

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

**MAP kinaasi Fus3 poolt indutseeritavate sünteetiliste fosfodegronite disainimine ja
testimine *Saccharomyces cerevisiae* rakkudes**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Nele Kuusma

Juhendaja MSc Ervin Valk

TARTU 2017

Infoleht

MAP kinaasi Fus3 poolt indutseeritavate sünteetiliste fosfodegronite disainimine ja testimine *Saccharomyces cerevisiae* rakkudes

Signaalirajad moodustavad rakus keerulisi võrgustikke, mida mööda liigub raku elutegevuseks oluline informatsioon. Signaaliradade abil reguleeritakse rakutsüklit ning tehakse rakusiseseid otsuseid. Sünteetiliste signaaliradade loomine annab võimaluse rakke soovitud suunas juhtida ning seeläbi kutsuda esile apoptoos, saada informatsiooni raku elukeskkonna kohta või toota rakus vajalikke ühendeid. Käesolevas töös uuriti, kuidas sünteetilisi signaaliradu juhtida fosfodegronite abil. Esimese etapina disainiti katsesüsteem ning fosfodegroni ja EGFP liitvalk, mis võimaldas *in vivo* jälgida MAP kinaasi Fus3 poolt indutseeritud valgu lagundamist. Käesolevas bakalaureusetöös loodud katsesüsteemi ja kogutud andmeid saab edaspidi kasutada täpsemate omadustega fosfodegronite disainimiseks, et seeläbi paremini reguleerida sünteetilisi signaaliradasid.

Märksõnad: fosforüleerimine, rakutsükkel, degron, kinaas, signaalirada

CERCS kood: P310 (proteiinid, enüümid)

Abstract

Design and testing of synthetic phosphodegrons induced by MAP kinase Fus3 in *Saccharomyces cerevisiae*

There are complicated signalling circuits inside cells that are passing important information. Cell cycle and cell decisions are also regulated by signals. By designing synthetic signalling circuits it is possible to lead the cells to desired direction, for example send cells to apoptoses, get information about the environmental background of a cell or produce desired chemicals. This work shows the structure of phosphodegron, which is able to initiate degradation of a protein and is possible to use as a regulator of a signalling circuit. The designed phosphodegron was able to bind MAP kinase Fus3 and initiate degradation of EGFP added to the substrate protein. This research helps to understand the structure of a phosphodegron and provides knowledge to design better phosphodegrons in future.

Key words: phosphorylation, cell cycle, kinase, degron, signalling circuit

CERCS research code: P310 (Proteins, enzymology)

Sisukord

| | |
|--|----|
| Infoleht | 2 |
| Kasutatud lühendid | 4 |
| Sissejuhatus | 5 |
| 1. Kirjanduse ülevaade | 6 |
| 1.1 Raku elutegevuse reguleerimine..... | 6 |
| 1.2 Signaalirajad rakus | 6 |
| 1.3 Kinaaside spetsiifilisus | 8 |
| 1.4 Rakulised moodulid..... | 9 |
| 1.5 Valkude lagundamine ubikvitiini-proteosoomi rajal | 10 |
| 1.6 Valkude lagundamise initsiaator ehk degron..... | 12 |
| 1.7 Valkude lagundamine fosfodegronite abil..... | 13 |
| 1.9 Sünteetilise bioloogia rakendused | 16 |
| 2. Ekperimentaalosa..... | 19 |
| 2.1 Töö praktilise osa eesmärgid | 19 |
| 2.2 Materjal ja meetodika..... | 19 |
| 2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid, tüved ja söötmed..... | 19 |
| 2.2.2 Töös kasutatud sünteetilised DNA-d ja praimerid | 20 |
| 2.2.3 Fosfodegronite ja EGFP liitvalkude klonimine pRS416 plasmidi | 20 |
| 2.2.4 Fosfodegronite klonimine pGEX-4T-1 vektorisse | 23 |
| 2.2.5 Fosfodegronite EGFP ja GST liitvalke kodeerivate plasmiidide transformeerimine <i>E. coli</i> DH5 α tüvesse..... | 24 |
| 2.2.6 Plasmiidide puhastamine <i>E. coli</i> DH5 α tüvest..... | 24 |
| 2.2.7 Fosfodegronite ja EGFP liitvalku kodeerivate plasmiidide transformatsioon pärmitüvesse DK252 | 24 |
| 2.2.8 GST-märgisega fosfodegronite puhastamine bakterist..... | 25 |
| 2.2.9 <i>In vitro</i> kinaasireaktsioonid | 26 |
| 2.2.10 Fosfodegronite analüüsimine <i>in vivo</i> | 27 |
| 2.3 Tulemused ja arutelu | 29 |
| 2.3.1 Fosfodegronite disainimine | 29 |
| 2.3.2 Fosfodegronite analüüs <i>in vivo</i> | 31 |
| 2.3.3 Fosfodegronite analüüs <i>in vitro</i> | 33 |
| Kokkuvõte | 37 |
| Summary..... | 38 |
| Kasutatud kirjanduse loetelu | 40 |
| Kasutatud veebiaadressid | 43 |
| Lihtlitsents | 44 |

Kasutatud lühendid

CDK – i.k *Cyclin-dependent kinase* (tsükliinist sõltuv kinaas)

DTT - ditiotreitool

GST – glutatuiioon-S-transferaas

MAPK – i.k *Mitogen-activated Protein* (mitogeeni poolt aktiveeritud valk)

NLS – i.k *nuclear localization signal* (tuumaimpordivalk)

NES – i.k *nuclear export signal* (tuumaekspordivalk)

PAA – polüakrüülamiid

SCF – i.k *Skp, Cullin, F-box*

Sissejuhatus

Rakkude põhiliseks ehitusmooduliks on valgud. Valkudest koosnevad paljud rakkude struktuursed ja funktsionaalsed osad, millel on mitmeid erinevaid funktsioone. Nii ensüümid, antikehad kui ka osad hormoonid on oma olemuselt valgud. Valgud on olulised vahendid ka rakkude vahelise ning rakkude ja keskkonna vahelise kommunikatsiooni toimimises. Kogutud teavet juhitakse rakkudes mööda valkudest koosnevaid signaaliradu. Signaaliradade ülesehitus on keeruline, nad moodustavad kompleksseid võrgustikke üle raku ning tagavad et oluline informatsioon jõuaks sihtmärgini.

Signaaliradade juhtimisel toimuvad rakus paljud protsessid. Signaaliradade abil juhitakse rakutsükli ja immuunvastust ning saadetakse rakud apoptoosi. Mittetoimivad signaalirajad on vastutavad paljude haiguste eest nagu näiteks vähk, autoimmuunhaigused või diabeet. Seetõttu on oluline mõista signaaliradade ülesehitust, et leida erinevate haiguste põhjus ning osata signaaliradu parandada ja luua sellega uusi ravimeetodeid. Sünteetilisi signaaliradu konstrueerides on võimalik erinevate keskkonnatingimuste abil juhtida rakke soovitud suunas. Nii on võimalik haigeid või pidurdamatult jagunevaid rakke suunata apoptoosi või reguleerida rakutsükli, peatades rakkude arengu mõnes rakutsükli kontrollpunktis. Sünteetilisi signaaliradu on võimalik disainida ka selleks, et toota ravimeid ja kemikaale ilma keerukate ja kulukate keemiliste sünteesideta.

Signaaliradu juhitakse raja valguliste komponentide aktiveerimise või lagundamise teel. Valke lagundatakse peamiselt ubikvitiini-proteosoomi rajal, kuhu nad suunatakse erinevate märgistuste abil. Üheks võimaluseks valke lagundamiseks märkida on fosfodegronite kaudu. Näiteks fosforüleeritakse sihtmärkvalgu fosfodegronid mõne signaalirada reguleeriva valgu poolt. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks oli konstrueerida fosfodegronid, mis fosforüleeritakse pärmi feromooniraja MAP kinaasiga Fus3 ning initsieeriksid substraatvalgu lagundamise, samuti sooviti katsetada loodud fosfodegronite toimimist elusrakkudes. Lisaks sellele sooviti analüüsida fosfodegroni aminohappelise järjestuse spetsiifilisuse olulisust kinaasiga seondumisel, et sellest lähtuvalt teostada edasisi katseid efektiivsemate fosfodegronite loomiseks.

Käesolev bakalaureusetöö teostati Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi molekulaarse süsteemibioloogia uurimisgrupis.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Raku elutegevuse reguleerimine

Elussüsteemide põhiline ülesanne on reageerida keskkonnatingimustele ning vastavalt kogutud informatsioonile juhtida süsteemi edasist tegevust. Ka raku tasandil jälgitakse ekstratsellulaarseid signaale, et reguleerida raku elutegevust (Marshall, 1995). Nii teab rakk, millal on õige aeg jagunemiseks, arenguks või paremate tingimuste ootamiseks. Rakke kui elusorganismide ehituskive on uuritud juba sajandeid. Tänapäevaks on üsna hästi teada rakkude struktuursed osad, kuid nende osade vaheline kommunikatsioon on keerukas ning raskesti uuritav (Perbal, 2003).

Rakkudes edastatakse informatsiooni peamiselt mööda signaaliradu, erinevate signaalide õiges suunas juhtimiseks on signaaliradade ülesehitus arenenud keeruliseks. Samas on signaaliradade uurimine oluline, kuna nende kaudu on võimalik raku juhtida soovitud suunas. Eukarüootsetes rakkudes on signaalirajad omavahel ühenduses ning jagavad mitmeid komponente. Nii on signaaliradadel võimalik anda edasi kompleksseid signaale (Jordan *et al.*, 2000). Signaaliradade keerukus tõstab plastilisust raku sees signaalide juhtimisel, signaali edastamiseks on võimalik kasutada ka alternatiivseid signaaliradu ja saada peaaegu identne väljund. See teeb rakud töökindlamaks ning ennetab järske letaalseid muutuseid (Hao *et al.*, 2007).

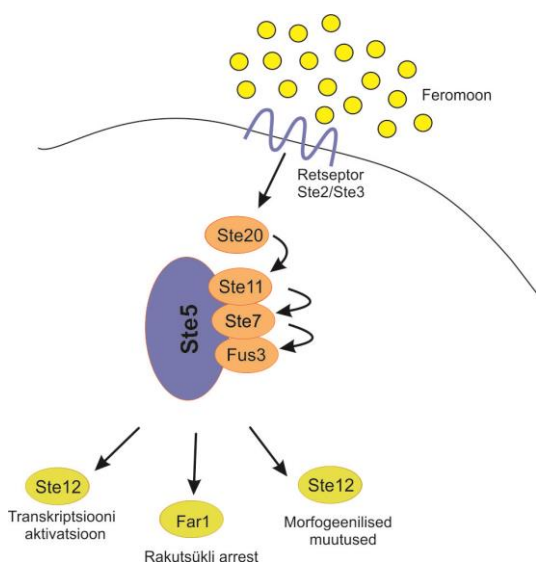
Signaaliradade abil juhitakse ka rakutsükli, mis reguleerib raku elutegevust etapiviisiliselt. Rakutsükli käigus valmistatakse rakk ette jagunemiseks ning kindlustatakse geneetiliselt, funktsionaalselt ja struktuuriliselt sobivate tütarakkude arenemine. Rakutsükkel koosneb neljast põhilisest faasist: G1, S, G2 ja M. Iga faasi jooksul töötavad raku rakutsükli reguleerivad valgud, mis juhivad eluliselt olulisi protseduure nagu näiteks DNA replikatsiooni ja raku komponentide jagamist tütarakkudesse (Collins *et al.*, 1997). Enne ühest faasist teise minekut kontrollitakse rakutsükli kontrollpunktides tehtud töö veel kord üle. Selle eest vastutavad tsükliinid ja kinaasid. Igal rakutsükli etapil on oma funktsionaalsed valgud, mille kontsentratsiooni raku reguleeritakse valkude lagundamise kaudu (Reed, 2003).

1.2 Signaalirajad raku

Rakud suhtlevad üksteisega nii organismis kui ka vedelkultuuris, et tagada stabiilne elukeskkond. Selleks kasutatakse erinevaid signaale, nii keemilisi kui ka elektrilisi. Elektrilised signaalid on väga kiired ning eeldavad rakkude tihedat asetust, on levinud ajus ja südames. Keemilised signaalid on rakkudevahelises suhtluses levinumad, tõenäoliselt

seetõttu, et nendega on võimalik mõjutada suuremat hulka rakke kaugema vahemaa tagant. Keemilised signaalid on enamasti aeglasemad ning nendeks võivad olla hormoonid, feromoonid ja kasvufaktorid, mis käivitavad signaaliraja rakus (Hlavackona ja Jan, 2006). Signaaliraja komponente on võimalik lisaks keemilistele signaalidele aktiveerida ka posttranslatsiooniliste mõjutajatega nagu näiteks fosforülatsioon, atsetülatsioon või metülatsioon. Deaktivatsiooniks lagundatakse keemilised signaalmolekulid või eemaldatakse fosfaadid, atsetüül- või metüülosakesed (Ubersax ja Jr, 2007).

Signaaliradu on erinevaid, kuid enamasti toimivad nad valk-valk interaktsioonide põhiselt. Kasvufaktorite käivitatud signaaliradades on olulisel kohal kinaasid, mis fosforüleerivad iseend ja teisi valke ning viivad rajas signaali edasi. Üks uuritumaid kinaase on mitogeeni poolt aktiveeritav kinaas ehk MAPK (Campell *et al.*, 1995). MAP kinaasi kaskaade on leitud kõikides eukarüootides. Nii imetajarakkudes kui ka pärmis reguleerib MAPK kaskaad rakkude jagunemist, rakutsükli ja stressivastust. MAPK kaskaadis on neli põhilist komponenti, mis järgemisi üksteist fosforüleerivad. MKKK fosforüleeritakse MKKK kinaasi MKKKK poolt, MKK aktiveeritakse fosforüleerides MKK kinaasi ehk MKKK poolt ning MAPK aktiveeritakse fosforüleerides MAPK kinaasi (MKK) poolt. MAPK kaskaadi aktiveerivad reeglina kasvufaktorid, hormoonid ja tsütokinaasid, samuti võivad kaskaadi aktiveerida rakuline stress, mittestabiilne osmoos, DNA kahjustused ning bakteriaalsed produktid rakus. MAP kinaaside kaskaadil on pärmis feromoonirajas oluline roll. MAP kinaasid annavad edasi signaali retseptorilt sihtmärkvalkudeni. Pärmis feromoonirada on kirjeldatud joonisel 1.



Joonis 1. Pärmis feromooni rada. Raja käivitab pärmis paardumisferomoon α - või α -faktor. Feromooni tunneb ära retseptor ning edastab signaali Ste5 ja Ste20 kinaasidele, mis käivitavad MAP kinaaside kaskaadi. MAPK Fus3 või Kss1 aktiveerivad transkriptsioonifaktori Ste12 või rakutsükli arrestija Far1 (Cdk1 inhibiitor). Joonis muudetud kujul (Herskowitz, 1995).

S. cerevisiae feromoonirajas esineb mitogeeni poolt aktiveeritav kinaas ehk MAPK valguna Fus3 või Kss1, MKK rolli täidab Ste7, MKKK on Ste11, MKKK tähistatakse kui Ste20. Feromooni tunneb ära retseptor Ste2 või Ste3 (Garrington ja Johnson, 1999). MAPK kaskaadi kuulub ka tugivalk Ste5, mille ülesandeks on kinaasid hoida õiges kauguses üksteisest, et toetada kinaaside aktiveerimist (Elion, 2001).

MAP kinaasid, nagu ka Fus3, fosforüleerivad oma sihtmärke seriini ja treoniini jääkidel, millele järgneb proliin. MAP kinaasi Fus3 sihtmärgiks on Far1. Far1 on pärmi feromooni raja multifunktsionaalne regulaator ning Far1 aktivatsioon on vajalik feromoon sõltuva rakutsükli arestiks, et hoida ära raku jagunemine G1/S rakutsükli kontrollpunktis (Jeoung *et al.*, 1998). Pärmi feromooni rada on vajalik haploidsetele pärimüvedele paardumistüübiga α või α selleks, et paarduda. Feromooniraja käivitumisel on põhilisteks muutusteks rakkude arest G1 rakutsükli etapis, rakkude morfoloogilised muutused nagu näiteks *shmoo* moodustumine ning paardumisgeenide transkriptsioon (Herskowitz, 1995).

1.3 Kinaaside spetsiifilisus

Rakkudes on suurel hulgal valke ning paljud neist on kinaasse aktiivsusega. Et täita oma põhilist eesmärki – edastada signaale signaaliradades – peavad kinaasid olema spetsiifilised ja tegema oma tööd täpselt. Paljudel valgulistel substraatidel on sarnased seondumisalad ning oluline on õigel hetkel õige järjestus ära tunda. Kinaasid eristavad oma substraatvalgud teistest valkudest spetsiifiliste aminohappeliste konsensusjärjestuste järgi. Substraatvalgu konsensusjärjestus peab sobima kinaasi aktiivsaidiga. Kinaasid jagatakse aktiivsaidi järgi kaheks peamiseks grupiks: Ser/Thr-spetsiifilised ja Tyr-spetsiifilised kinaasid. Näiteks CDK sihtmärgi optimaalne fosforülatsioonimotiivide konsensus on S/T-P-X-K/R, kus X tähistab ükskõik millist aminohapet. Vähesema aktiivsusega fosforüleeritakse suboptimaalseid konsensusaite S/T-P (Mok *et al.*, 2011).

Lisaks aktiivsaidile on kinaasidest leitud seondumismotiive, millel võib olla mitmeid ülesandeid. Arvatakse, et seondumismotiivid võivad tõsta substraadi konsentratsiooni kinaasi läheduses ning aidata substraatvalgul jõuda kinaasi aktiivsaiti. Samas on täheldatud, et kindlate valkude interaktsioonid seondumissaitidel võivad reguleerida nii positiivselt kui ka negatiivselt kinaasi aktiivsust (Schulman ja Indstrom, 1998).

Kinaaside aktiivsaiteid ehk fosforülatsioonisaiteid järjestused on olulised, et toimuks õigete valkude fosforüleerimine. On tehtud katse, kus Sic1 CDK konsensusaids vahetati treoniinid seriinide vastu ning kontrolliti seondumist Cks1-ga. Selgus, et seondumist Cks1-ga ei toimunud. Samas Cks1 sõltumatu fosforülatsioon ei olnud mõjutatud, seega on treoniinid vajalikud just Cks1-ga seondumiseks. Samuti on olulised kinaaside fosforülatsioonisaiteid omavahelised kaugused nii *in vitro* kui ka *in vivo*. Kahe CDK konsensusmotiivi – esimese fosforülatsioonisaiteid TPQR ja teise fosforülatsioonisaiteid TPQA – omavahelise kauguse muutmise tulemusel leiti, et kõige efektiivsem fosforülatsioon toimus, kui kahe konsensusmotiivi omavaheline kaugus on 10-12 aminohapet. *In vivo* fosforülatsioonisaiteid kauguste olulisuse kontrollimiseks uuriti Sic1 varianti, millel on vähemalt 5 fosforülatsioonisaiteid. Leiti, et optimaalne vahemaa seondumisaiteid ja fosfodegronite vahel on 12-16 aminohapet. Tuginedes senistele uurimustele võib arvata, et ka teiste kinaaside puhul on olulised konsensusaiteid struktuur, järjestus ning omavahelised kaugused (Kõivomägi *et al.*, 2013).

1.4 Rakulised moodulid

Paljudel signaalse eesmärgiga valkudel nagu ka kinaasidel on modulaarne ülesehitus. Valkude motiivid nagu valk-valk interaktsioonidomäänid ja *output*-domäänid on oma olemuselt struktuurselt iseseisvad ning on leitud, et sellised domäänid võivad olla ka funktsionaalselt iseseisvad ja erinevate valkude vahel vahetatavad. Näiteks MAP kinaasi perekonna valgud interakteeruvad oma aktivaatorite ja sihtmärkidega, tuvastades spetsiifilisi seondumisaite. Need seondumisaiteid jäävad funktsionaalseks ka siis, kui neid viia mõnda teise positsiooni või vahetada välja mõne teise valgu seondumisaite (Grewal *et al.*, 2006). Nagu signaalvalgud, on tihti ka tugivalgud ja adaptorvalgud modulaarse konstruktsiooniga ning nende mooduleid on võimalik iseseisvalt kasutada erinevates valkudes. Lisaks sellele, et on suudetud konstrueerida uusi signaaliradu erinevatest komponentidest, on võimalik neid signaaliradu ka soovikohaselt kontrollida ja juhtida. Näiteks sidudes signaalse regulatsiooni ja geeniekspressiooni, on võimalik luua positiivse tagasiside süsteem, kus rada jääb edasi toimima ka siis, kui stiimul on juba kadunud. On tehtud katse, kus püsivalt aktiivne komponent pärmi feromooni rajast pandi transkriptsionaalse kontrolli alla. Nii loodi süsteem, kus initsiaatorsignaal käivitas raja ning rada jäi püsivalt käima, kuna sisse viidud komponent käivitas raja uuesti ja uuesti (Ingolia ja Murray, 2008).

Selleks, et ubikvitiin valgule seonduks ning valk transporditaks proteosoomi juurde, on vaja ATP-d ja ensüüme E1, E2 ja E3. Esmalt aktiveerib ensüüm E1 ubikvitiini adenüleerides ubikvitiini COOH-terminaalse glütsiini. Ensüümi E1 ja ubikvitiini, millel on sisemine tsüsteiini jääk, vahele moodustub kõrge energiaga tio-esterside. Seejärel kompleks transporditakse ensüümi E2 juurde (Ciechanover *et al.*, 1980). Ensüüm E2 on ubikvitiini vahendaja, mõnel pool nimetatud ka kui ubikvitiini kandja. Aktiveeritud ubikvitiin antakse E1 poolt üle ensüümile E2 ning seondatakse ensüümiga tio-estersideme abil. On leitud mitmeid E2 ensüüme, mida kodeeritakse nii pärmi *Saccharomyces cerevisiae* genoomilt kui ka imetajarakkudes. Osade E2 ensüümide töömehhanismid rakulistes protsessides on teada, kuid paljude ensüümide roll ei ole veel selge. Ubikvitiini-proteosoomi rajas transpordib E2 ubikvitiini kolmanda ensüümi juurde, milleks on E3. Ensüümi E3 nimetatakse ka ubikvitiini ligeerivaks ensüümiks, kuna E3 põhiliseks eesmärgiks on ubikvitiini ja substraatvalgu seondamine ning E2-E3-substraatkompleksi moodustamine (Hershkos *et al.*, 1983). Kuigi ensüümil E3 on olulisim roll ubikvitiini-proteosoomi rajas kõrge spetsiifilisuse tagamiseks, on teadaolevate E3 ensüümide arv väike. Tõenäoliselt on see tingitud asjaolust, et erinevate E3 ensüümide järjestused on üsna heterogeensed, mis teeb nende tuvastamise keerulisemaks. Kui ensüüm E3 on lisanud ubikvitiini substraadi või substraadi küljes oleva ubikvitiinahela külge ning ubikvitiinahelas on vähemalt 4 ubikvitiini, on valk märgistatud ning proteosoomil on võimalik see ära tunda (Ciechanover, 1998; Thrower *et al.*, 2000).

Ubikvitiini-proteosoomi raja teine osa vastutab valkude lagundamise eest. Põhilist osa mängib sealjuures proteosoom. Proteosoomi töö ei ole kerge, ta peab ära tundma väga heterogeensed valgud ning ka võõrad valgud, mis on raku sattunud väliskeskkonnast. Seega ei saa proteosoomil olla kindla järjestusega saiti, millega seonduda lagundatavale valgule. Samal ajal on proteosoomi töökeskkonnaks tsütosool ja raku tuum ning seal leidub palju raku eluks vajalikke valke. Seega peab proteosoom olema spetsiifiline ja suutma tuvastada ka väga varieeruva järjestusega valke, et kindlustada ainult lagundamisele määratud valkude lagundamine (Schrader *et al.*, 2009).

Proteosoomi on leitud mitmeid, kuid ubikvineeritud valke suudab tuvastada vaid 26S proteosoom. Proteosoom on ATP-st sõltuv proteaas, mis vastutab valkude lagundamise eest proteolüüsi kaudu. 26S proteosoom koosneb 20S kesksest katalüütilisest kompleksist ja 19S reguleerivast kompleksist. Kolm kompleksi moodustavad kokku silindrikujulise funktsionaalse kogumi, kuhu sisenenud valgud lagundatakse. 26S proteosoomi otstes asuvad värvate moodi üksused, millest pääsevad läbi kontrollitud ja lagundamiseks sobivad valgud.

19S kompleks tunneb ära ubikvitiinahelaga märgistatud valgu ning osaleb substraadi lahtipakkimisel, et see 20S kompleksi keskele suunata, kus aminohapete ahel lagundatakse lühikesteks aminohappelisteks järjestusteks. 20S kompleksi sisemusse pääsevad ainult lahtipakitud valgud, et ennetada vajalike valkude juhuslikku lagundamist (Murata *et al.*, 2009). Et valgud piisavalt lahti pakkida ja proteosoomi 20S silindrikujulisse lagundamiskompleksi suunata, tuleb valkude lagundamissobivuses täiesti kindel olla. On leitud, et ainult ubikvitiinahela seondumisest 19S partiklile ei piisa. Lisaks on vajalikud mittestruktuursed alad, mis tuntakse proteosoomi poolt ära ning sobivuse korral viiakse alates sellest alast valk 20S partikli sisemusse, kus algab valgu lagundamine. Valgu aminohappelise järjestuse mittestruktuurset ala ja ubikvitiini seondumisala loetakse kokku degroniks (Prakash *et al.*, 2004).

1.6 Valkude lagundamise initsiaator ehk degron

Valkude lagundamise suunamisel on põhiline roll degronil. Degron on valgu aminohappeline järjestus, mis annab signaali valgu lagundamiseks, olles seega üheks oluliseks osaks valkude lagundamise süsteemis (Cho ja Dreyfuss, 2010). Olemas on väga palju erinevaid ja erineva asukohaga degroneid. Näiteks võib degron asetseda nii N-terminaalses kui ka C-terminaalses otsas ning koosneb teadaolevalt kahest osast. Ühe osa aminohappelisele järjestusele kinnitub valgu märkimiseks märgis, mis koosneb ubikvitiini molekulidest. Sellele saidile kinnitunud ubikvitiinahela järgi tunneb valgu ära proteosoom. Teine osa degronist on mittestruktuurne järjestus, millest algab valgu degradeerimine (Prakash *et al.*, 2004). Enamasti on mõlemad degroni osad ühes valgu molekulis, kuid võimalik on ka olukord, kus üks osa degronist on ühes polüpeptiidi ahelas ja teine teises. Sel juhul seonduvad kaks osa omavahel polüpeptiidahelate vahelise kompleksi moodustamise jooksul (Schrader, 2009).

Degron mängib olulist rolli valkude lagundamise juures. Kui tihtipeale piisab valkude lagundamise suunamiseks ubikvitineerimisest, siis tugevalt voltunud valkude puhul selline seaduspärasus ei kehti ning valke sellegi poolest ei lagundata. On leitud, et kui valkudes on mittestruktureeritud järjestus kindlal kaugusel ubikvitineerimissaidist, toimub valgu degradeerimine suurema tõenäosusega. Et leida valgu lagundamiseks optimaalseid degroneid, on tehtud mitmeid katseid ning leitud põhjuseid, miks mõni degron ei suuda valku lagundada. Valgu lagundamine võib olla häiritud, kui

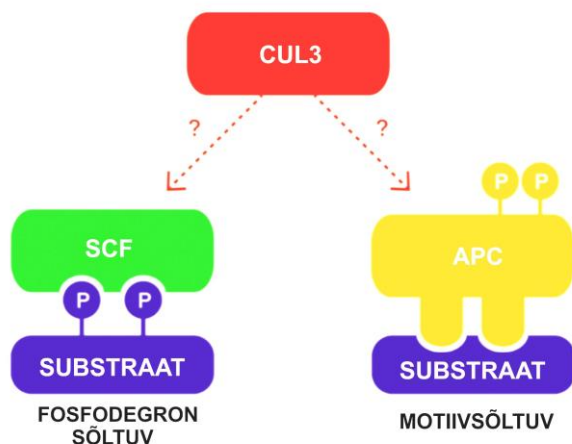
- 1) mittestruktuurne ala on liiga lühike ja seetõttu seondumine proteaasiga nõrk (Thrower *et al.*, 2000)

- 2) leidub liiga vähe degradatsiooni initsiatsioonialasid (Petroski ja Deshaies, 2003).
- 3) proteaasi seondumissaidi ja degradatsiooni initsiatsioonisaite vaheline füüsiline kaugus on liiga suur või jääb initsiatsioonisaite proteaasi seondumissaidi ulatusest välja ja seetõttu toimub valgu lagundamine aeglaselt (Orlicky *et al.*, 2003).
- 4) initsiatsioonisaite on väga pikk. Sel juhul võib oleneda valgu lagundamine seondumiskohast. Näiteks Sic1 puhul on võimalik ubikvitineerida 20 lüsiini jääki, kuid ainult ubivitineerimine N-terminaalse osa läheduses viib valgu kiirelt lagundamisse (Petroski ja Deshaies, 2003)
- 5) proteaasi aktiivsaadile sobivaid aminohappeid on puudu. Juhul kui aminohappeline järjestus pole proteaasile sobiv, siis valku ei lagundata (Prakash *et al.*, 2004).

On leitud paljusid erinevaid degroneid nagu näiteks fosfodegronid, hapnikust sõltuvad degronid, degronid olulistest valkudest (nagu näiteks p53). Loodud on ka sünteetilisi degroneid, et optimeerida degronite tööd ning leida võimalusi väga kiireks valkude lagundamiseks (Melvin *et al.*, 2013).

1.7 Valkude lagundamine fosfodegronite abil

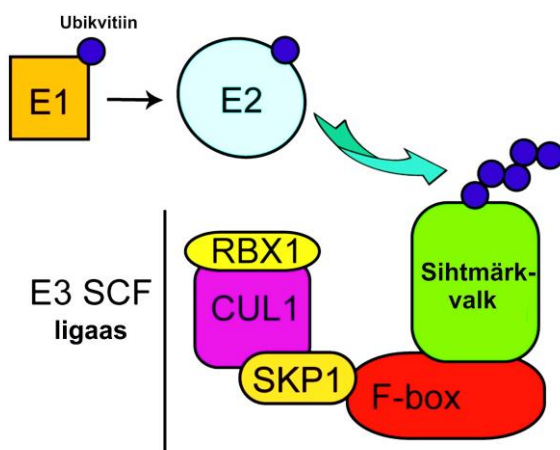
Sünteetiliste signaaliradade loomiseks kasutatakse tihtipeale fosfodegroneid, kuna neid on võimalik kergesti erinevates kontekstides kasutada ja ühtlasi on nende kasutamine andnud tulemusi valkude kiire lagundamise osas. Fosfodegronid on degronite alamliik, mis sisaldavad fosforülatsioonisaite (Lyons *et al.*, 2013).



Joonis 3. Fosfodegroni ja motiiv-spetsiifilise degroni erinevus. Fosfodegroni puhul fosforüleeritakse esmalt degroni fosforülatsioonisaite, mille järgi tuntakse valk ära. Motiivsõltuva degroni tunneb ära spetsiifiline valk, mis ise on fosforüleeritud. Joonis muudetud kujul (Metzger *et al.*, 2013).

Fosfodegronite peamine omapära on, et lagundamisele määratud valk tuvastatakse fosforüleeritud järjestuse motiivide järgi ning märgitakse seejärel ubikvitiini molekulidega

(joonis 3) (Petroski ja Deshaies, 2003). Fosfodegronite ning fosforülatsioonisaitide arv valgus võib varieeruda üsna palju. Näiteks Sic1 peab olema fosforüleeritud vähemalt kuues saidis, et seonduda Cdc4-ga, mis aitab Sic1 ubikvitineerida (Orlicky *et al.*, 2003), aga näiteks Cdc4 seondub Cdc6 fosfodegroniga, kui fosforüleerimissaitide vahel on 2-3 aminohapet (Al-zain *et al.*, 2015)



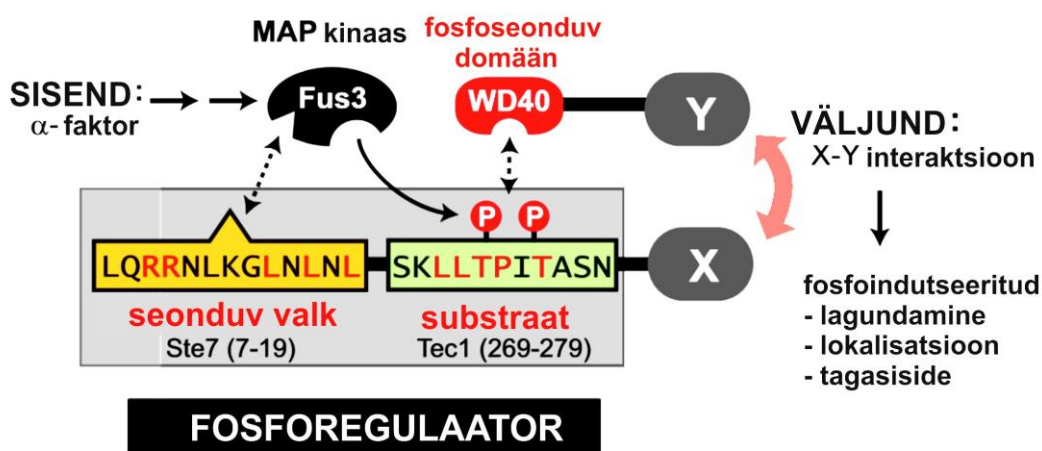
Joonis 4. SCF kompleks. SCF (Skp1-Cullin-F-box) kompleks tunneb oma substraate ära enamasti fosforüleeritud alade järgi. F-box valk seondub sihtmärk valguga ning kompleks toimetab valgu lagundamise. Joonis (Price ja Abu Kwaik, 2010).

Fosfodegronid teevad enamasti koostööd SCF kompleksiga (joonis 4). SCF (Skp1-Cullin-F-box) ubikvitiini ligaaside ehk E3 perekond on konserveerunud pärmist inimeseni. SCF kompleks tunneb substraate ära valk-valk interaktsioonide kaudu WD40 domäänis või leutsiinirikka järjestusega LLR domäänis. Enamik SCF kompleksi substraatvalke peavad olema fosforüleeritud, et seonduda SCF aktiivsaidiga F-box valgus. F-box valk tunneb substraatvalgus ära fosfodegroneid. Fosforülatsiooni kasutatakse mitmete rakutsükli poolt reguleeritavate valkude aktiivsuse määramiseks. Näiteks eemaldatakse rakust vastavalt rakutsükli etapile fosforüleeritud CDK inhibiitorid ning fosforüleeritud G1 tsükliinid. SCF kompleks transpordib lagundamise CDK inhibiitorid Far1 ja Sic1 ning ka replikatsioonivalgu Cdc6 (Tang *et al.*, 2005)

Fosfodegronid on paljulubavad erinevates kontekstides kasutamiseks, seetõttu uuritakse neid üsna aktiivselt. Näiteks Tec1 fosfodegroni fosforüleerib MAP kinaas Fus3. Tec1 on transkriptsioonifaktor pärmi filamendi tekkimise rajas ning Tec1 valgu lagundamisega hoitakse ära filamendi moodustamise geenide aktivatsioon paardumise feromoonisignaali ajal. On leitud, et feromooni doos ja kestvus reguleerivad Tec1 valgu lagundamise intensiivsust.

Feromoon-sõltuv Fus3 aktivatsioon fosforüleerib ja saadab lagundamisse valgu Tec1 (Chou *et al.*, 2008), (Bao *et al.*, 2004).

Sobivaid fosfodegroneid valkude Cdc4 ja Fbw7 jaoks on uuritud samuti põhjalikult, kuna nende substraatvalgud on olulised rakutsükli regulaatorid ning fosforüleerivad ka mitmeid raku jagunemisega ning tumorigeneesiga seotud valke. Uuringutest selgus, et Cdc4 tunneb ära valke konsensussaidiga I/L/P-I/L-pS/pT-P-{}RKY}, kus {} märgib mitesobivaid aminohappeid, millel fosfoseriinile ja fosfotreoniinile järgneb proliin ja hüdrofoobsete aminohappejääkide järjestus. Üks Cdc4 tõenäoline substraat on Eco1, tuntud ka kui Ctf7. SCF kompleks aitab reguleerida tütarchromatiidide kohesiooni S-faasis Eco1 abil. Eco1 atsetüleerib kohesiini Smc3 subühiku, et suunata see lagundamisse ning võimaldada tütarchromatiidide lahkumise. Selleks, et reguleerida Eco1 hulka rakus fosforüleerib Cdk1 Eco1 fosfodegroni ja Eco1 lagundatakse. Nii hoitakse rakus ära kohesioon peale S-faasi. Eco1 lagundatakse vaid juhul, kui Eco1 fosfodegronis on fosforüleeritud treoniin Thr94 ja seriinid Ser98, Ser99, sealjuures on olulised ka fosfosaitide vahelised kaugused. Eco1 konsensusmotiiv arvatakse olevat pS/pT-x-x-x-pS/pT, kus x on tavaliselt proliin (Lyons *et al.*, 2013).



Joonis 5. Fosforegulaator. Sünteetiline fosfodegron, kuhu on loodud MAPK seondumisala, MAPK fosforüleerimisala mis on samal ajal ära tuntav fosfoseonduvale domäänile. Erinevad fosforegulaatori osad on võetud erinevatest valkudest ning punasega on märgitud funktsionaalselt olulised aminohappejäägid. Joonis (Gordley *et al.*, 2016).

Fosforegulaatorid on erinevate radade disainimiseks mugavad, kuna nad on kergesti kohandatavad. Näiteks kasutati sünteetilise fosforegulaatori (joonis 5) loomiseks regiooni Tec1 valgust, mida fosforüleeritakse Fus3 poolt ning millega seondub valgu Cdc4 domään WD40. Regulaatorisse disainiti MAPK seondumis- ja fosforülatsiooniala. Selleks, et regulaatorit oleks võimalik erinevates kontekstides kasutada, lisati fosforülatsiooniala otsa

sobiv järjestus. Näiteks lüsiinide järjestusest koosnev saba, kuhu on võimalik ubikvitiinidel seonduda, lisati juhul, kui sooviti valgu lagudada. Sama fosforegulaatorit kasutati ka teises kontekstis, kus sellele lisati tuumalokalisatsiooni järjestus (NLS), mis MAPK stimulatsiooni korral vabastaks NLS valgu küljes asunud fluorosentsvalgu GFP tsütoplasmasse (Gordley *et al.*, 2016).

1.9 Sünteetilise bioloogia rakendused

Signaaliradade ning degronite uuringud on andnud ideid ja teadmisi, kuidas looduses esinevaid mehhanisme kasutada sarnaselt elektroonikale. Seniste bioloogia uurimisdistsipliinide kõrvale on tekkinud sünteetilise bioloogia uurimissuund, kus püütakse rakke programmeerida soovitud suunas. Sobiva funktsiooniga rakkude disainimiseks kasutatakse bioloogilisi ehituskive ehk eelnevalt uuritud rakulisi mooduleid, mida on võimalik ümber tõsta ja erinevates kontekstides kasutada. Selleks, et leida rakkude keerulisest toimimissüsteemist mooduleid, mida on võimalik kasutada ilma nende funktsiooni kaotamata, kasutatakse matemaatilisi mudeleid ning algoritme, mis võimaldavad geneetilisest koodist leida sobivaid struktureid mooduleid. Leitud mooduleid katsetatakse erinevate meetodite abil, et leida nende olulisus rakkude reguleerimismehhanismides (Kiel *et al.*, 2010).

Juba aastatuhandeid on pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae*'t kasutatud pagari- ja alkoholitööstuses. Ka teaduses on *S. cerevisiae* olnud oluline mudelorganism ning tema toimimismehhanisme on põhjalikult uuritud. Seetõttu on *S. cerevisiae* suurepäraseks organismiks, mida kasutada ka sünteetilise bioloogia vallas. Seniste teadmiste põhjal leitakse, et *S. cerevisiae* on paljulubav organism, mida saaks kasutada ka tänapäevase tootmise arendamise juures. Ümberprogrammeeritud pärmirakkude abil võiks olla võimalik toota biokütust, ravimeid või väärtuslikke kemikaale. Pärmirakud annaksid võimaluse arendada ka biosensoreid ning bioloogilisi arvutusmehhanisme või bioloogilisi "arvuteid" (Manzoni *et al.*, 2016). Seni on põhiliseks takistuseks sünteetilise bioloogia arengus olnud vähene kirjeldatud geneetiliste elementide hulk. Mitmekesise andmebaasi korral on võimalik inseneriteaduste eeskujul komplekteerida keerulisi süsteeme ning seejärel neid *in vivo* katsetada (Blount *et al.*, 2012).

Kui praegu kasutatakse sünteetilises bioloogias mudelorganismidena peamiselt *E. coli*'t ja *S. cerevisiae*'t, siis lähiajal loodetakse sünteetilise bioloogia printsiipe kasutada ka imetajarakkudes. Soodustatud on katsemehhanism, kus alustatakse soovitud tulemuse planeerimist *in silico*, seejärel tehakse katsed lihtsamate mudelorganismide peal ning soovitud

tulemuse korral sobitatakse sünteetilised konstruktid imetajarakkudesse (Nevozhay *et al.*, 2013). Sellise lähenemise korral on võimalik kokku hoida aja- ja rahakulu ning kasutada teadusraha kvaliteetsemaks teadustööks.

Raku elutegevust on võimalik mõjutada peamiselt signaaliradade kaudu. Kuna signaalirajad on keerukad süsteemid on sünteetiliste signaaliradade konstrueerimise esimene eesmärk saada aru, kuidas looduslikud signaaliradade süsteemid toimivad. Seejärel mõistetakse ka, kuidas ehitada sünteetilisi süsteeme, millel on kindlad funktsioonid või kasutusvõimalused. Uute süsteemide loomise käigus on katsetatud transkriptsiooni tasandil reguleerimissüsteemide disainimist ja valkude tasandil signaaliradade disainimist. Viimaste uurimuste käigus on hakatud eelistama signaaliradade kaudu rakkude mõjutamist. Kuigi valgu tasandil uute süsteemide loomine on keerulisem kui DNAsse muutuste viimine, on signaaliradade regulatsioon kiire ning annab võimaluse soovitud tulemust näha juba minutite või sekunditega, samas kui transkriptsiooni tasandil muutuste nägemiseks võib kuluda tunde (Kiel *et al.*, 2010). Põhiliseks põhjuseks, miks signaaliradu reguleerida valgu tasandil on soov aktiveerida ja deaktiveerida signaaliraja komponente väga lühikese ajavahemiku sees. Kõik eelnevalt kirjeldatud põhjused teevad signaalirajad oluliseks objektiks, mida uurida ning mõista (Gordley *et al.*, 2016).

Lisaks meditsiinile ning kemikaalitööstusele on sünteetilise bioloogia viljelejal sihiks biomolekulidel põhinevate arvutite loomine. Tavaliselt on arvutisarnaste süsteemide alusmooduliteks aritmeetiline loogikasüsteem, kontrollsüsteem, mälu keskus ning sissetuleva ja väljamineva signaali töötlemine. Et sellist süsteemi saavutada ka bioarvutites, on vajalik arendada Boolean funktsioonide põhimõttel toimivad biomolekulaarsed loogikaväravad (Manzoni *et al.*, 2016). Biomolekulaarsete loogikavärvate loomisel on üheks võimaluseks kasutada uuritud degroneid ning geenielemente ning neid erinevates kombinatsioonides kokku seada. Sellised loogikaväravad võiksid olla ehitusblokid sünteetilistele signaaliradadele, mis omavahelistes keerukates kuid reguleeritavates kooslusteks võiksid kokku luua bioarvuti. Siiani on katsetatud nukleiinhapete ja valkude põhiseid arvutuslikke mehhanisme ja lülitusi, mis on soovitud tulemusi juba andnud (Takafumi Miyamoto, 2013).

Nagu elektrooniliste loogikavärvate puhul, kasutatakse ka bioloogiliste loogikavärvate lugemiseks binaarset süsteemi, kus biomolekulide koguse või aktiivsuse järgi saab määrata lülitusi kõrge ja madala vahel. Binaarses süsteemis märgib kõrget number 1 ja madalat 0. Loogikavärv saab sisendina sisse binaarse teabe ning väljastab sisendsignaalile vastava

informatsiooni. Enamasti kasutatakse binaarse teabe lugemiseks t etabeleid (Manzoni *et al.*, 2016).

Selleks, et luua täielikult tehislikke eluss steeme, mis suudavad reageerida keskkonnale, kohaneda ning paljuneda, peame me põhjalikult mõistma raku toimimismehhanisme. Hetkel oleme me rakkude täielikust mõistmisest veel kaugel. S steemibioloogia on teinud lühikese aja jooksul palju edusamme uurides keskseid süsteeme näiteks tagasisides steemi ja müra rakus (Swinburne *et al.*, 2008). Sünteetiline bioloogia on kogutud teabe põhjal proovinud arendada looduses mitteesinevaid süsteeme ja elementide kooslusi (Manzoni *et al.*, 2016). Uute uuringute järel saab üha enam selgemaks, kui keeruline on rakusisene juhimiss steem. Sellegi poolest annab iga teadustulemus uut informatsiooni ning muudab rakkude soovikohase juhtimise arendamise võimalikuks.

2. Eksperimentaalosa

2.1 Töö praktilise osa eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks oli:

1. Töögrupi eelnevatele tulemustele tuginedes disainida sünteetilised fosfosõltuvad valkude degradatsiooni eest vastutavad järjestused ehk fosfodegronid
2. Luua sobiv katseskeem, et fosfodegroneid *in vivo* testida
3. Puhastada need fosfodegronid GST liitvalguna ja testida nende fosforüleerimist MAP kinaasi (Fus3) poolt *in vitro*

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid, tüved ja söötmed

EGFP kodeeriv järjestus saadi plasmiidilt pYM27 (P30239) (Euroscarf kogu).

Fosfodegronite ja EGFP liitvalkude ekspressiooniks pärmirakkudes kasutati Met25 promooterit sisaldavat pRS416 plasmidi (Mumberg *et al.*, 1994).

GST-märgistatud fosfodegronite bakteris ekspresseerimisel kasutati bakteriaalset ekspressioonivektorit pGEX-4T-1 (GE Healthcare).

Kloneerimistel ja plasmiidide paljundamisel kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α [supE44, Δ lacU169(Φ lacZ Δ M15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1] (Invitrogen), mille kompetentsed rakud olid valmistatud laborant Jevgeni Mihhejev'i poolt.

GST-märgistatud fosfodegronite ekspressiooniks ja puhastamiseks kasutati *E. coli* tüve BL21-CodonPlus(DE3)-RP [*E. coli* B, F-, ompT, hsdS(rB-,mB-), dcm+, Tetr, gal, λ (DE3), endA, Hte, (argU proLCamr)] (Stratagene), mille kompetentsed rakud olid valmistatud Jevgeni Mihhejev'i poolt.

In vivo katseteks kasutati *Saccharomyces cerevisiae* tüve DK252 (ura3-1, trp1-1, ade2-1, leu2-3,112, his3-11, can1-100, ura3::gal cln3, Δ cln1::HIS3, Δ cln2::LEU2, met14, arg5) (Egelhofer *et al.*, 2008).

Bakterirakkude kasvatamiseks kasutati Luria Bertani (LB) vedelsöödet [10g/l trüptooni (BD), 5g/l pärmiekstrakti (Formedium), 10g/l NaCl] või LB tardsöödet [10g/l trüptooni (BD), 5g/l pärmiekstrakti (Formedium), 10g/l NaCl, 1,5% agar (Formedium)].

Pärmirakkude kasvatamiseks kasutati defineeritud koostisega sünteetilisi söötmeid, mis pärinesid firmast Formedium.

2.2.2 Töös kasutatud sünteetilised DNA-d ja praimerid

Fosfodegroneid kodeerivad nukleotiidsed järjestused (tabel 1) telliti sünteetiliste DNA juppidega (*GeneArt Strings DNA Fragments*) firmast Thermo Fisher Scientific.

Tabel 1. Töös kasutatud sünteetilised DNA järjestused

| | |
|------------------|--|
| sntNES-Degron I | Tuuma ekspordi signaaliga fosfodegron I |
| sntNES-Degron II | Tuuma ekspordi signaaliga fosfodegron II |
| sntNLS-Degron I | Tuuma impordi signaaliga fosfodegron I |
| sntNLS-Degron II | Tuuma impordi signaaliga fosfodegron II |

Töös kasutatud praimerid (tabel 2) telliti firmast Microsynth.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid. Lühendiga F on märgitud ülesvoolu praimer ning lühendiga R allavoolu praimer.

| Praimeri nimetus | Praimeri järjestus (5'-3' suunas) |
|------------------|--|
| sntNES-Deg-F | ACCCCGGATTCTAGAATGAACG |
| sntNLS-Deg-F | ACCCCGGATTCTAGAATGCC |
| sntDeg+EGFP_R | TCATTGCTCCAGCACCAGCACCAGCACCTGCTCCGTCGACCCCGCTGTTTTCT TCAACTC |
| sntDeg+EGFP_F | TCCCCAGTTTTCTCCCCAGGAGTTGAAGAAAACAGCGGGGGTTCGACGGAGCAG GTGCTG |
| mCherry-to-pRS-R | ATTACATGACTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG |
| NES_Deg_pGex_F | GAGATATAGTCGACTCATGAACGAATTGGCTTTGAAGTTG |
| NLS_Deg_pGEX_F | GAGATATAGTCGACTCATGCCACCAAAAAAAAAAAGAAAAGTTC |
| Deg_pGEX_R | CGTACGTATAGCGGCCGCTTACCCCGCTGTTTTCTTCAACTC |

2.2.3 Fosfodegronite ja EGFP liitvalkude klonimine pRS416 plasmidi

Fosfodegroni ja EGFP liitvalku kodeeriv nukleotiidne järjestus konstrueeriti 2-etapilise polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) käigus. Esimeses etapis amplifitseeriti sünteetiliselt

kaheaheelaliselt DNA jupilt (*GeneArt Strings DNA Fragments*) fosfodegrom ja plasmiidilt pYM27 amplifitseeriti EGFP kodeeriv järjestus. Fosfodegromite tarvis kasutati praimeripaare sntNLS-Deg-F ja sntDeg+EGFP_R ning sntNES-Deg-F ja sntDeg+EGFP_R. EGFP jaoks kasutati primereid sntDeg+EGFP_F ja mCherry-to-pRS-R. Oligotega lisati fosfodegromite 5' otsa restriктаasi lõikekoht ja 3' otsa järjestus, mis oli vajalik järgmiseks PCR etapiks. EGFP-le lisati 5' otsa järgmiseks PCR etapiks vajalik nukleotiidne järjestus ja 3' otsa restriктаasi lõikekoht.

PCR segu koostis oli järgmine: 1x HF puhver (Thermo Scientific), 10 ng sünteetilist DNAd, 0,5 µM pärisuunaline praimer, 0,5 µM vastassuunaline praimer, 250 µM dNTPde segu (Thermo Scientific), 1 U Phusion DNA polümeraasi (Thermo Scientific), mQ vesi kuni 50 µl. Reaktsioonid viidi läbi *Aeris Esco Thermal Cycler* termotsükleriga tabelis 3 toodud programmide järgi.

Tabel 3. Degromite ja EGFP amplifitseerimiseks kasutatud PCR programmid

| Etapp | Degromid | EGFP |
|-------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1. | 98 °C - 5 min | 98 °C - 5 min |
| 2. | 98 °C - 20 s | 98 °C - 20 s |
| 3. | 55 °C - 20 s | 55 °C - 20 s |
| 4. | 72 °C - 11 s | 72 °C - 23 s |
| 5. | 72 °C - 5 min | 72 °C - 5 min |
| | Etappe 2-4 tehti 30 kordust | Etappe 2-4 tehti 30 kordust |

PCR segule lisati 6x *Orange Loading Dye* (Thermo Scientific) foresivärvi 1x lõppkonsentratsioonini ning produktid lahutati 1% agarosgeelis elektroforeesil 1x TAE puhvris. Elektroforeesgeelil lahutatud PCR produktide tuvastamiseks vaadeldi geeli UV valguses lainepikkuse 254 nm juures, et teha kindlaks soovitud produkti olemasolu DNAGA seondunud etiidiumpromiidi järgi. Sobiva pikkusega PCR produkt lõigati geelist välja ja puhastati kasutades FavorPrep™ *Gel/PCR Purification Mini Kit* (Favorgen Biotech Corp.) vastavalt tootja juhistele.

Teises etapis liideti eelnevalt kirjeldatud amplifitseeritud degromi ja EGFP järjestused. NLS_Degrom I ja NLS_Degrom II ühendamiseks EGFPga kasutati primereid sntNLS-Deg-F ja mCherry-to-pRS-R. NES_Degrom I ja NES_Degrom II ühendamiseks EGFPga kasutati primereid sntNES-Deg-F ja mCherry-to-pRS-R.

PCR segu koostis oli järgmine: 1x HF puhver (Thermo Scientific), 1:1 suhtes degroni ja EGFP 1. etapi PCR, 250 μ M dNTPde segu, 1 U Phusion DNA polümeraasi (Thermo Scientific), mQ vesi kuni 47,5 μ l. 2,5 μ l pärisuunalise ja vastassuunalise praimeride segu (lõppkontsentratsioon 0,5 μ M kumbagi) lisati reaktsiooni peale I sünteesi etappi. PCR programm on toodud tabelis 4. PCR reaktsioon viidi läbi *Aeris Esco Thermal Cycler* termotsükleriga.

Tabel 4. Degronite ja EGFP liitmiseks kasutatud PCR programm

| Etapp | |
|-------|-----------------------------|
| 1. | 98 °C - 5 min |
| 2. | 55 °C - 20 s |
| 3. | 72 °C - 1 min |
| 4. | 98 °C - 20 s |
| 5. | 55 °C - 20 s |
| 6. | 72 °C - 34 s |
| 7. | 72 °C - 5 min |
| | Etappe 4-6 tehti 30 kordust |

PCRi produktid lahutati geelelektroforeesil ning puhastati geelist eelpool kirjeldatud viisil.

Fosfodegron-EGFP konstruktsioonide viimiseks ekspresseerimiseks loigati Met25 promotorit sisaldavat pRS416 vektorit ja PCRi produkte Thermo Scientific *FastDigest* restriktasididega XbaI ja XhoI. PCR produktide restriktasioonisegu oli järgmine: 40 μ l geelist puhastatud PCR produkti, 5 μ l 10x *FastDigest* puhvrit, 1 μ l ensüümi XbaI ja 1 μ l ensüümi XhoI ja 3 μ l mQ vett. Vektorit loigati 20 μ l restriktasiooniseguga: 1 μ g vektorit, 2 μ l 10x *FastDigest* puhvrit, 1 μ l ensüümi XhoI, 1 μ l ensüümi XbaI, 1 U *FastAP Thermosensitive Alkaline* fosfataasi (Thermo Scientific) ning mQ vett kuni 20 μ l. Restriktasioonireaktsioonid viidi läbi 37 °C juures 60 minuti jooksul. Seejärel lisati proovidele 6x *Orange Loading Dye* foreesivärvi 1x lõppkontsentratsioonini. Restriktasioonifragmendid lahutati ja puhastati 1% agarosgeelist nagu eelpool kirjeldati.

Restriktasioonifragmentide ligeerimiseks valmistati järgnevalt ligeerimisseguga mahus 20 μ l: 1 μ l eelnevalt loigatud vektorit, 4 μ l restriktasididega töödeldud PCR produkti, 2 μ l 10x T4

ligaasipuhvrit (Thermo Scientific), 5 U T4 DNA ligaasi (Thermo Scientific) ja 12 mQ vett. Ligatsioonireaktsioonid viidi läbi üle öö (12 tundi) 18 °C juures.

2.2.4 Fosfodegronite kloneerimine pGEX-4T-1 vektorisse

Esmalt fosfodegronid amplifitseeriti PCR-ga sünteetiliselt kaheahelaliselt DNA jupilt (*GeneArt Strings DNA Fragments*). NLS_Degron I ja NLS_Degron II amplifitseeriti praimeritega NLS_Deg_pGEX_F ja Deg_pGEX_R ning NES_Degron I ja NES_Degron II praimeritega NES_Deg_pGEX_F ja Deg_pGEX_R. Praimeritega viidi fosfodegronite 5' ja 3' otstesse kloneerimiseks vajalikud restriктаaside lõikekohad, vastavalt SalI ja NotI. PCR segu koostis oli järgmine: 1x HF puhver (Thermo Scientific), 10 ng sünteetilist DNAd, 0,5 µM pärisuunaline praimer, 0,5 µM vastassuunaline praimer, 250 µM dNTPde segu, 1 U Phusion DNA polümeraasi (Thermo Scientific), mQ vesi kuni 50 µl. Reaktsioonid viidi läbi *Aeris Esco Thermal Cycler* termotsükleriga tabelis 5 toodud programmi järgi.

Tabel 5. Fosfodegronite amplifitseerimise PCR programm

| Etapp | |
|-------|-----------------------------|
| 1. | 98 °C - 5 min |
| 2 | 98 °C - 20 s |
| 3. | 55 °C - 20 s |
| 4. | 72 °C - 12 s |
| 5 | 72 °C - 5 min |
| | Etappe 2-4 tehti 30 kordust |

PCRi produktid lahutati geelelektrofooresil ning puhastati geelist eelpool kirjeldatud viisil.

Fosfodegronite viimiseks bakteriaalsesse ekspressioonivektorisse pGEX-4T-1 lõigati vektorit ja PCRi produkte Thermo Scientific *FastDigest* restriктаasidega SalI ja NotI. PCR produktide restriksioonisegu oli järgmine: 40 µl geelist puhastatud PCR produkti, 5 µl 10x *FastDigest* puhvrit, 1 µl ensüümi SalI ja 1 µl ensüümi NotI ja 3 µl mQ vett. Vektorit lõigati 20 µl restriksioonisegus: 1 µg vektorit, 2 µl 10x *FastDigest* puhvrit, 1 µl ensüümi SalI, 1 µl ensüümi NotI, 1 U *FastAP Thermosensitive Alkaline* fosfataasi (Thermo Scientific) ning mQ vett kuni 20 µl. Restriksioonireaktsioonid viidi läbi 37 °C juures 60 minuti jooksul. Seejärel

lisati proovidele 6x *Orange Loading Dye* foreesivärvi 1x lõppkonsentratsioonini. Restriktsioonifragmendid lahutati ja puhastati 1% agarosgeelist nagu eelpool kirjeldati. Fosfodegronite ligeerimiseks vektorisse valmistati järgnev ligeerimissegu mahus 20 µl: 1 µl eelnevalt lõigatud vektorit, 7 µl restriktaasidega töödeldud PCR produkti, 2 µl 10x T4 ligaasipuhvrit (Thermo Scientific), 5 U T4 DNA ligaasi (Thermo Scientific) ja 9 mQ vett. Ligatsioonireaktsioonid viidi läbi üle öö (12 tundi) 18 °C juures.

2.2.5 Fosfodegronite EGFP ja GST liitvalke kodeerivate plasmiidide transformeerimine *E. coli* DH5α tüvesse

Punktis 2.2.3 ja 2.2.4 kirjeldatud ligatsioonisegud transformeeriti *E. coli* DH5α tüvesse. Transformatsiooni läbiviimiseks lisati 2 µl ligatsioonisegule 50 µl DH5α kompetentseid rakke. Saadud segu inkubeeriti jääl 30 minutit, seejärel hoiti segu 2 minutit 42 °C juures ning tõsteti koheselt jääle 1 minutiks. Segule lisati 400 µl LB söödet ning inkubeeriti 60 minutit 37 °C juures loksutil. Peale inkubatsiooni tsentrifugeeriti rakukultuuri 2 minuti jooksul 6000 pööret/ minutis, eemaldati 300 µl supernatanti ning allesjäänud 100 µl supernatandis rakusade suspendeeriti ja külvati selektiivsetele LB agariga (sisaldasid 100 µl/ml ampitsilliini) Petri tassidele klaaskuulikeste abil. Tasse inkubeeriti 37 °C juures kolooniate tekkimiseni.

2.2.6 Plasmiidide puhastamine *E. coli* DH5α tüvest

Plasmiidse DNA eraldamiseks kasvatati transformatsioonil saadud bakterikolooniaid 5 ml LB vedelsöötme [sisaldas 100 µg/ml ampitsilliini (AppliChem)] 37°C juures loksutil 12 tundi. Plasmiidne DNA eraldati *FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit*'ga vastavalt tootjapoolsetele juhistele. Saadud plasmiidse DNA kontsentratsioonid mõõdeti *NanoDrop* spektrofotomeetriga (Thermo Scientific) ning plasmiidide õigsust kontrolliti Sangeri sekveneerimise teel (EBK DNA sekveneerimise tuumiklaboris).

2.2.7 Fosfodegroni ja EGFP liitvalku kodeerivate plasmiidide transformatsioon pärmütüvesse DK252

Fosfodegroni ja EGFP liitvalku ekspresseerivad plasmiidid transformeeriti *S. cerevisiae* tüvesse DK252. Selleks kasvatati DK252 rakke 50 ml YP söötmes 2% rafinoosi ja 2% galaktoosi juuresolekul kuni optilise tiheduseni OD₆₀₀ 0,6. Pärmirakud koguti vedelsöötimest tsentrifugeerides (1 minut 3500 pööret/minutis) ning rakke pesti 1 ml puhvris A [5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 mM EDTA, 100 mM liitiumatsetaat] ning koguti uuesti tsentrifugeerides 1 minut 3500 pööret/minutis. Supernatant eemaldati ja rakusade lahustati kahekordses sademe

mahus puhvris A ning segu inkubeeriti toatemperatuuril 10 minutit (kompetentsete rakkude saamiseks). Samal ajal valmistati ette *Salmon Sperm* DNA (Sigma) (10 mg/ml) kuumutades seda 10 minutit 100 °C juures ja jahutates koheselt jääle. Transformatsiooniks segati kokku 10 ng plasmiidset DNAd ja 10 µl *Salmon Sperm* DNA, millele lisati 100 µl kompetentseid pärmirakke, 700 µl puhvrit B [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 40% polüetüleenglükool (PEG) keskmise molaarmassiga 3350 g/mol, 100 mM liitiumatsetaat] ja 48 µl dimetüülsulfoksiidi (DMSO) ning saadud transformatsioonisegu inkubeeriti 40 minutit 42 °C juures. Peale inkubatsiooni hoiti segu 2 minutit jääle ning tsentrifuugiti 30 sekundit 6000 pöört/minutis. Supernatant eemaldati ja rakud suspendeeriti 1 ml 1x TE puhvris [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA] ning segu tsentrifuugiti 1 minut 3500 pöört/minutis. Supernatant eemaldati ja rakud suspendeeriti 200 µl 1x TE puhvris ning külvasi klaaskuulide abil CSM –URA tardsöötmele, millesse oli lisatud 2% rafinoosi ja 2% galaktoosi. Tasse hoiti 30 °C inkubaatoris kuni kolooniate tekkimiseni.

2.2.8 GST-märgisega fosfodegronite puhastamine bakterist

N-terminaalse GST-märgisega fosfodegronite puhastamiseks *E. coli* BL21 DE RP tüvest kasvatati ekspressiooniplasmidi sisaldavaid rakke 12 tundi 5 ml LB söötmes, millesse oli lisatud 100 µg/ml ampitsilliini (AppliChem) ja 50 µg/ml klooramfenikooli (Sigma). Seejärel lahjendati 100 µl rakukultuuri edasi 100 ml LB söötmesse (100 µg/ml ampitsilliini ja 50 µg/ml klooramfenikooli) ning kasvatati kuni optilise tiheduseni OD₆₀₀ 0,6, misjärel lisati kultuurile valguekspressiooni indutseerimiseks IPTG-d (isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiid) (Biosolve Chemicals) lõppkonsentratsioonis 1 mM. Kaks tundi hiljem rakud koguti tsentrifuugides rakukultuuri 10 minutit 4000 pöört/minutis 4 °C juures. Supernatant eemaldati ning rakkude sadet pesti 25 ml 1x PBS-is [137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄] ja tsentrifuugiti 10 minutit 4000 pöört/minutis 4 °C juures, peale mida 1x PBS eemaldati ja rakud külmutati vedelas lämmastikus ja hoiti kuni edasise kasutamiseni -80 °C juures. GST-märgisega valkude puhastamiseks rakkude sade sulatati jääle ning suspendeeriti 10 ml lüüsi puhvris [50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 300 mM NaCl, 1% Triton X-100 ja 5% glütserool], millesse olid lisatud proteaaside inhibiitorid [1 mM PMSF (Sigma), 1 µg/ml aprotiniin (Sigma), 1 µg/ml pepsatiin A (Sigma), Leupeptiin (Sigma), 1 kU DNAasi (Calbiochem)], 1 mg/ml lüsotsüümi (Sigma) ning 2 mM ditiotreitol (DTT) (AppliChem). Rakkude lüüsimiseks hoiti rakkude suspensiooni jääle 30 minutit, misjärel lüüsi sonikeeriti 3 x 30 sekundit 50% võimsuse juures *Bandelin Sonoplus HD 2070* ultraheligeneraatoriga jahutades lüüsi sonikeerimiste vahel 1 minut jääle. Lüüsi tsentrifuugiti 30 minutit 15000 pöört/minutis 4°C juures Sorval RC-5 tsentrifuugis SS-34

rootoriga. Samal ajal pipeteeriti 200 µl 50% *Gluthation Sepharose 4 Fast Flow* graanulite suspensiooni (GE Healthcare) *Bio-Spin* kromatograafiakolonnile (Bio-Rad) ning kolonne pesti 1 ml lüüsi puhvriga. Pestud graanulid suspendeeriti tsentrifuugimisel saadud supernatandis ning saadud segu inkubeeriti 1 tund *end-over-end* segajal 4°C juures. Seejärel kanti suspensioon kromatograafiakolonnile ning lüsaadil lasti läbi kolonni tilkuda. Järgnevalt pesti kolonni 10 ml pesupuhvriga A [50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 600 mM NaCl, 1% Triton X-100 ja 5% glütserool ning vahetult lisatud 1 mM DTT] ja 1 ml pesupuhvriga B [50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1% NP-40 ja 5% glütserool ning vahetult lisatud 1 mM DTT]. Valkude elueerimiseks kolonn suleti alt korgiga ja graanulid suspendeeriti 100 µl elueerimispuhvris [50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1% NP-40 ja 5% glütserool, 25 mM L-glutatioon ning vahetult lisatud 1 mM DTT) ning peale 5 minutit inkubatsiooni toatemperatuuril kork eemaldati ja eluaat koguti. Elueerimist tehti kokku 4 korda ning saadud fraktsioonid külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati kuni edasise kasutamiseni -80 °C juures.

Puhastamise edukust ja GST-märgisega fosfodegronite kogust hinnati *Coomassie brilliant blue* R-250 värvingul polüakrüülamiid geelist.

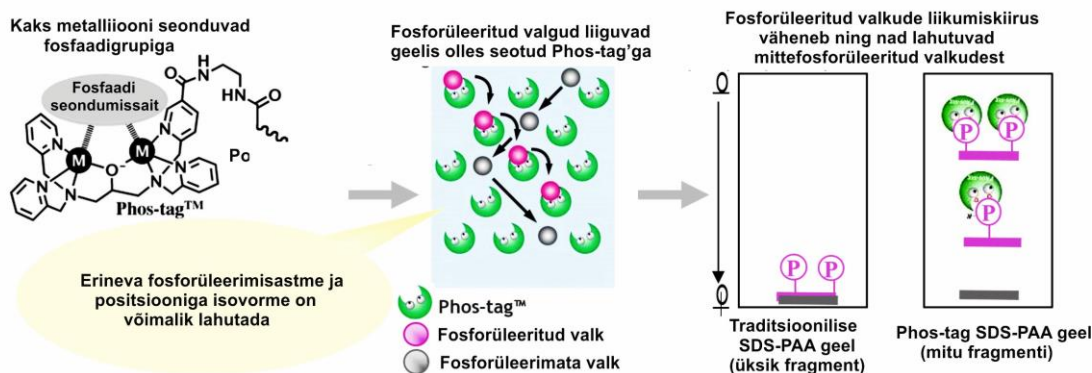
2.2.9 *In vitro* kinaasireaktsioonid

In vitro kinaasireaktsioonides kasutati GST-märgisega valke kui substrate kinaasidele: GST-Fus3 ja Clb5/Cdk1. Kontrollsubstraadiks kinaasidele oli histoon H1 (Merck Millipore). Kinaasid olid puhastatud labori teiste liikmete poolt.

Kinaasireaktsioonid viidi läbi reaktsioonisegus, mis sisaldas: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2mM MgCl₂, 500 µM ATP, 0,2 mg/ml BSA, 0,1 µCi/µl [γ -³²P] ATP. Substraatide kogused olid vastavalt: 5 µM GST-NLS-degron I, 3 µM GST-NLS-degron II, 5 µM GST-NES-degron I, 5 µM GST-NES-degron II ja 0,08 mg/ml histoon H1. Kinaaside kogused olid katsetes: 50 nM Fus3 ja 45 nM Clb5/Cdk1. Reaktsioonid viidi läbi toatemperatuuril 40 µl mahus ning need peatati ajapunktidel 8 ja 16 minutit segades 16 µl reaktsioonisegu 12 µl 3x Laemmli puhvris. Saadud segust pool kanti 10% polüakrüülamiidgeelile (PAA-geel)(10 x 8 cm) ja teine pool 10% *Phos-Tag* PAA-geelile [10 % PAA-geel, kuhu lisati valamisel 50 µM *acrylamid-pendant Phos-Tag*TM reagent (Wako-Chem) ja 100 µM MnCl₂].

Valkude lahutamine PAA-geelides toimus 1x foreesipuhvris (25mM Tris, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS), 1,5 tundi tavalises ja 3,5 tundi *Phos-Tag* geelis (*Phos-Tag* geeli põhimõte on toodud joonisel 6). Valkude visualiseerimiseks kasutati *Coomassie Brilliant Blue* R-250 värvingut. Peale värvimist geelid kuivatati ja asetati *Storage Phosphor Screen* (GE Helthcare)

kassettidesse 16 tunniks. Substraatvalkudesse kogunenud ^{32}P signaal detekteeriti *Typhoon Trio* skanneril (Amersham Biosciences) ning kvantifitseeriti programmiga *ImageQuant TL* (Amersham Biosciences).



Joonis 6. Phos-tag PAA-geel. Phos-tag SDS-PAA-geeli kasutatakse fosforüleeritud ja mittefosforüleeritud valkude eristamiseks ning valkude fosforüleerimisastme määramiseks. Phos-tag™ molekul seonduv Mn^{2+} abil fosfaatidele fosforüleeritud valkudel, tänu millele fosforüleeritud valkude liikumiskiirus geelis väheneb ning on võimalik tuvastada fosforüleeritud fosfaatide arvu valgus. Joonis muudetud kujul (http://www.wakochem.co.jp/english/labchem/product/life/Phos-tag/pdf/Phos-tag_E.pdf).

2.2.10 Fosfodegronite analüüsimine *in vivo*

In vivo tingimustes fosfodegronite analüüsimiseks kasutati *CellASIC® ONIX Microfluidic Platform*'i (Merck Millipore), mis annab võimaluse jälgida rakke neile loomulikule elukeskkonnale sarnastes tingimustes. *CellASIC®* poolt välja töötatud meetod võimaldab *in vivo* katse ajal vahetada rakkudel kindlaks määratud ajal söödet ning teha kindlaks määratud intervalli tagant kvaliteetseid mikroskoobipilte, mida on võimalik hiljem analüüsida. Mikroskoobiks oli Zeiss Axio Observer Z1. Mikrofluidika platformi ja mikroskoobiga töötamisel jälgiti tootjapoolseid juhiseid.

Selleks, et analüüsida fosfodegronite käitumist *in vivo* pärmirakus kasutati *CellASIC® ONIX Microfluidic Platform Y040 Microfluidic Plate for Haploid Yeast* mikrofluidikaplaati (Merck Millipore), mis võimaldab samal ajal rakke jälgida ja mõjustada 4 erinevas kambris.

Katses kasutatud pärmitüvesid kasvatati 12 tundi 5 ml CSM-URA söötmes koos 2% rafinoosi ja 2% galaktoosiga, kuni $\text{OD}_{600} = 0,3$, peale mida kultuuri sonikeeriti 10 sekundit 10% võimsuse juures *Bandelin Sonoplus HD 2070* ultraheligeneraatoriga ning rakud laeti mikrofluidika plaati seni kuni saavutati piisav hulk rakke mikroskoobi vaateväljas (5-10 raku). Nüüd vahetati CSM-URA + 2% rafinoos/2% galaktoos sööde CSM-URA + 2% glükoos söötmega vastu ja jätkati rakkude kasvatamist 30 minutit. Peale seda vahetati sööde

CSM-URA-MET + 2% glükoos vastu 30 minutiks ning peale seda vahetati uuesti sööde CSM-URA + 2% glükoos vastu, kuid sellel korral oli söötmesse lisatud ühel juhul 240 nM α -faktori (Storkbio) ja teisel juhul DMSO (Applichem) ning rakud jäid nendesse söötmetesse 240 minutiks. Alates rakkude laadimisest kuni katse lõpuni pildistati mikrofluidika plaadis olevad rakke nii faaskontrastis kui EGFP kanalis iga 3 minuti tagant.

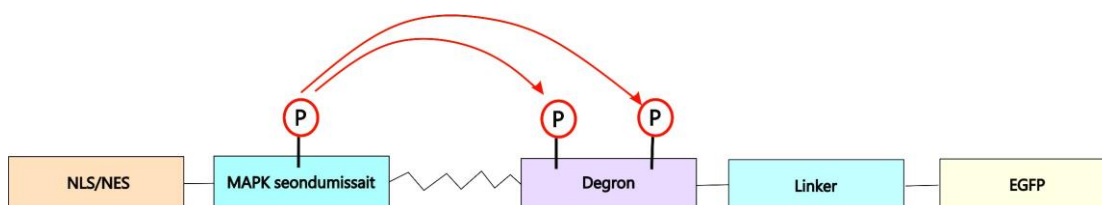
Eksperimendi käigus kogutud pildid analüüsiti programmiga MatLab (MathWorks) ja sellise analüüsi jaoks kirjutatud spetsiaalse alaprogrammi (Doncic ja Skotheim, 2013) abil.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Fosfodegronite disainimine

Bakalaureusetöö esimeseks eesmärgiks oli disainida katseskeem ja katsesüsteem, mis võimaldaks testida sünteetilisi fosfodegroneid *in vivo* pärmirakkudes. Selle raames tuli leida kinaas, mis oleks võimaline sünteetilist degronit fosforüleerima ja mida saaks vastavalt vajadusele sisse ja välja lülitada. Otsus langetati pärmi MAP kinaasi Fus3 kasuks, mida on võimalik α -faktori lisamisega sisse lülitada. Fus3 puhul kujunes probleemiks, et feromooni rada pärmis on aktiivne ainult G1 faasis. Hiljem fosforüleeritakse Fus3 aktivatsiooniks vajalik valk Ste5 ja sellega takistatakse Fus3 aktiveerumist. Sellest probleemist aitas üle saada kirjandusest leitud pärmitüvi DK252 (Egelhofer *et al.*, 2008), kus olid deleteeritud G1 faasi tsükliinid Cln1 ja Cln2 ning tsükliin Cln3 oli viidud GAL1 promooteri kontrolli alla. Kui GAL promootor on glükoosiga supresseeritud, siis rakud arestuvad G1 faasis ja rakutsükkel peatub. Kuid galaktoosiga söötmel kasvavad rakud kenasti. Järgnevalt tuli leida reporter, mille degradeerimist jälgida. Erinevaid juba publitseeritud degroneid kirjeldavaid artikleid lugedes jäi silma, et enamasti kasutatakse EGFPd.

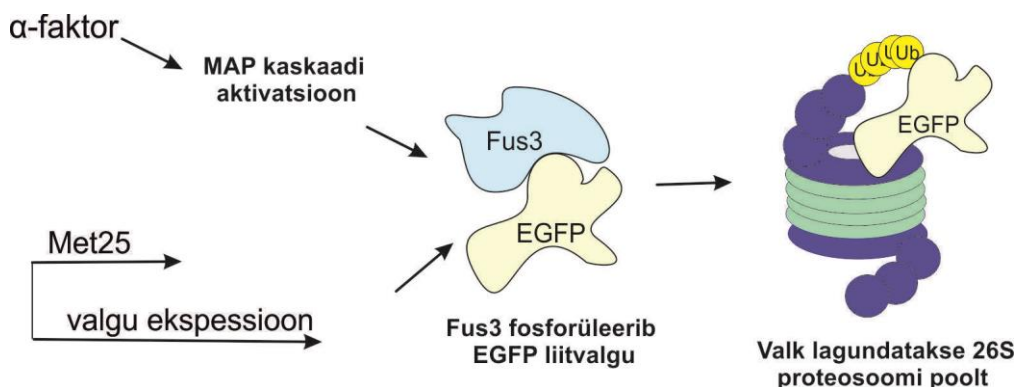
Järgmiseks ülesandeks oli sünteetilise fosfodegroni disainimine. Siin lähtuti peamiselt uurimisgrupis eelnevalt tehtud eksperimentidest ja saadud tulemustest. Lisaks kasutati kirjandusest leitud teadmisi. Degroni disainimisel võeti aluseks *S. cerevisiae* Cdk1 inhibiitor Far1, mis on Fus3 substraat ja vastutab G1 aresti eest. Far1-s on teada Fus3 sidumissait ja fosforüleerimisait. Meie uurimisgrupis on Far1-s eelnevalt kirjeldatud Cdk1 poolt fosforüleeritav fosfodegroni järjestus. Disainitud sünteetiline fosfodegron on toodud joonisel 7.



Joonis 7. Sünteetiline fosfodegron. Sünteetiliste fosfodegronite kontrollimiseks loodi konstrukti, kus lisaks fosfodegronile olid lokalisatsiooni signaalid NLS või NES, MAPK seondumissait, linker ja EGFP, et fluorentssignaali abil jälgida valgu lagundamist.

Degroni jaoks komplekteeriti sünteetiline järjestus, kus fosfodegronile lisati C-terminaalsesse ossa EGFP järjestus, mille järgi on võimalik jälgida ja hinnata degroni kiirust. Konstrukti N-terminaalsesse osasse lisati tuumaimpordisignaali (NLS) või tuumaekspordisignaali (NES).

NLS ja NES järjestused valiti kirjandusele tuginedes: NLS järjestuseks lisati MPPKKRKY (Sun *et al.*, 2011) ja NES järjestuseks MNELALKLAGLDINK (Blondel *et al.*, 2000). Nende järjestuste kohta on teada, et töötavad pärmirakkudes. Lokalisatsioonisignaali ja fosfodegroni vahele asetati MAP kinaasi Fus3 seondumissait Far1 valgust ning linker, milleks oli järjestus Far1 valgust. Kuna Fus3 puhul ei ole kirjandusest leida optimaalset kaugust fosforüleerimissaidi ja sidumissaidi vahel, siis linkeri pikkuse valikul tugineti meie uurimisgrupis tehtud katsetele ja saadud tulemustele, et tagada fosfodegroni efektiivne fosforüleerimine. Degron I ja degron II järjestused disainiti erineva aminohappelise järjestusega, et kontrollida kindlate aminohapete olulisust fosforüleerimisele ja spetsiifilisusele. Aluseks võeti Cdk1 poolt fosforüleeritav degron ja Fus3 poolt fosforüleeritav sait Far1-s. Degron I järjestus on PISPQFSPQELKKTAG ja degron II järjestus on PISPPPSPQELKKTAG. LKKTAG järjestus pärineb Cdk1 degronist ja see lisati kuna on teada, et lüsiinid on olulised ubiquitiini molekulide kinnitumiseks (Petroski ja Deshaies, 2003). SPQ ja SPP järjestused degronis on kasutusel kui Fus3 fosforüleerimissaidid.



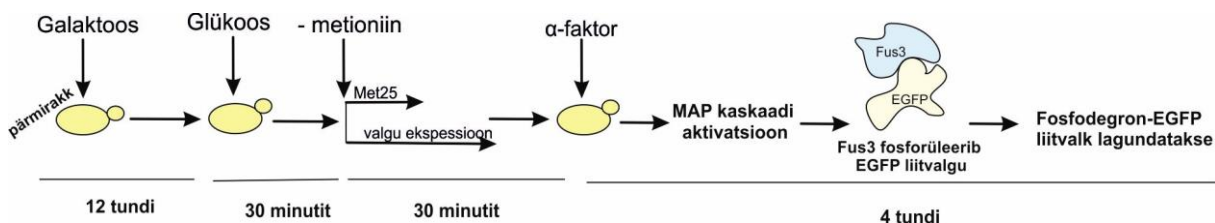
Joonis 8. Katsesüsteem. Selleks, et oleks võimalik fosfodegroneid testida loodi katsesüsteem. Met25 promootori abil kindlustati piisava valgu koguse olemasolu ning α -faktori abil aktiveeriti MAP kinaas Fus3. Fus3 ja fosfodegroni-EGFP liitvalgu kohalolu korral fosforüleerib Fus3 liitvalgu ning see suunsatakse lagundamisele.

Degradatsiooni kiiruse jälgimiseks on vaja esmalt degroni ekspressioon initseerida ja hiljem jälle välja lülitada. Selleks sobib hästi indutseeritav promooter. Pärmirakkudes kasutatakse enamasti tugevat GAL1 promooterit, mida saab sisse ja välja lülitada. Antud katseskeem aga seda ei võimaldanud, sest GAL1 promooter oli kasutusel juba tüves DK252 ja selle aktiivsus oli vajalik pärmirakkude kasvuks. Valik tehti Met25 promooteri (Solow *et al.*, 2005) kasuks, mida saab vastavalt metioniini juuresolekul välja ja metioniini puudumisel sisse lülitada (joonis 8). Met25 on teadaolevalt tugev promootor, mis tagab tugeva valgu ekspressiooni. See promootor valiti selleks, et kindlustada piisav valgu kogus fosfodegronite töö jälgimiseks.

Selleks, et ekspresseeritud valku lagundamiseks märkida ehk fosforüleerida kasutati pärmi MAP kinaasi Fus3, mida on võimalik aktiveerida pärmi feromooniraja kaudu. Siin katses kasutati feromooniraja aktiveerimiseks feromooni α -faktorit. Feromooni juuresolekul aktiveerub rajas MAP kinaaside kaskaad, mille tulemusena muutub aktiivseks MAPK Fus3. Nii substraatvalguga kui ka Fus3 juuresolekul substraatvalk ehk loodud fosfodegron-EGFP liitvalk fosforüleeritakse ning suunatakse lagundamisele.

2.3.2 Fosfodegronite analüüs *in vivo*

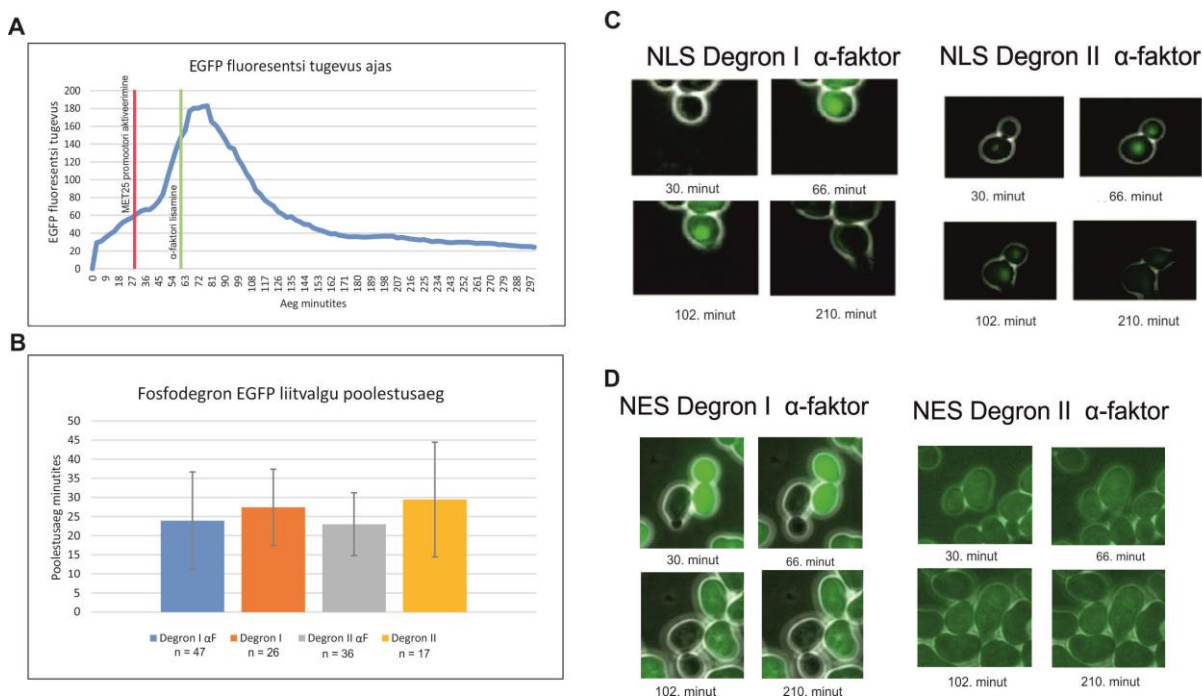
Selleks, et jälgida elusrakkudes fosfodegroni mõju EGFP lagundamisele viidi disainitud fosfodegronite konstruktid pärmi tüvesse DK252 (Egelhofer *et al.*, 2008). Fosfodegronite *in vivo* analüüsiks valiti pärmi tüvi DK252, kuna sellel tüvel on deleteeritud G1/S rakutsükli kontrollpunkti reguleerivate valkude järjestused Cln1 ja Cln2. Alles on jätud tsükliin Cln3 GAL1 promooteri kontrolli alla, et tagada normaalne rakutsükli toimimine galaktoosi juuresolekul. Pärmi tüvi DK252 annab võimaluse glükoosil kasvades rakutsükkel peatada G1 faasis. See on oluline, kuna nii on võimalik tagada G1 faasi ensüümide aktiivsus ning tekitada olukord, kus pärmirakkudel on võimalik käivitada paardumine. Katse skeem on kujutatud joonisel 9.



Joonis 9. *In vivo* katse skeem. Fosfodegronite efektiivsuse hindamiseks elusrakkudes koostati katseskeem, mille järgi kasvatati rakke esmalt galaktoosi sisaldaval söötmel, et tagada piisav elujõuliste rakkude kogus. Seejärel anti rakkudele glükoosi sisaldavat söödet, et peatada rakutsükkel ning fosfodegroni-EGFP liitvalgu ekspresseerimiseks käivitati Met25 promootor söötmega, millest puudus metioniin. Peale 30 minutit Met25 promootor suleti metioniini söötmesse lisamisega. MAP kinaasi Fus3 aktiveerimiseks lisati rakkudele α -faktorit. Seejärel jälgiti liitvalgu lagunemiskiirust.

Elusrakkudes EGFP signaali kvantifitseerimiseks ning fosfodegronite ja EGFP lagundamise seose leidmiseks oli katses vaja valgu ekspressioon lõpetada kindlal ajahetkel. Selleks kasutati Met25 promootori aktivatsiooni söötmega, kus puudus metioniin. Metioniini puudumise korral algas pärmirakkudes fosfodegronite ja EGFP liitvalgu ekspressioon. Met25 promootor hoiti lahti 30 minutit, et tagada piisav valgu hulk, ning suleti metioniini sisaldava söötmega. Selleks, et kontrollida fosfodegronite mõju valgu lagundamise kiirusele, lisati rakkudele α -faktorit sisaldavat söödet, et käivitada MAP kinaaside kaskaadi kaudu Fus3 aktivatsioon.

Fus3 alustas fosfodegronite fosforüleerimist ning seejärel oli võimalik EGFP fluoresseriva signaali järgi analüüsida valgu lagundamise kiirust. Fosfodegronite mõju valgu lagundamisele elusrakkudes uuriti peatükis 2.2.10 kirjeldatud mikrofluidika plaatides. Kuna üks mikrofluidika plaat võimaldab katseid teha neljas erinevas kambri, siis tehti ka paralleelselt kontroll katse, kus α -faktori asemel lisati söötlele DMSO-d. Katse tulemused on joonisel 10.



Joonis 10. Fosfodegroni kiiruse hindamine. (A) Elusrakke jälgiti kuni 5 tundi, iga 3 minuti tagant tehti mikroskoobipilt, et oleks võimalik kvantifitseerida EGFP signaali tugevust. 30 minutit peale katse ülesseadmist on näha fosfodegroni ja EGFP liitvalgu kontsentratsiooni tõusu. Seejärel algab EGFP signaali nõrgenemine, mis näitab kompleksvalgu lagundamist. (B) EGFP poolestusaeg alates α -faktori lisamisest NLS degron I ja NLS degron II konstruktidel. (C) EGFP fluoressentsi tugevus 30., 66., 102. ja 210. minutil alates katse algusest NLS_Degron I ja NLS_Degron II konstruktidel, millele oli lisatud α -faktorit. (D) EGFP fluoressentsi tugevus 66. ja 102. minutil NES_Degron I ja NES_Degron II konstruktidel, millele oli lisatud α -faktorit.

Nagu loodetud, siis alates 30. minutist algas EGFP fluoressentsi tugevnemine, mis oli tingitud Met25 promooteri aktiveerimisest. Ootuspäraselt lokaliseerusid ka NLS signaaliga degronid rakutuuma ja NES signaaliga degronid tsütoplasmasse. EGFP signaal saavutas haripunkti veidi peale 60. minutit. Sellest alates hakkas EGFP fluoressents langema, mis näitab liitvalgu lagundamist. Ka see oli ootuspärane. Eeldati, et α -faktori poolt aktiveeritud Fus3 fosforüleerib degroni ja viib see läbi EGFP degradatsiooni. Pool fosfodegronite ja EGFP liitvalgust lagundati ligikaudu 25 minutiga. Märkimisväärset erinevust ei olnud fosfodegronit I ja II sisaldanud kompleksite vahel. Üllatusena tuli aga see, et EGFP signaal langes sarnases tempos rakkudes, millele ei lisatud α -faktorit ja seega ei aktiveeritud ka kinaasi Fus3. Nendes rakkudes oli EGFP poolestusaeg keskmiselt ainult 5 minutit pikem. See võib tähendada, et

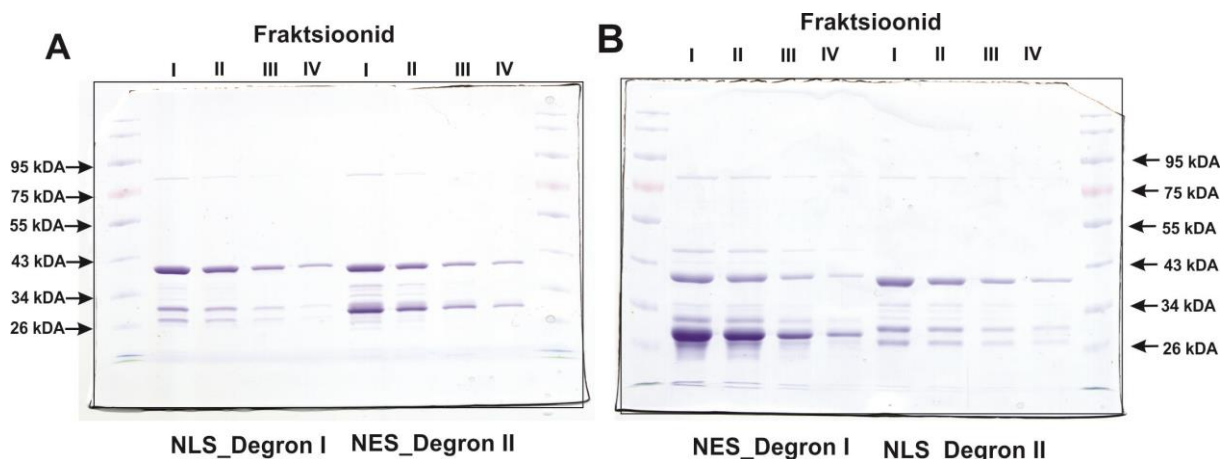
fosfodegroneid fosforüleerib peale kinaasi Fus3 veel mõni muu kinaas ning degron ei ole piisavalt spetsiifiline. Või siis on MAP kinaaside basaalne aktiivsus piisav, et degron fosforüleerida piisaval määral ka ilma α -faktori poolse aktivatsioonita. Ühe võimalusena kaaluti ka, et degron ei saa üldse Fus3 poolt fosforüleeritud ja see, mida jälgime on basaalne degradatsioon, mis tuleb Far1 valgust võetud degroni järjestusest. Eelnevalt uurimisgrupis tehtud katsed näitavad, et EGFP ilma degroni järjestuseta peaks samadel tingimustel ja sama aja jooksul olema stabiilne.

NES signaaliga degroneid sisaldanud rakkude puhul olid tulemused osalt ootuspärased. EGFP fluorentssignaali püsis ühtlasena raku tsütoplasmas kogu katse jooksul. Üks põhjuseid selleks võib olla üldine madalam kinaasne aktiivsus võrreldes raku tuuma kinaasne aktiivsusega. Samuti on tsütoplasmaatilised degronid ja neid ära tundvad valgud erinevad nendest, mida võib tuumast leida. Kuid samas oli EGFP signaali intensiivsus madalam kui NLS signaalidega degronite puhul. See osutus probleemiks tulemuste analüüsimiseks kasutatud programmile ning tekkisid raskused EGFP signaali kvantifitseerimisel, kuna programm oli kirjutatud peamiselt tuumas leiduvate signaalide kvantifitseerimiseks. Sellest hoolimata on tsütoplasma potentsiaalselt hea keskkond fosfodegronite kaudu valkude lagundamiseks, kuna häirivaid tegureid teiste ensüümide näol on vähem ning nii on võimalik disainida spetsiifilisemaid degroneid ja tõsta lagundamise kiirust. Seetõttu on NES signaaliga konstruktidena plaanis katseid jätkata ning edaspidiste katsete analüüsimiseks arendada sobiv programm, millega oleks võimalik ka tsütoplasmas fluorentssignaali tugevust mõõta.

Selleks aga, et kontrollida fosfodegronite fosforüleerimist Fus3 poolt otsustati degronid puhastada bakterist GST-märgisega ja teostada *in vitro* kinaasikatsed.

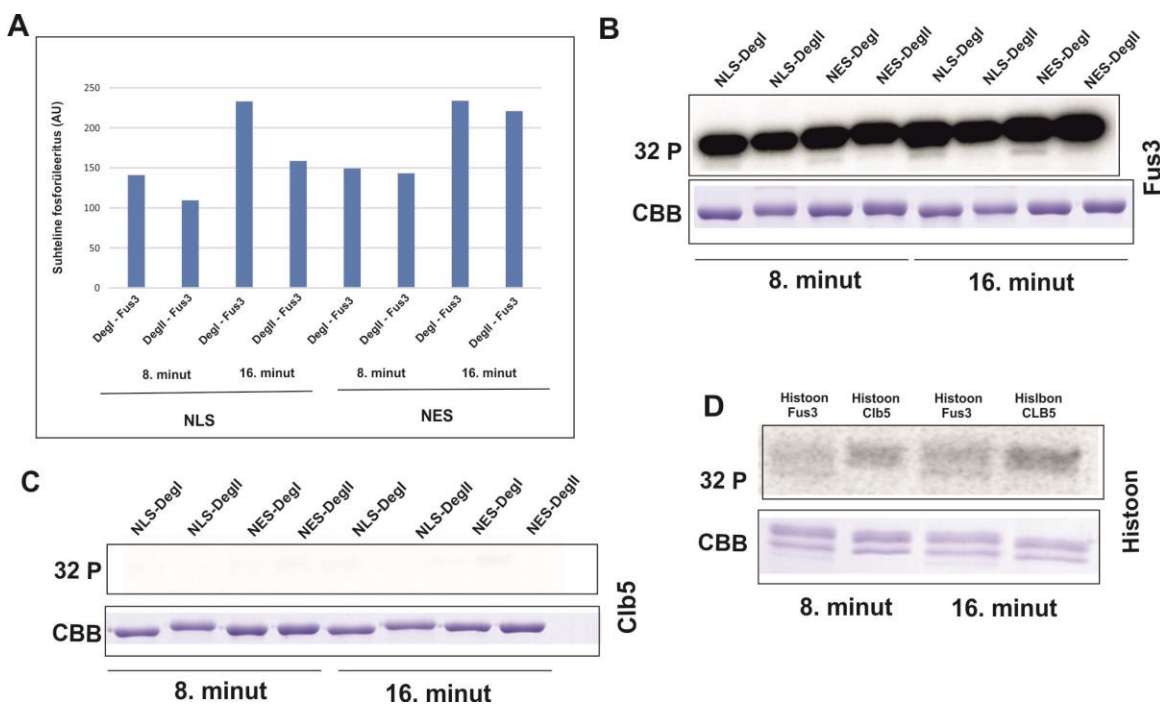
2.3.3 Fosfodegronite analüüs *in vitro*

Pärmirakkudes läbiviidud fosfodegronite analüüs tõstas küsimuse, et kas Fus3 on üldse võimeline fosforüleerima degroneid. Sellele vastamiseks puhastati fosfodegronid esmalt bakterist GST-märgisega (joonis 11) ja seejärel viidi läbi *in vitro* kinaasireaktsioonid puhastatud kinaasidega Fus3 ja Clb5/Cdk1.



Joonis 11. GST märkega fosfodegronite puhastamine. SDS-PAA-geelidel on näha valgu puhastamise produktid. Degronite suurus on 10 kDa ja koos GST-märkega (30 kDa) on valgu suurus umbes 40 kDa. (A) Geelil on näha NLS_Degron I ja NES_Degron II valgu puhastamise tulemused. (B) Geelil on näha NES_Degron I ja NLS_Degron II valgu puhastamise tulemused.

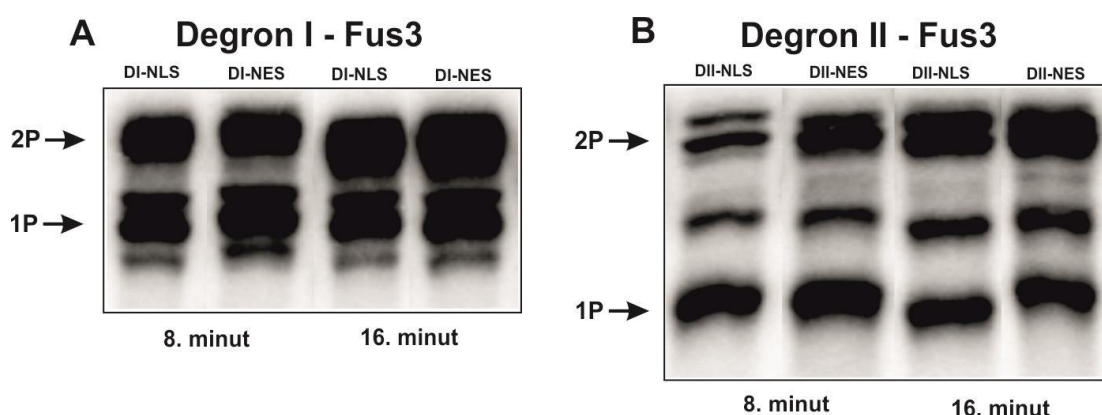
Kinaasireaktsioonide tulemustest (joonis 12) on näha, et degronid saavad Fus3 poolt fosforüleeritud. Kontrollina kasutati puhastatud Clb5/Cdk1 kompleksi, et hinnata, kui spetsiifiline on degron Fus3 suhtes. Erinevalt Clb5/Cdk1 kompleksist sisaldab degron seondumissaiti MAP kinaasile Fus3. Tulemusest on selgelt näha, et Fus3 on võimeline *in vitro* ja tõenäoliselt siis ka *in vivo* degroneid fosforüleerima. Kontrollsubstraadiks oli selles katses histoon H1, mis peaks olema mõlemale kinaasile sarnaselt hea substraat.



Joonis 12. GST märgisega puhastatud degronite fosforüleerimine Fus3 ja Clb5/Cdk1 poolt. (A) Tulpdiagrammil on näha degronite fosforüleerimine Fus3 poolt kahel ajapunktil. (B) Autoradiograafia pilt fosfodegronite fosforüleerimisest Fus3 poolt ja *Coomassie brilliant blue* R-250 värvingus geel. (C) Autoradiograafia pilt fosfodegronite fosforüleerimisest Clb5/Cdk1 poolt ja

Coomassie brilliant blue R-250 värvingus geel. (D) Autoradiograafia pilt histoon H1 fosforüleerimisest Fus3 ja Clb5/Cdk1 poolt ning *Coomassie brilliant blue* R-250 värvingus geel.

Kuna degradatsiooniks on vaja mõlema saidi fosforüleerimine degronis, siis otsustati Phos-Tag PAA-geele kasutades kontrollida, kas ka see tingimus on samuti täidetud. Phos-Tag geelis on võimalik fosforüleeritud valgud lahutada vastavalt fosfaatide arvule. Mida rohkem fosfaate on valgus, seda aeglasemalt need geelis liiguvad (kirjeldatud peatükis 2.2.9). Joonisel 13 on näha erinevalt fosforüleeritud degronite vormid Phos-Tag geelis. Selgelt on näha, et esindatud on ka kahe fosfaadiga vormid ja need kogunevad ajas, kui võrrelda 8. ja 16. minuti ajapunkti.



Joonis 13. Degronite fosforüleerimine Fus3 poolt. Phos-tag SDS-PAA geelil on näha Fus3 poolt fosforüleeritud degronid ja nende erinevad fosforüleerimise tasemed. (A) Fus3 poolt fosforüleeritud degroni I puhul on 16. minutil difosforüleeritud vormi rohkem, kui 8. minutil. (B) Fus3 poolt fosforüleeritud degroni II puhul on 16. minutil difosforüleeritud vormi rohkem 8. minutil. Ühe fosfaadiga vormi on ajas jäänud vähemaks.

In vitro eksperimentide põhjal saab väita, et degronid on Fus3 poolt fosforüleeritavad ja seda mõlemast saidist. Fosforüleerimine on kiire, juba 16 minutiks on enamus substraadist fosforüleeritud. Reaktsiooni kiirus on pidurdunud kui võrrelda 8. ja 16. minuti ajapunkti. Sama saab öelda, kui vaadata Phos-Tag geele. Kahest saidist fosforüleeritud degronid on juba 8. minutil olemas. Nendele tulemustele tuginedes võib väita, et Fus3 poolne fosforüleerimise puudumine *in vivo* ei tohiks olla põhjuseks, miks degronid käituvad sarnaselt α -faktori juuresolekul ja puudumisel.

Järgmiseks tuleks disainida degronite ja EGFP liitvalkude sellised variandid, kus fosforüleerimise saidid on muteeritudalaniinideks, mis välistab fosfosõltuva degradatsiooni. Kui sellised degronid jäävad stabiilseks või poolestus aeg pikeneb tunduvalt, siis saab väita, et ilma feromooniga töötlemata rakkudes aset leidnud EGFP lagunemine oli põhjustatud mõne teise kinaasi või siis liiga kõrge Fus3 baasaktiivsuse poolt. Kaugemas tulevikus, kui need

fosfodegronite omadused on paremini kirjeldatud ja katsesüsteemi optimeeritud on võimalik disainida juba degroneid, mille kiiruseid saab muuta. Näiteks muutes Fus3 seondumissaidi kaugust fosforüleerimissaidist. Kui seondumissait viia optimaalsest kaugusest välja, siis peaks degroni fosforüleerimise kiirus langema ja sellega langeks ka degroniga seotud valgu lagunemise kiirus. Kindlasti on plaanis degroneid kasutada *in vivo* süsteemis mõne olulise valgu degradeerimiseks. Näiteks rakutsükli regulatsiooni eest vastutavad valgud.

Kokkuvõte

Signaalirajad on raku elutegevuse reguleerimise oluline osa, nad koosnevad kindla funktsiooniga valkudest, mida aktiveeritakse või lagundatakse vastavalt edasikantavale signaalile. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli luua sünteetiline fosfodegron, millega suudaks seonduda pärmi feromooniraja MAP kinaas Fus3 ning mis initsieeriks substraatvalgu lagundamise. Fosfodegroni kontrollimiseks disainiti liitvalk, mis koosnes Fus3 substraadist Far1-st pärit seondumisalast ja kirjanduse põhjal loodud kahe fosforülatsioonisaidiga degradatsiooni initsiatsioonialast. Lisaks oli valgu aminohappelisele järjestusele lisatud fluorestseeriva valgu EGFP järjestus, et jälgida fosfodegroni mõju valgu lagundamiskiirusele, tuumasignaal NLS ning linker.

Fosfodegroni efektiivsuse kontrollimiseks teostati *in vivo* katsed pärmi *S. cerevisiae* tüves DK252, kust olid deleteeritud tsükliinid Cln1 ja Cln2 kodeerivad järjestused, et rakkude areng oleks võimalik peatada G1/S rakutsükli kontrollpunktis. See võimaldas uurida rakutsükli G1 faasis aktiivse pärmi feromooniraja MAP kinaasi Fus3 ja loodud sünteetiliste fosfodegronite interaktsiooni. *In vivo* katsetes ei olnud märgata fosfodegronite I ja II initsieeritud lagundamise kiiruses suurt erinevust. Pool EGFP valgust lagundati mõlema degroni puhul keskmiselt 25 minutiga. Kontrollrakkude puhul lagundati EGFP mõnevõrra aeglasemalt, kuid kuna erinevus ei olnud piisavalt suur, teostati ka *in vitro* kinaasikatsed, et kontrollida Fus3 seondumist fosfodegronitega.

Kinaasikatsete tulemusena leiti, et Fus3 fosforüleerib disainitud fosfodegroneid efektiivselt kahes saidis. Kontrollkatses kasutatud tsükliin Clb5 fosfodegroneid ei fosforüleerinud, seega võib järeldada, et loodud fosfodegronid on kinaasile Fus3 sobivad substraadid. Kuna *in vivo* katsed ei andnud aga oodatud tulemust, võib oletada, et loodud fosfodegronitega on võimalised interakteeruma ka mõned teised rakutsükli G1 faasis aktiivsed ensüümid. On ka võimalik, et *in vivo* efektiivseks töötamiseks on fosfodegroni kaugus seondumissaidist ebasobiv või on vaja fosfodegronile lisada lüsiine, et tekitada suurem ala ubikvitiinide seondumiseks. Fosfodegronite spetsiifilisuse tagamiseks ja kiiruse edasiarendamiseks on oluline kontrollida fosfodegroni seondumisvõimet erinevate G1 faasi ensüümidega ning leida fosfodegronite optimaalne aminohappeline järjestus ning füüsiline kaugus teistest funktsionaalsetest moodulitest.

Design and testing of synthetic phosphodegrons induced by MAP kinase Fus3 in *Saccharomyces cerevisiae*

Nele Kuusma

Summary

Signalling circuits play one of the most important roles of regulating cell cycle and decisions. There are a lot of different diseases caused by errors in cell cycle. If we could understand the principle of regulation of signalling circuits, it would be possible to repair them or design new synthetic circuits with the ability to direct cells. With the help of synthetic biology, it is possible to create whole new synthetic circuits that are composed of functional modules from different organisms. It gives us the possibility to use cells as factories or computers to produce new chemicals or medicines without using harmful chemical industries and lead the cell decisions to suitable directions.

The aim of this study was to design synthetic phosphodegrons that could be used as a part of synthetic signalling circuit in the future. To control the work of these phosphodegrons, protein complexes were created. They were composed of the docking site of Far1, which is the substrate to yeast pheromone pathway MAP kinase Fus3 and synthetic degradation site designed by following the examples from previous experiences. There were also nuclear localisation signal, linker and fluorescent protein sequence added to the protein to make it possible to visualize the effect of phosphodegrons on protein degradation. For *in vivo* experiments *S. cerevisiae* strain DK252 with deletations of cyclins Cln1 and Cln2 was used. It was necessary to stop the cell cycle at the G1/S checkpoint to investigate the interaction of synthetic phosphodegrons and MAP kinase Fus3. As a result there was no significant difference between two phosphodegrons. The half time of fluorescence protein EGFP was approximately 25 minutes. The protein in control cells was degraded slightly slower, but the difference was not so remarkable as expected. To investigate the binding of Fus3 and phosphodegrons, kinase assays were implemented. As the phosphorylation of phosphodegrons by Fus3 was strong and there was no positive result in the control experiment using cyclin Clb5 and phosphodegrons, it can be concluded that designed phosphodegrons are specific substrates to Fus3. However the outcome of the *in vivo* experiment was unexpected, possibly due to the capability of other enzymes to bind the designed phosphodegrons during G1 phase. During the prospective studies it is necessary to optimize the sequence of designed

phosodegrons to ensure specific binding to kinase Fus3 and develop faster degradation initiation.

Kasutatud kirjanduse loetelu

- Al-zain, A., Schroeder, L., Sheglov, A., and Ikui, A.E. (2015). Cdc6 degradation requires phospho-degron created by GSK-3 and Cdk1 for SCF. 26: 1–44.
- Bao, M.Z., Schwartz, M.A., Cantin, G.T., Iii, J.R.Y., Madhani, H.D., Francisco, S., and Jolla, L. (2004). Pheromone-Dependent Destruction of the Tec1 Transcription Factor Is Required for MAP Kinase Signaling Specificity in Yeast. 119: 991–1000.
- Blondel, M., Galan, J., Chi, Y., Lafourcade, Â., Deshaies, R.J., and Peter, M. (2000). Nuclear-speci ® c degradation of Far1 is controlled by the localization of the F-box protein Cdc4. 19: 6085–6097.
- Blount, B.A., Weenink, T., and Ellis, T. (2012). Construction of synthetic regulatory networks in yeast. FEBS Lett. 586: 2112–2121.
- Cho, S., and Dreyfuss, G. (2010). A degron created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. Genes Dev. 24: 438–442.
- Chou, S., Zhao, S., Song, Y., Liu, H., and Nie, Q. (2008). Fus3-triggered Tec1 degradation modulates mating transcriptional output during the pheromone response. 1–7.
- Ciechanover, A. (1998). EMBO MEMBER ’ S REVIEW The ubiquitin – proteasome pathway : on protein death and cell life. 17: 7151–7160.
- Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haast, A.L., and Hershko, A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. 77: 1365–1368.
- Collins, K., Pavletich, N., and Jacks, T. (1997). The cell cycle and cancer. 94: 2776–2778.
- Doncic, A., and Skotheim, J.M. (2013). Article Feedforward Regulation Ensures Stability and Rapid Reversibility of a Cellular State. MOLCEL 50: 856–868.
- Egelhofer, T.A., Villén, J., McCusker, D., Gygi, S.P., and Kellogg, D.R. (2008). The septins function in G1 pathways that influence the pattern of cell growth in budding yeast. PLoS One 3.
- Elion, E.A. (2001). The Ste5p scaffold.
- Campbell SD, et al. (1995) Drosophila Wee1 kinase rescues fission yeast from mitotic catastrophe and phosphorylates Drosophila Cdc2 in vitro. *Mol Biol Cell* 6(10):1333-47
- Garrington, T.P., and Johnson, G.L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. 211–218.
- Gordley, R.M., Williams, R.E., Bashor, C.J., Toettcher, J.E., Yan, S., and Lim, W.A. (2016). Engineering dynamical control of cell fate switching using synthetic phospho-regulons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113: 13528–13533.
- Grewal, S., Molina, D.M., and Bardwell, L. (2006). Mitogen-activated protein kinase

(MAPK)-docking sites in MAPK kinases function as tethers that are crucial for MAPK regulation in vivo. 18: 123–134.

Hao, N., Behar, M., Parnell, S.C., Torres, M.P., Borchers, C.H., Elston, T.C., and Dohlman, H.G. (2007). A Systems-Biology Analysis of Feedback Inhibition in the Sho1 Osmotic-Stress-Response Pathway. *Curr. Biol.* 17: 659–667.

Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., and Rose, I.A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown : Conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. 77: 1783–1786.

Hershkos, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. (1983). Components of Ubiquitin-Protein Ligase System. 258: 8206–8214.

Herskowitz, I. (1995). MAP Kinase Pathways in Yeast: For Mating and More. 80: 187–197.

Hlavackona, V., and Jan, N. (2006). Chemical Signal as a Rapid Long-Distance Information Messenger After Local Wounding of a Plant ? 2324.

Ingolia, N.T., and Murray, A.W. (2008). Positive feedback loops as a flexible biological module. 17: 668–677.

Jeoung, D., Boulrat, S., Gartner, A., Jovanovic, A., Cross, F.R., and Ammerer, G. (1998). Pheromone-Dependent G 1 Cell Cycle Arrest Requires Far1 Phosphorylation , but May Not Involve Inhibition of Cdc28-Cln2 Kinase , In Vivo. 18: 3681–3691.

Jordan, D., Landau, E.M., and Iyengar, R. (2000). Signaling Networks: The Origins of Cellular Multitasking. 103: 193–200.

Kiel, C., Yus, E., and Serrano, L. (2010). Review Engineering Signal Transduction Pathways. 33–47.

Kõivomägi, M., Örd, M., Iofik, A., Valk, E., Venta, R., and Faustova, I. (2013). Multisite phosphorylation networks as signal processors for Cdk1. 20: 1–24.

Lyons, N.A., Fonslow, B.R., Diedrich, J.K., Yates, J.R., and Morgan, D.O. (2013). Sequential primed kinases create a damage-responsive phosphodegron on Eco1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20: 194–201.

Manzoni, R., Urrios, A., Velazquez-Garcia, S., de Nadal, E., and Posas, F. (2016). Synthetic biology: insights into biological computation. *Integr. Biol. (Camb).* 8: 518–532.

Marshall, C.B. (1995). Specificity of Receptor Tyrosine Kinase Signaling : Transient versus Sustained Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. 2: 179–185.

Melvin, A.T., Woss, G.S., Park, J.H., Dumberger, L.D., Waters, M.L., and Allbritton, N.L. (2013). A comparative analysis of the ubiquitination kinetics of multiple degrons to identify an ideal targeting sequence for a proteasome reporter. *PLoS One* 8: e78082.

Metzger, T., Kleiss, C., Sumara, I., and Cul, K. (2013). Insights from PLK1 / KLHL22

interaction CUL3 and protein kinases. 2291–2296.

Mok, J., Kim, P.M., Lam, H.Y.K., Piccirillo, S., Zhou, X., Jeschke, R., Sheridan, D.L., Parker, S.A., Desai, V., Jwa, M., *et al.* (2011). NIH Public Access. 3.

Mumberg D, et al. (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res* 22(25):5767-8

Murata, S., Yashoda, H. and Tanaka, K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*

Nevozhay, D., Zal, T., and Balázsi, G. (2013). Transferring a synthetic gene circuit from yeast to mammalian cells. *Nat. Commun.* 4: 1451.

Orlicky, S., Tang, X., Willems, A., Tyers, M., and Sicheri, F. (2003). Structural Basis for Phosphodependent Substrate Selection and Orientation by the SCF Cdc4 Ubiquitin Ligase. 112: 243–256.

Perbal, B. (2003). Cell Communication and Signaling Communication is the key. 4: 1–4.

Petroski, M.D., and Deshaies, R.J. (2003). Context of multiubiquitin chain attachment influences the rate of Sic1 degradation. *Mol. Cell* 11: 1435–1444.

Prakash, S., Tian, L., Ratliff, K.S., Lehotzky, R.E., and Matouschek, A. (2004). An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 830–837.

Price, C.T.D., and Abu Kwaik, Y. (2010). Exploitation of host polyubiquitination machinery through molecular mimicry by eukaryotic-like bacterial F-box effectors. *Front. Microbiol.* 1: 1–12.

Pryciak, P.M. (2009). Designing new cellular signaling pathways. 16: 249–254.

Reed, S.I. (2003). RATCHETS AND CLOCKS : THE CELL CYCLE , UBIQUITYLATION AND PROTEIN TURNOVER. 4.

Schrader, E.K., Harstad, K.G., and Matouschek, A. (2009). Targeting proteins for degradation. *Nat. Chem. Biol.* 5: 815–822.

Schulman, B.R.A.S., and Indstrom, D.E.L.L. (1998). Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. 95: 10453–10458.

Solow, S.P., Sengbusch, J., and Laird, M.W. (2005). Heterologous protein production from the inducible MET25 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* 21: 617–620.

Sun, Z., Diaz, Z., Fang, X., Hart, M.P., Chesi, A., Shorter, J., and Gitler, A.D. (2011). Molecular Determinants and Genetic Modifiers of Aggregation and Toxicity for the ALS Disease Protein FUS / TLS. 9.

Swinburne, I.A., Miguez, D.G., Landgraf, D., and Silver, P.A. (2008). Intron length increases

oscillatory periods of gene expression in animal cells. 2342–2346.

Takafumi Miyamoto (2013). Synthesizing Biomolecule-based Boolean Logic Gates. 2: 72–82.

Tang, X., Orlicky, S., Liu, Q., Willems, A., Sicheri, F., and Tyers, M. (2005). Genome-wide surveys for phosphorylation-dependent substrates of SCF ubiquitin ligases. *Methods Enzymol.* 399: 433–458.

Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19: 94–102.

Ubersax, J.A., and Jr, J.E.F. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. 8: 530–542.

Kasutatud veebiaadressid

Phos-tag SDS-PAA-geeli põhimõte:

http://www.wako-chem.co.jp/english/labchem/product/life/Phos-tag/pdf/Phos-tag_E.pdf

Lihlitsents

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Nele Kuusma
(sünnikuupäev: 07.02.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose
„MAP kinaasi Fus3 poolt indutseeritavate sünteetiliste fosfodegronite disainimine ja testimine *Saccharomyces cerevisiae* rakkudes”

mille juhendaja on Ervin Valk,

- 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 **29.05.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 29.05.2017