktiivne helikaas kromatiinile ja seejärel S faasis helikaas aktiveeritakse. Replikatiivse helikaasi kompleksi CMG (Cdc45, MCM2-7, GINS) mootoriks on heteroheksameerne MCM2-7 valgukompleks.

Keap1 on rakus oksüdatiivse stressi sensorvalk, mis normaaltingimustes vahendab transkriptsioonifaktori Nrf2 ubiquitineerimist ja degradatsiooni 26S proteosoomis. Keap1-ga seondumiseks on valgus Nrf2 vajalikud madala afiinsusega DLG ja kõrge afiinsusega ETGE motiivid. Oksüdatiivse stressi olukorras modifitseeritakse Keap1 kovalentselt, nõrk side Keap1 ja Nrf2 DLG motiivi vahel katkeb ning sellega inaktiveeritakse Keap1 inhibitoorne mõju valgule Nrf2.

Ainsana inimese MCM2-7 helikaaskompleksi alaühikutest on valgul MCM3 samasugune ETGE motiiv, mis on osa β -juuksenõela struktuurist. MCM7 on samas kohas sarnane VSGE järjestus. Seega arvati, et valkude MCM3 ja MCM7 taset rakus võidakse reguleerida Keap1 sõltuvalt analoogselt valgule Nrf2. Antud magistritöös näidati, et CMG helikaasi alaühikuid MCM3 ja MCM7 polüubikvitineeritakse Keap1 sõltuvalt üle K48 ning degradeeritakse 26S proteosoomi poolt, kuid erinevalt Nrf2-st, Keap1 sõltuvat MCM3 ubiquitineerimist ja proteosomaalset degradatsiooni ei reguleerita vastusena oksüdatiivsele stressile. Selles töös kirjeldatud Keap1 sõltuva replikatiivse helikaasi alaühikute tasemete regulatsiooni võidakse ära kasutada replikatsiooni kontrollimisel normaaltingimustes. Saadud tulemused on väga heaks aluseks Keap1 sõltuva replikatsiooni regulatsiooni edasiseks uurimiseks nii normaaltingimustes kui oksüdatiivse stressi olukorras.

The regulation of ubiquitination and protein levels of CMG replicative helicase complex subunits MCM3 and MCM7 by oxidative stress response protein Keap1

Carmen Kivisild

SUMMARY

Eukaryotic DNA replication must be tightly regulated to promote precise genome duplication in every cell cycle. Loss of proper licensing control leads to deregulated DNA replication, which can cause genome instability and pathogenesis of many diseases. The dynamic control of DNA replication initiation is partitioned into two temporally discrete steps: an inactive MCM complex is first loaded at replication origins during G1 phase and then converted to the active CMG (Cdc45, MCM, GINS) helicase during S phase. The motor component of CMG complex is a heterohexameric MCM2-7 ring.

Keap1 is a well known sensor and regulator of the oxidative stress response that promotes transcription factor Nrf2 ubiquitination and degradation by the 26S proteasome under unstressed conditions. Keap1 recognizes Nrf2 via two binding sites, the stronger binding ETGE motif and the weaker binding DLG motif. Under oxidative/electrophilic stress, reactive cysteines of Keap1 are modified by oxidants. Cysteine modification is likely to induce conformational changes of Keap1, hence leading to detachment of the weak-binding DLG motif from Keap1. This attenuates both polyubiquitination and proteasomal degradation of Nrf2 and results in an enhanced nuclear accumulation of Nrf2.

MCM3 is the only CMG helicase subunit that has the same ETGE motif as Nrf2 has. This ETGE motif is part of the β -hairpin secondary structure. MCM7 has a similar VSGE motif that could be also suitable for interaction with Keap1. Therefore, we hypothesized that the protein levels of MCM3 and MCM7 may be regulated by Keap1. We found that helicase subunits MCM3 and MCM7 are both polyubiquitinated in Keap1 dependent manner and degraded in 26S proteasome. We also showed that MCM3 polyubiquitination and degradation are not regulated by the oxidative stress response. Hence, we propose that Keap1 dependent ubiquitination of replicative helicase subunits may be critical for direct regulation of DNA replication in normal conditions. These results form a good basis for further investigation of Keap1 dependent replication regulation both under unstressed and stressed conditions.

KIRJANDUSE LOETELU

- Barry, E.R., McGeoch, A.T., Kelman, Z., and Bell, S.D. (2007). Archaeal MCM has separable processivity, substrate choice and helicase domains. *Nucleic Acids Res.* *35*, 988–998.
- Bell, S.P., and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 333–374.
- Bell, S.P., and Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* *357*, 128–134.
- Bloom, J., Amador, V., Bartolini, F., DeMartino, G., and Pagano, M. (2003). Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitylation. *Cell* *115*, 71–82.
- Blow, J.J., and Dutta, A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 476–486.
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A., and Ciechanover, A. (1998). A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J.* *17*, 5964–5973.
- Brewster, A.S., Wang, G., Yu, X., Greenleaf, W.B., Carazo, J.M., Tjajadi, M., Klein, M.G., and Chen, X.S. (2008). Crystal structure of a near-full-length archaeal MCM: Functional insights for an AAA+ hexameric helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 20191–20196.
- Bulatov, E., and Ciulli, A. (2015). Targeting Cullin-RING E3 ubiquitin ligases for drug discovery: structure, assembly and small-molecule modulation. *Biochem. J.* *467*, 365–386.
- Cadwell, K., and Coscoy, L. (2005). Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* *309*, 127–130.
- Ciechanover, A., and Ben-Saadon, R. (2004). N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol.* *14*, 103–106.
- Ciechanover, A., and Stanhill, A. (2014). The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochim. Biophys. Acta* *1843*, 86–96.
- Costa, A., and Onesti, S. (2009). Structural biology of MCM helicases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *44*, 326–342.
- Costa, A., Ilves, I., Tamberg, N., Petojevic, T., Nogales, E., Botchan, M.R., and Berger, J.M. (2011). The structural basis for MCM2–7 helicase activation by GINS and Cdc45. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 471–477.
- Cullinan, S.B., Gordan, J.D., Jin, J., Harper, J.W., and Diehl, J.A. (2004). The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 8477–8486.
- Deshaies, R.J., and Joazeiro, C.A.P. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 399–434.

- Dias, D.C., Dolios, G., Wang, R., and Pan, Z.-Q. (2002). CUL7: A DOC domain-containing cullin selectively binds Skp1·Fbx29 to form an SCF-like complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 16601–16606.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., and Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11908–11913.
- Dynek, J.N., Goncharov, T., Dueber, E.C., Fedorova, A.V., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Helgason, E., Fairbrother, W.J., Deshayes, K., Kirkpatrick, D.S., et al. (2010). c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *EMBO J.* *29*, 4198–4209.
- 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.
- Evrin, C., Fernández-Cid, A., Riera, A., Zech, J., Clarke, P., Herrera, M.C., Tognetti, S., Lurz, R., and Speck, C. (2014). The ORC/Cdc6/MCM2-7 complex facilitates MCM2-7 dimerization during prereplicative complex formation. *Nucleic Acids Res.* *42*, 2257–2269.
- Fernández-Cid, A., Riera, A., Tognetti, S., Herrera, M.C., Samel, S., Evrin, C., Winkler, C., Gardenal, E., Uhle, S., and Speck, C. (2013). An ORC/Cdc6/MCM2-7 Complex Is Formed in a Multistep Reaction to Serve as a Platform for MCM Double-Hexamer Assembly. *Mol. Cell* *50*, 577–588.
- Fu, Y.V., Yardimci, H., Long, D.T., Ho, T.V., Guainazzi, A., Bermudez, V.P., Hurwitz, J., van Oijen, A., Schäfer, O.D., and Walter, J.C. (2011). Selective bypass of a lagging strand roadblock by the eukaryotic replicative DNA helicase. *Cell* *146*, 931–941.
- Furukawa, M., and Xiong, Y. (2005). BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 162–171.
- Galan, J.M., and Haguenaer-Tsapis, R. (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J.* *16*, 5847–5854.
- Gatti, M., Pinato, S., Maiolica, A., Rocchio, F., Prato, M.G., Aebersold, R., and Penengo, L. (2015). RNF168 Promotes Noncanonical K27 Ubiquitination to Signal DNA Damage. *Cell Rep.* *10*, 226–238.
- Geisler, S., Holmström, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., and Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* *12*, 119–131.
- Geyer, R., Wee, S., Anderson, S., Yates, J., and Wolf, D.A. (2003). BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Mol. Cell* *12*, 783–790.
- Goto, E., Yamanaka, Y., Ishikawa, A., Aoki-Kawasumi, M., Mito-Yoshida, M., Ohmura-Hoshino, M., Matsuki, Y., Kajikawa, M., Hirano, H., and Ishido, S. (2010). Contribution of lysine 11-linked ubiquitination to MIR2-mediated major histocompatibility complex class I internalization. *J. Biol. Chem.* *285*, 35311–35319.

- Groettrup, M., Pelzer, C., Schmidtke, G., and Hofmann, K. (2008). Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends Biochem. Sci.* *33*, 230–237.
- Hast, B.E., Goldfarb, D., Mulvaney, K.M., Hast, M.A., Siesser, P.F., Yan, F., Hayes, D.N., and Major, M.B. (2013). Proteomic Analysis of Ubiquitin Ligase KEAP1 Reveals Associated Proteins That Inhibit NRF2 Ubiquitination. *Cancer Res.* *73*, 2199–2210.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 425–479.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* *258*, 8206–8214.
- Huang, H., Jeon, M.-S., Liao, L., Yang, C., Elly, C., Yates, J.R., and Liu, Y.-C. (2010). K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity* *33*, 60–70.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P.M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 2563–2567.
- 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.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., et al. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *236*, 313–322.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* *13*, 76–86.
- Iwai, K., and Tokunaga, F. (2009). Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation. *EMBO Rep.* *10*, 706–713.
- Iyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.* *146*, 11–31.
- Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K.B., Awuh, J.A., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J.D., and Johansen, T. (2010). p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J. Biol. Chem.* *285*, 22576–22591.
- Jenkinson, E.R., and Chong, J.P.J. (2006). Minichromosome maintenance helicase activity is controlled by N- and C-terminal motifs and requires the ATPase domain helix-2 insert. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 7613–7618.
- Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M., and Varshavsky, A. (1995). A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J. Biol. Chem.* *270*, 17442–17456.

- Kamura, T., Koepp, D.M., Conrad, M.N., Skowyra, D., Moreland, R.J., Iliopoulos, O., Lane, W.S., Kaelin, W.G., Elledge, S.J., Conaway, R.C., et al. (1999). Rbx1, a Component of the VHL Tumor Suppressor Complex and SCF Ubiquitin Ligase. *Science* 284, 657–661.
- Kang, M.-I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.-G., and Yamamoto, M. (2004). Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2046–2051.
- Kansanen, E., Jyrkkänen, H.-K., and Levonen, A.-L. (2012). Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 973–982.
- Katoh, Y., Iida, K., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Mizukami, M., Tong, K.I., McMahon, M., Hayes, J.D., Itoh, K., and Yamamoto, M. (2005). Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 342–350.
- Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., and Iwai, K. (2006). A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J.* 25, 4877–4887.
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7130–7139.
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Watai, Y., Tong, K.I., Shibata, T., Uchida, K., and Yamamoto, M. (2006). Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 221–229.
- Kobayashi, M., Itoh, K., Suzuki, T., Osanai, H., Nishikawa, K., Katoh, Y., Takagi, Y., and Yamamoto, M. (2002). Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 7, 807–820.
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., et al. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* 12, 213–223.
- Kulathu, Y., and Komander, D. (2012). Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 508–523.
- Labib, K. (2010). How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells? *Genes Dev.* 24, 1208–1219.
- Leinonen, H.M., Kansanen, E., Pölönen, P., Heinäniemi, M., and Levonen, A.-L. (2014). Role of the Keap1-Nrf2 pathway in cancer. *Adv. Cancer Res.* 122, 281–320.
- Li, W., and Ye, Y. (2008). Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 2397–2406.
- Liang, C., Weinreich, M., and Stillman, B. (1995). ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome. *Cell* 81, 667–676.

- Lo, S.-C., Li, X., Henzl, M.T., Beamer, L.J., and Hannink, M. (2006). Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J.* *25*, 3605–3617.
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S., and Weissman, A.M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 11364–11369.
- Maric, M., Maculins, T., De Piccoli, G., and Labib, K. (2014). Cdc48 and a ubiquitin ligase drive disassembly of the CMG helicase at the end of DNA replication. *Science* *346*, 1253596.
- McDowell, G.S., and Philpott, A. (2013). Non-canonical ubiquitylation: mechanisms and consequences. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 1833–1842.
- Moreno, S.P., Bailey, R., Campion, N., Herron, S., and Gambus, A. (2014). Polyubiquitylation drives replisome disassembly at the termination of DNA replication. *Science* *346*, 477–481.
- Moyer, S.E., Lewis, P.W., and Botchan, M.R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2–7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 10236–10241.
- Namani, A., Li, Y., Wang, X.J., and Tang, X. (2014). Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: Implications for cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1843*, 1875–1885.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., and Koonin, E.V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* *9*, 27–43.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J., Huang, H.-C., Yang, C.S., and Pickett, C.B. (2003). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* *278*, 4536–4541.
- Nishikawa, H., Ooka, S., Sato, K., Arima, K., Okamoto, J., Klevit, R.E., Fukuda, M., and Ohta, T. (2004). Mass Spectrometric and Mutational Analyses Reveal Lys-6-linked Polyubiquitin Chains Catalyzed by BRCA1-BARD1 Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.* *279*, 3916–3924.
- Ogura, T., and Wilkinson, A.J. (2001). AAA+ superfamily ATPases: common structure–diverse function. *Genes Cells* *6*, 575–597.
- Ogura, T., Tong, K.I., Mio, K., Maruyama, Y., Kurokawa, H., Sato, C., and Yamamoto, M. (2010). Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 2842–2847.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S.P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* *21*, 921–926.
- Petroski, M.D., and Deshaies, R.J. (2005). Function and regulation of cullin–RING ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 9–20.

- Pintard, L., Willis, J.H., Willems, A., Johnson, J.-L.F., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P.E., Tyers, M., Bowerman, B., et al. (2003). The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature* 425, 311–316.
- Randell, J.C.W., Bowers, J.L., Rodríguez, H.K., and Bell, S.P. (2006). Sequential ATP Hydrolysis by Cdc6 and ORC Directs Loading of the Mcm2-7 Helicase. *Mol. Cell* 21, 29–39.
- Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J.D., Morris, E.P., and Diffley, J.F.X. (2009). Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell* 139, 719–730.
- Riera, A., Tognetti, S., and Speck, C. (2014). Helicase loading: how to build a MCM2-7 double-hexamer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 30, 104–109.
- Sakakibara, N., Kelman, L.M., and Kelman, Z. (2009). Unwinding the structure and function of the archaeal MCM helicase. *Mol. Microbiol.* 72, 286–296.
- Sheu, Y.-J., and Stillman, B. (2006). Cdc7-Dbf4 phosphorylates MCM proteins via a docking site-mediated mechanism to promote S phase progression. *Mol. Cell* 24, 101–113.
- 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.
- Shibata, T., Ohta, T., Tong, K.I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., Asamura, H., Yamamoto, M., and Hirohashi, S. (2008). Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13568–13573.
- Siddiqui, K., On, K.F., and Diffley, J.F.X. (2013). Regulating DNA replication in eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R.K., Lee, H., Ames, S., Hoque, M.O., Herman, J.G., Baylin, S.B., Sidransky, D., Gabrielson, E., et al. (2006). Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med.* 3, e420.
- Speck, C., Chen, Z., Li, H., and Stillman, B. (2005). ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 965–971.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L., and Finley, D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1265–1273.
- Spence, J., Gali, R.R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M., and Finley, D. (2000). Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* 102, 67–76.
- Stogios, P.J., Downs, G.S., Jauhal, J.J.S., Nandra, S.K., and Privé, G.G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol.* 6, R82.
- Sun, J., Evrin, C., Samel, S., Fernández-Cid, A., Riera, A., Kawakami, H., Stillman, B., Speck, C., and Li, H. (2013). Cryo-EM structure of a helicase loading intermediate containing ORC-Cdc6-Cdt1-MCM2-7 bound to DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 944–951.
- Sun, Z., Zhang, S., Chan, J.Y., and Zhang, D.D. (2007). Keap1 Controls Postinduction Repression of the Nrf2-Mediated Antioxidant Response by Escorting Nuclear Export of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6334–6349.

- Taguchi, K., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* 16, 123–140.
- Tanaka, S., and Araki, H. (2013). Helicase activation and establishment of replication forks at chromosomal origins of replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a010371.
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2007). CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* 445, 328–332.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19, 94–102.
- Tognetti, S., Riera, A., and Speck, C. (2015). Switch on the engine: how the eukaryotic replicative helicase MCM2-7 becomes activated. *Chromosoma* 124, 13–26.
- Tong, K.I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., and Yamamoto, M. (2006a). Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2887–2900.
- Tong, K.I., Kobayashi, A., Katsuoka, F., and Yamamoto, M. (2006b). Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biol. Chem.* 387, 1311–1320.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- Wang, H., Liu, K., Geng, M., Gao, P., Wu, X., Hai, Y., Li, Y., Li, Y., Luo, L., Hayes, J.D., et al. (2013). RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res.* 73, 3097–3108.
- Wang, X., Herr, R.A., Chua, W.-J., Lybarger, L., Wiertz, E.J.H.J., and Hansen, T.H. (2007). Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *J. Cell Biol.* 177, 613–624.
- Wickliffe, K.E., Williamson, A., Meyer, H.-J., Kelly, A., and Rape, M. (2011). K11-linked ubiquitin chains as novel regulators of cell division. *Trends Cell Biol.* 21, 656–663.
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J. (2009). Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation. *Cell* 137, 133–145.
- Yang, W.-L., Zhang, X., and Lin, H.-K. (2010). Emerging role of Lys-63 ubiquitination in protein kinase and phosphatase activation and cancer development. *Oncogene* 29, 4493–4503.
- Ye, Y., and Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 755–764.
- Yeeles, J.T.P., Deegan, T.D., Janska, A., Early, A., and Diffley, J.F.X. (2015). Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature* 519, 431–435.

Yuan, W.-C., Lee, Y.-R., Lin, S.-Y., Chang, L.-Y., Tan, Y.P., Hung, C.-C., Kuo, J.-C., Liu, C.-H., Lin, M.-Y., Xu, M., et al. (2014). K33-Linked Polyubiquitination of Coronin 7 by Cul3-KLHL20 Ubiquitin E3 Ligase Regulates Protein Trafficking. *Mol. Cell* 54, 586–600.

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.

Zhang, D.D., Lo, S.-C., Cross, J.V., Templeton, D.J., and Hannink, M. (2004). Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10941–10953.

Zhang, D.D., Lo, S.-C., Sun, Z., Habib, G.M., Lieberman, M.W., and Hannink, M. (2005). Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch Substrate Adaptor Protein for Cul3, Targets Keap1 for Degradation by a Proteasome-independent Pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 30091–30099.

Zipper, L.M., and Mulcahy, R.T. (2002). The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 277, 36544–36552.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma juhendajat, Ivar Ilvest, võimaluse eest teha oma magistritööd tema laboris. Aitäh, Ivar, sinu kriitiliste ent asjalike nõuannete eest! Lisaks sooviksin tänada oma toredaid laborikaaslasi, kes olid mu esimesed sõbrad Tartus.

Sandra, ma sain alati laboris sinu peale loota, kui pidin rongi peale jooksuma või kui tahtsin lõunale minna. Sa ei öelnud kunagi ei, kui mul midagi vaja oli. Sa oled väga hea teadlane ja veel parem sõber, aitäh selle eest!

Siret, me oleme sinuga ühe mündi kaks erinevat poolt. Mõni päev sa rõõmustasid mind, teine päev vihastasid, aga sellega muutsid kõik mu tööpäevad lõbusamaks ja huvitavamaks, aitäh selle eest!

Nele, sinu huumorisoon vürtsitas meie igapäevaelu. Mõnus oli vahet lobiseda ka muust elust peale laborielu, aitäh selle eest!

Märt ja Gerda, teil mõlemal on alles kõik ees. Huvitav oli teid vaadata ja meenutada ennast, kui ma esimest korda laborisse tööle tulin. Kindlasti saate hästi hakkama!

LIHTLITSENTS

Mina, Carmen Kivisild (08.08.1991),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Oksüdatiivse stressi sensorvalk Keap1 kui replikatiivse helikaasi alaühikute MCM3 ja MCM7 ubikvitineerimise ja taseme regulaator“,

mille juhendaja on Ivar Ilves,

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

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 26.05.2015