

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

**Pagaripärmi valgu Sld2 spetsiifiline fosforüülimine Clb5-
Cdk1 kompleksi poolt**

Magistritöö

30EAP

Sven Sakson

Juhendaja Ervin Valk, MSc

TARTU 2021

Infoleht

Pagaripärmi valgu Sld2 spetsiifiline fosforüülimine Clb5-Cdk1 kompleksi poolt

Vaid üks tsüliinsõltuv kinaas ehk Cdk (ingl *cyclin-dependent kinase*) vastutab *Saccharomyces cerevisiae* veatu mitootilise rakutsükli eest. Erinevates rakutsükli faasides toodetakse erinevat tüüpi tsükliine, mis seonduvad Cdk1-ga ja moodustavad tsükliin-Cdk kompleksi. Tsükliinide pindadel on erinevad motiivid, mis seonduvad substraatvalkudel olevate motiividega. Selline erinevate motiivide koostöö tagab tsükliin-Cdk kompleksi spetsiifilisuse läbi rakutsükli. Antud töös uuriti, millised motiivid võimaldavad Clb5-Cdk1 kompleksi spetsiifilist fosforüülimist. Kõigepealt leidsime, et *S.cerevisiae* S-faasi Clb5 spetsiifiline valk Sld2 ei vaja varem kirjeldatud RxL motiive tagamaks Clb5-Cdk1 kompleksi spetsiifilisust. Seejärel, trunkeerides Sld2 valku, avastasime kaks uutset motiivi Sld2-st, mis tagavad Clb5-Cdk1 kompleksi spetsiifilisuse ja seeläbi Sld2 fosforüülimise.

Märksõnad: rakutsükkel, tsükliin-Cdk kompleks, seondumismotiivid, fosforüülimine, replikatsioon.

CERCS kood: P310 (proteiinid, ensümoloogia)

Specific phosphorylation of the yeast protein Sld2 by the Clb5-Cdk1 complex

Only one cyclin-dependent kinase or Cdk, is responsible for the flawless mitotic cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. Different types of cyclins that bind to Cdk1 and form a cyclin-Cdk complex in different phases of the cell cycle. The surfaces of the cyclins have different motifs that bind to the motifs on the substrate proteins. This interaction of different motifs ensures the specificity of the cyclin-Cdk complex throughout the cell cycle. In this work, the motifs that allow the specific phosphorylation of the Clb5-Cdk1 complex were investigated. It was first found that the *S. cerevisiae* S-phase Clb5-specific protein Sld2 does not require the RxL motifs as described previously to ensure the specificity of the Clb5-Cdk1 complex. By truncating the Sld2 protein, we discovered two novel motifs from Sld2 that ensure the specificity of the Clb5-Cdk1 complex and thus the phosphorylation of Sld2.

Keywords: Cell cycle, cyclin-Cdk complex, binding motifs, phosphorylation, replication.

CERCS: P310 (Proteins, enzymology)

Sisukord

Infoleht	2
Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.2 Rakutsükkel	7
1.3 Rakutsükli regulatsioon.....	7
1.4 Substraadi spetsiifika	9
1.5 Ebakorrapärased piirkonnad.....	10
1.6 S-faas.....	11
1.7 Sld2 fosforüülimine	14
2. Uurimus.....	16
2.1 Töö eesmärgid	16
2.2 Materjal ja meetodika	17
2.2.1. Kasutatud bakteritüved, söötmed ja lahused	17
2.2.2. DNA konstruktide valmistamine PCR-iga	18
2.2.3. Plasmidi transformatsioon bakterirakkudesse	20
2.2.4. GST – märgisega Sld2 konstruktide puhastamine.....	20
2.2.5. <i>In vitro</i> GST-Sld2 valkude fosforüülimine.....	21
2.2.6. Valgu elektroforees ja geeli kuivatamine.....	22
2.3 Tulemused ja arutelu.....	23
Kokkuvõte	35
Kirjanduse ülevaade	37
Lisad	41
Lihtlitsents	45

Kasutatud lühendid

aa – *amino acid* (aminohape)

AxA – *alanine (A), random amino acid (x) and alanine (A) motif* (alaniin (A), juhuslik aminohape (x) ja alaniin (A) motiiv)

BRCT – *BRCA1 C-terminus domain* (BRCA1 C-terminaalne ots)

BSA – *bovine serum albumin* (veise seerumi albumiini)

CBB – *Coomassie brilliant blue* (Coomassie briljantsinine)

CDK – *cyclin-dependent kinase* (tsükliinsõltuv kinaas)

CMG – *cdc45-MCM-GINS complex* (kompleks, mis sisaldab Cdc45, MCM, GINS komplekse)

DTT – *dithiothreitol* (ditiotreitool)

GST – *glutathione S-transferases* (glutatioon-S-transferaas)

HF – *high fidelity* (kõrge kvaliteet)

HP – *hydrophobic patch* (hüdrofoobne piirkond)

IDR – *intrinsically disordered regions* (ebakorrapärased piirkonnad)

IPTG – *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiid)

KxL – *lysine (K), random amino acid (x) and leucine (L) motif* (lüsiin (K), juhuslik aminohape (x) ja leutsiin (L) motiiv)

LB – *Luria Bertani*

LLPP – *leu-leu-pro-pro motif* (motiiv)

MCM – *minichromosome maintenance protein complex* (väikekromosoomi säilitamise valkude kompleks)

MRAIL – *met-arg-ala-ile-leu sequence* (järjestus)

OD – *optical density* (optiline tihedus)

ORC – *origin recognition complex* (replikatsiooni alguspiirkonda äratundev kompleks)

PEG – *polyethylene glycol* (polüetüleen glükool)

PMSF – *phenylmethylsulfonyl fluoride* (fenüülmetsüülsulfonüül fluoriid)

PNK – *polynucleotide 5'-hydroxyl-kinase* (polünukleotiidkinaas)

Pre-LC – *preloading complex* (eellaadimiskompleks)

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

RxL – *arginine (R), random amino acid (x) and leucine (L) motif* (arginiin (R), juhuslik aminohape (x) ja leutsiin (L) motiiv)

SliMs – *short linear motifs* (lühikesed lineaarsed motiivid)

SP – *serine-proline phosphosite* (seriin-proliin fosforüülimiskoht)

TP – *threonine-proline phosphosite* (treoniin-proliin fosforüülimiskoht)

WT – *wild type* (metsiktüüp)

YT – *yeast extract tryptone* (pärmiekstrakt trüptoon)

Sissejuhatus

Rakutsükli etappide läbimisega tagab rakk enda geneetilise informatsiooni edasikandmise tütarakkudesse, lõppedes raku jagunemise ehk tsütokineesiga. Pagarpärmis ehk *Saccharomyces cerevisiae*'s on kogu selle protsessi juhtimises kõige olulisem ainult üks tsükliinsõltuv kinaas. Nagu nimi juba ütleb, tsükliinsõltuv kinaas seondub erinevate tsükliinidega. Igas rakutsükli faasis on omad spetsiifilised tsükliinid. Kui tsükliinid seonduvad Cdk-dega, siis moodustuvad tsükliin-Cdk kompleksid. See omakorda tekitab kompleksile funktsionaalse spetsiifilisuse. Rakutsükli progresseerudes seonduvad tsükliinid tõstavad Cdk aktiivsust. Erinev Cdk aktiivsus on üks viis, kuidas Cdk juhib rakutsükli edenemist kindlas suunas.

Kuna Cdk-sid on vaid üks ja reguleeritavaid valke on tuhandeid, siis ei piisa ühest mehhanismist, tagamaks rakutsükli veatut edenemist. Siiani on teada vaid mõned spetsiifilisust tagavad mehhanismid. Erinevatel tsükliin-Cdk kompleksidel on kindlad motiivid, mille kaudu seondutakse substraatvalkudel olevatele motiividele; need on ka läbi aja konserveerunud, mistõttu võib leida erinevate liikide valkudelt samu motiive.

On väga oluline, et rakutsükli kõige tähtsam osa ehk S-faas, kus toimub geneetilise informatsiooni duubeldamine, toimiks veatult. S-faasi tsükliiniks on Clb5 koos Clb6-ga. Need vastutavad kogu peenhäälestuse eest, mis on vajalik DNA kahekordistamiseks. On teada, et Clb5 osaline spetsiifilisus tuleneb Clb5 pinnal olevast hüdrofoobsest piirkonnast, mis seondub substraadi pinnal oleva RxL piirkonnaga. Kuid on leitud, et RxL ei ole ainuvajalik spetsiifilise seondumise jaoks. Mistõttu võib Clb5-Cdk1 kompleksi substraatidel olla täiendav spetsiifilise seondumise mehhanism.

Kuna käesolevas magistritöös kasutatakse pagaripärmi siis kirjanduse ülevaade keskendub eelkõige pagaripärmi mitootilise rakutsükli regulatsioonile. Käesoleva töö eesmärgiks on leida Clb5-Cdk1 kompleksi substraatvalgus olev täiendav spetsiifilisust tagav seondumise mehhanism, mis võimaldab substraati fosforüülda.

Käesolev magistritöö on tehtud Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis Prof. Mart Loogi sünteetilise bioloogia uurimisgrupis.

1. Kirjanduse ülevaade

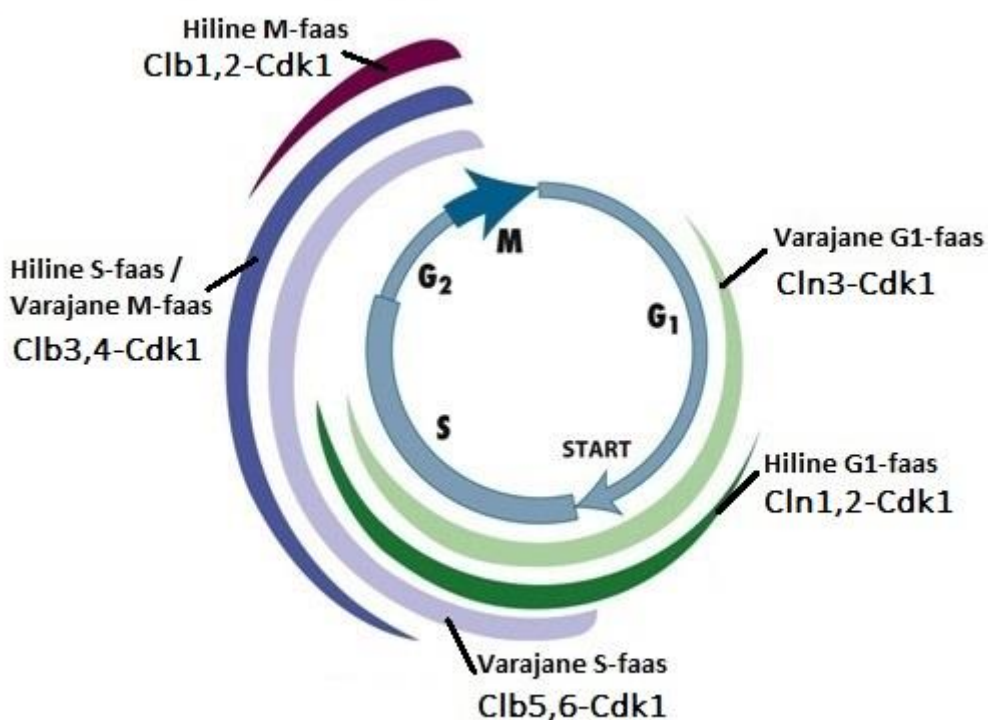
1.2 Rakutsükkel

Rakutsükkel on üldlevinud ja keeruline protsess, mis on seotud rakkude kasvu ja paljunemisega. See hõlmab mitmeid reguleerivaid valke, mis suunavad raku läbi konkreetsete sündmuste, kulmineerudes mitoosi ja kahe tütaraku tekkimisega (Schafer, 1998). Selle protsessi keskmes on Cdk ja tsükliinvalgud, mis reguleerivad rakkude progresseerumist läbi rakutsükli etappide (Schafer, 1998). Rakutsükkel jaotatakse neljaks erinevaks faasiks: G1, S, G2 ja M. Rakutsükli esimeses G1 ehk *gap*-faasis toimub raku ette valmistumine replikatsiooniks ehk S-faasi minekuks. G1 faas on eriti oluline regulatiivne periood, kuna just siin valivad rakud, kas alustada jagunemist või väljuda rakutsüklist (Morgan, 2007). Ebasoodsate kasvutingimuste korral või teistelt rakkudelt pärssivaid signaale saades võivad rakud peatuda G1 faasis pikemaks ajaks või isegi minna jagunemata olekusse mida nimetatakse G0 faasiks (Patt ja Quastler, 1963). Soodsate kasvutingimuste korral jätkatakse rakutsükliga ja minnakse üle S-faasi. S-faasis sünteesivad rakud uue koopia kromosomaalset DNA-d. Sellele etapile järgneb jällegi ettevalmistus ehk G2-faas. Siin etapis valmistub rakk ette mitoosiks ehk M-faasiks (Morgan, 2007). M-faas on rakutsükli viimane etapp; see koosneb kahest suuremast sündmusest: tuumajaotusest ehk mitoosist ning raku jagunemisest ehk tsütokineesist. Mitoos on keeruline protsess, mille käigus dubleeritud kromosomaalne DNA jaotatakse võrdselt kahe tütaraku vahel. Mitoosi lõppedes toimub tsütokinees, mil toimub lõplik raku jagunemine kaheks uueks rakuks; siin etapis jaotatakse võrdselt tuumad, rakuorganellid ja tsütoplasma ning tekib mõlemale rakule rakumembraan. M-faasi lõppedes liiguvad mõlemad tütararakud uuesti G1 faasi (Morgan, 2007).

1.3 Rakutsükli regulatsioon

Rakutsükli regulatsioon toimub läbi signaalide võrkustiku, mis kontrollib rakutsükli sündmuste järjekorda ja ajastust. Biokeemiliste lülite seeria käivitab progresseerumise rakutsükli läbi kolme peamise regulatiivse kontrollpunkti: stardi, G2/M ning metafaasi kontrollpunkti. Stardis, mis asub G1 faasi lõpus, määratletakse raku sisenemine replikatsiooni ehk S-faasi; G2/M kontrollpunktis, kontrollitakse mitoosi sisenemist metafaasist anafaasile ülemineku kontrollpunktis, reguleeritakse mitoosi viimased sündmuseid (Morgan, 2007). Rakutsükli

regulatsiooni keskseteks komponentideks on Cdk. Pagaripärmis ehk *Saccharomyces cerevisiae* rakutsükliks on kuus konserveerunud Cdk-d: Bur1, Cdk1, Ctk1, Kin28, Pho85 ja Ssn3 (Enserink ja Kolodner, 2010). Nendest ainuvajalik on vaid Cdk1, teistel on pigem rakutsükli toetav roll (Santamaría et al., 2007). Cdk valkude kontsentratsioonid on kogu rakutsükli vältel konstantsed, kuid nende aktiivsus tõuseb ja langeb rakutsükli jooksul (Mendenhall et al., 1987). Cdk-de aktiivsuse võnkumised rakutsükli ajal on tingitud peamiselt tsükliinide hulga muutustest, mis seonduvad tihedalt Cdk-dega ja stimuleerivad nende katalüütilist aktiivsust (Mendenhall ja Hodge, 1998). Erinevates rakutsükli faasides toodetakse erinevat tüüpi tsükliine, nendeks on G1 tsükliinid Cln1, Cln2 ja Cln3 ning kuus B-tüüpi tsükliini Clb1-6 (Morgan, 2007). Seondumise tulemuseks on erinevate tsükliin-Cdk komplekside moodustumine (joonis 1). Kuna need kompleksid käivitavad erinevad rakutsükli sündmused, siis nimetatakse neid G1-, G1/S-, S- ja M-Cdk-deks (Morgan, 2007).



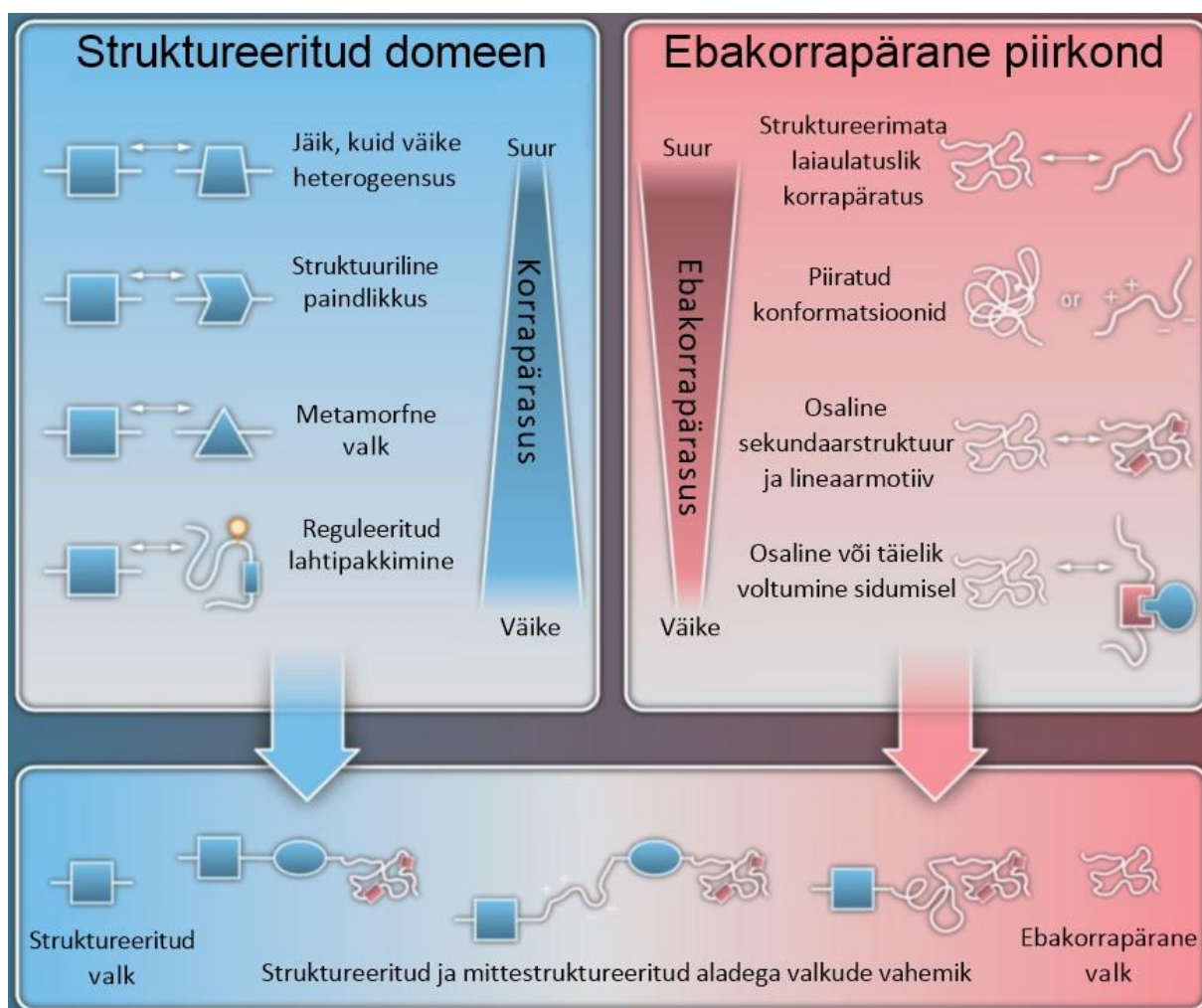
Joonis 1. *S. cerevisiae* Cdk kompleksid erinevates rakutsükli faasides. Tsküliinsõltuv kinaas ehk Cdk (*ingl cyclin-dependent kinase*) seondub rakutsükli eri etappides erinevate tsükliinidega. Tsükliinid; Cln1, Cln2, Cln3, Clb1, Clb2, Clb3, Clb4, Clb5, Clb6 (kohandatud Lodish et al., 2008).

1.4 Substraadi spetsiifika

Aastate jooksul on tehtud mitmeid teadusuuringuid, mis näitavad, et tsükliin-Cdk-d tunnevad oma substraadid ära mitme erineva mehhanismi abil. Substraadi äratundmise esimeseks oluliseks aspektiks on substraadi fosforüülimissaidi aminohappelise järjestuse komplementaarsus kinaasi aktiivse saidiga (Beaudette et al., 1993). Substraatvalkudes fosforüülimissaidid asetsevad sageli vähe konserveerunud, ebakorrapärastes piirkondades ehk IDR-ides (*intrinsically disordered regions*) (Holt et al., 2009). CDK substraadi spetsiifilisuse teiseks oluliseks aspektiks on selle võime siduda tsükliini substraadil olevate seondumiskohtade abil. Näiteks imetajates leiduvatel E-, A- ja B-tüüpi tsükliinidel on hüdrofoobne piirkond (HP), mis asub umbes 40Å kaugusel Cdk aktiiv saidist ja sisaldab Met-Arg-Ala-Ile-Leu (MRAIL) järjestust (Schulman et al., 1998). See ala on konserveerunud paljude imetajate ja pärmide tsükliinide seas (Schulman et al., 1998). Tsükliinide hüdrofoobne piirkond interakteerub substraatidel olevate RxL motiiviga (Chen et al., 1996; Saha et al., 1997). Uuringud näitavad, et tehes tsükliini HP alasse mutatsioone, kaotab HP oma funktsiooni *in vivo* ja väheneb ensüümi aktiivsus RxL sisaldavate substraatide vastu *in vitro* (Schulman et al., 1998; Loog ja Morgan, 2005). RxL motiiv on ühine paljudele Cdk substraatidele ja inhibiitoritele. RxL-i seondumiskoha olemasolu suurendab tugevasti substraadi fosforüülimise efektiivsust, mis viitab sellele, et see seondumiskoht on oluline substraadi ja tsükliin-Cdk kompleksi vahelise afiinsuse suurendamiseks (Chen et al., 1996; Schulman et al., 1998; Wohlschlegel et al., 2001). Optimaalseid või suboptimaalseid fosforüülimiskohti sisaldavate peptiididega tehtud uuringutes on leitud, et C-terminaalselt paiknev RxL motiiv suurendab suboptimaalse fosforüülimissaidi katalüütilist efektiivsust, kuid seda tehes väheneb katalüütiline efektiivsus optimaalsetes fosforüülimissaitides (Stevenson-Lindert et al., 2003). Ühes uuringus kasutati RxL motiivi ja Cdk fosforüülimissaidi vahel erinevate pikkustega linkersubstraate, mille tulemuste põhjal võiks arvata, et substraadi fosforüülimise maksimeerimiseks peaksid mõlemad saidid olema samaaegselt seotud tsükliin Cdk-ga (Wohlschlegel et al., 2001). Hiljutised teadusuuringud pagaripärmi kohta näitavad, et ka G1 tsükliinidel on hüdrofoobsed piirkonnad, mis võimaldavad samuti kindlat piirkonda ära tunda substraatvalkudes – LLPP (Leu-Leu-Pro-Pro) motiivi (Kõivomägi et al., 2011a; Kõivomägi et al., 2011b).

1.5 Ebakorrapärased piirkonnad

Nagu eelnevalt mainitud asetsevad substraatvalkudes fosforülimissaidid sageli vähe konserveerunud piirkondades ehk IDR-ides (Holt et al., 2009). Neid alasid leidub valkudes suhteliselt palju, ning nende täpne roll on hetkel veel teadmata. Tõenäoliselt on nende piirkondade sisemine korrapäratus funktsioneerimiseks hädavajalik, kuna see võimaldab valku modifitseerida mitmete erinevate ensüümidega, mis omakorda annab valgule paindlikkuse, mis on vajalik, et võimaldada kohanemist erinevate konformatsiooniliste nõuetega aktiivsaatides (joonis 2)(Lee et al., 2014).



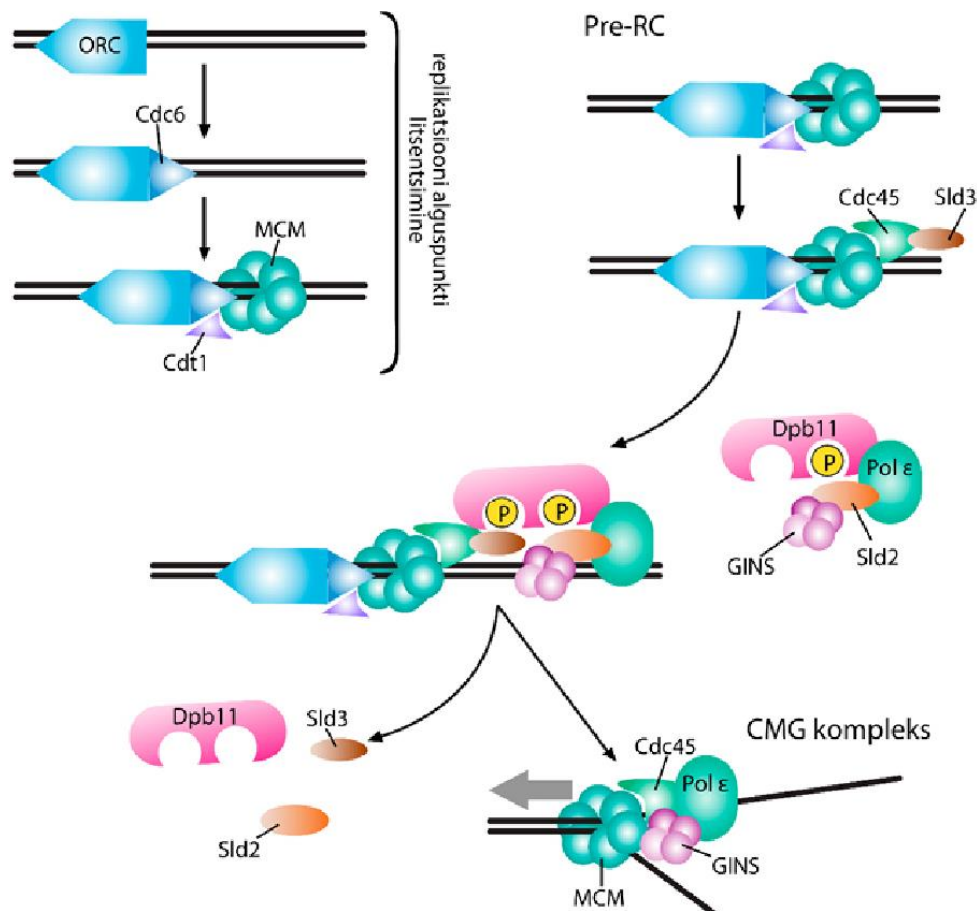
Joonis 2. Struktureeritud ja ebakorrapärased piirkonnad (IDR) tagavad valgu funktsiooni. Enamik valke eukarüootsetes proteoomides sisaldavad mõlemat tüüpi piirkondi. Ebakorrapäraste piirkondade ja struktureeritud domeenide kombineerimine suurendab valkude funktsionaalset mitmekülsust (kohandatud Lee et al., 2014).

Hetkel on näidatud, et IDR-id on olulised valk-valk interaktsioonidel, valkude lagundamisel ja ka posttranslatsiooniliste modifikatsioonide jaoks (Dunker et al., 2002; Brocca et al., 2009). Ehkki mõned neist piirkondadest sisaldavad äratuntavaid domeene ja saavutavad kindla struktuuri, kui seonduvad partneriga (Wright ja Dyson, 1999; Fong et al., 2009), puudub siiski enamikel IDR-idel ensümaatilise aktiivsuse ja ka konserveerunud alad, mis võtaksid korrapäraseid struktuure (Sigalov et al., 2007). Vaatamata nende korratute piirkondade tähtsusele, on veel praegu raske täpselt kindlaks teha, millised alad nendes piirkondades on olulised. Kuid teada on, et paljusid IDR-ide funktsioone vahendavad lühikesed lineaarsed motiivid (*short linear motifs* ehk SLiMs), mis on spetsiifilised, 2 kuni 10 aminohappe pikkused peptiidid, mis asetsevad IDR-ide sees ja puutuvad füüsiliselt kokku modifitseerivate ensüümide või seostuvate partneritega (Gould et al., 2009).

1.6 S-faas

Rakutsükli S-faasis toimub DNA replikatsioon ning selle tulemusena kahekordistatakse kogu rakutuumas leiduv DNA. DNA replikatsioon on vajalik osa rakkude jagunemisest, mille käigus tagatakse, et tütarakkudesse vajaminev DNA on replitseeritud. Replikatsioonil tuleb tagada, et kogu rakus olev DNA saaks küll kopeeritud, kuid et ühtegi osa DNA-st ei paljundataks rohkem, kui üks kord ühe S-faasi jooksul. Võtmesubstraatide fosforüülimine Cdk1 poolt on oluline DNA sünteesi algatamiseks ja sellega takistatakse ka juba replitseerunud DNA segmentidelt uue replikatsiooni käivitamist. G1/S-, S- ja M-Cdk-d on G1 faasis inaktiivsed, tagades, rakutsükli sündmuste mitte vallandumise enne, kui rakk on valmis järgmiseks rakutsükli etapiks. Suur roll rakutsükli alustamiseks on Cln3 valgul, mille kontsentratsioon on reguleeritud läbi rakuväliste toitainete tasemete ja rakusisese metabolismi (Newcomb et al., 2003). Kui tekivad soodsad tingimused rakutsükli alustamiseks, siis Cln3 kontsentratsioon tõuseb ja Cln3 moodustab kompleksi Cdk1-ga (Tyers et al., 1992). Cln3-Cdk1 kompleks omakorda aktiveerib G1/S faasi geenide ekspressiooni (Tyers et al., 1993). Algab stardi läbimine, mis sõltub G1/S tsükliinide (Cln1, Cln2) ja S tsükliinide (Clb5, Clb6) suurenenud ekspressioonist, mille tulemuseks on G1/S-Cdk ja S-Cdk komplekside moodustumine (Morgan, 2007). Sellel ajal kui S-Cdk on seondunud Sic1-ga, mis pärsib S-Cdk aktiivsust, toimub eelnevalt mainitud replikatsiooni alguspunkti litsentseerimine (Verma et al., 2001). Litsentseerimine algab

replikatsiooni alguspunkti äratundva kompleksi ehk ORC-i (ingl *origin recognition complex*) seondumisega DNA-le, misjärel tuuakse replikatsiooni alguspunktidele Cdc6 ja Cdt1 valkude vahendusel MCM (ingl *minichromosome maintenance protein complex*) kompleks, mille tulemusena tekib pre-replikatiivne kompleks (pre-RC) (joonis 3).



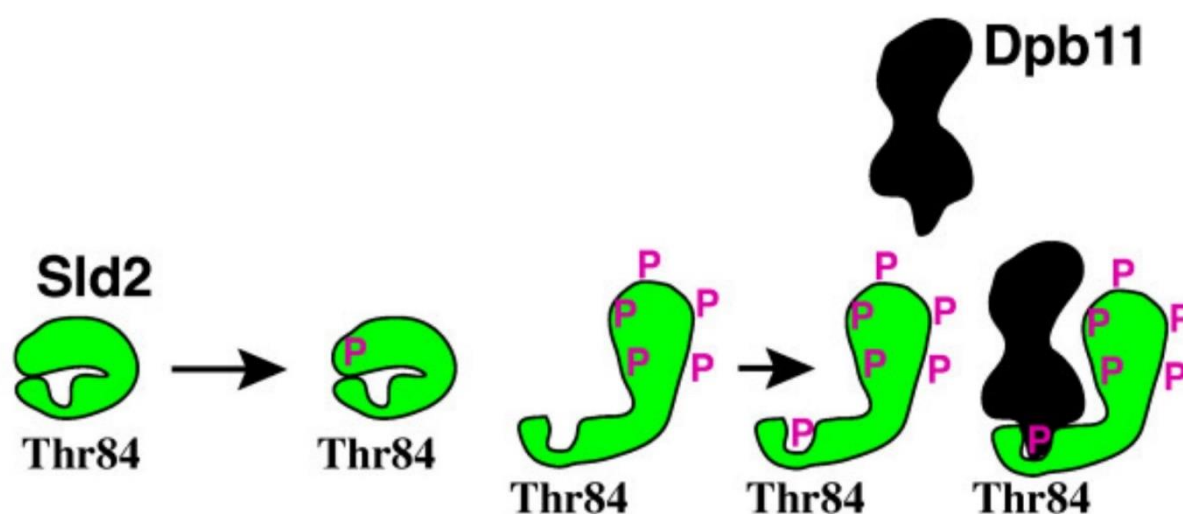
Joonis 3: Replikatsiooni initsiatsiooni graafiline selgitus. Replikatsiooni alguspunkti litsentsimine algab replikatsiooni alguspunkti äratundva kompleksi ehk ORC-i (ingl *origin recognition complex*) seondumisega DNA-le. Seejärel tuuakse ORC-idele MCM kompleks, tekib pre-replikatiivne kompleks (pre-RC). Seejärel seonduvad Cdc45 ja Sld3. Varasemalt moodustunud kompleks GINS ja Pole seondub Sld2-Dpb11 kompleksiga seejärel Dpb11 seondub pre-RC-ga, Dpb11, Sld3 ja Sld2 lahkuvad; tekib CMG kompleks (Kristjuhan et al., 2018).

Järgmisena toimub kiire Sic1 fosforüülimine, kuna G1/S-CDK komplekside hulk tõuseb tugevasti. See omakorda põhjustab Sic1 degradeerumise (Nishizawa et al., 1998). Seejärel käivitavad aktiveeritud Clb5,6-Cdk1 kompleksid DNA replikatsiooni. Clb5 peamised sihtmärgid on Sld2, Cdc6, Orc6, Mcm3 ja Cdh1, mis on seotud varajase S-faasi sündmustega (Loog & Morgan, 2005). On näidatud, et Clb5 kõrge spetsiifilisus sõltub hüdrofoobsest piirkonnast ja substraadi RxL motiivist (Loog & Morgan, 2005).

Clb5,6-Cdk1 kompleksid indutseerivad DNA replikatsiooni Sld2 ja Sld3 fosforüülimisega (Tanaka et al., 2007). Sld2 fosforüülimine soodustab eellaadimiskompleksi (pre-LC) moodustumist, mis koosneb Sld2, Dpb11, GINS ja Polε-st (Muramatsu et al., 2010). GINS ja Polε moodustavad kogu rakutsükli jooksul alamkompleksi, mis seostub Sld2-Dpb11-ga kui Sld2 fosforüülitakse Cdk1 poolt (Muramatsu et al., 2010). Sld2 fosforüülimine suurendab afiinsust Dpb11 suhtes ja on DNA replikatsiooniks hädavajalik (Masumoto et al., 2002). Dpb11, Sld2 ja Sld3 vastasmõju on vajalik ja piisav DNA replikatsiooni algatamiseks, ehkki täpne molekulaarne mehhanism jääb ebaselgeks (Tanaka et al., 2007). Arvatakse, et pre-LC-s olevaid GINS komplekse värvatakse Cdc45-MCM-GINS (CMG) kompleksi moodustamiseks replikatsiooni alguspunktidesse ja seda tehakse läbi pre-LC-s oleva Dpb11 kaudu (Araki, 2010a). Dpb11-l on kaks paari järjestikku asuvat BRCT domeeni (BRCA1 C-terminaalne ots), mis on teadaolevalt fosfopeptiidi siduvad domeenid (Glover et al., 2004). BRCT domeenide C-terminaalne osa interakteerub Sld2-ga, samal ajal N-terminaalne osa seondub eelistatult Sld3-ga (Tak et al., 2006). Replikatsiooni alguspunktides olev fosforüülitatud Sld3 seondub Dpb11-ga ja tekib CMG kompleks (Tanaka et al., 2007). Seega toimib pre-LC GINS kompleksi kandjana pre-RC kompleksile, moodustades CMG kompleksi, mis tähistab aktiivset helikaasi, mis keerab DNA lahti, et alustada DNA replikatsiooni (Araki, 2010a). Kokkuvõtvalt on kirjeldatud protsess toodud joonisel 3.

1.7 Sld2 fosforüülimine

Pre-LC moodustumine sõltub Dpb11-ne ja fosforüülitud Sld2 seosest. Thr84 fosforüülimine on oluline Sld2 seondumiseks Dpb11-ga, kuid fosforüülimine Thr84-st nõuab eelnevat teiste saitide fosforüülimist tsükliin-Cdk kompleksi poolt (Tak et al., 2006). Mitme saidi fosforüülimine tekitab rakkudes signaali ülekande peenhäälestamiseks mitmeid võimalikke mehhanisme (Örd et al., 2019). Sld2 korral eelnev fosforüülimine tsükliin-Cdk poolt muudab tõenäoliselt Sld2 konformatsiooni nii, et Thr84 muutub kinaasidele kättesaadavaks (joonis 4) (Tak et al., 2006).



Joonis 4. Sld2 fosforüülimine. Mitmest saidist Sld2 fosforüülimine muudab valgukonformatsiooni, mille tõttu saab võimalikuks Thr84 fosforüülimine ja seeläbi seondumine Dpb11 valguga (Tanaka et al., 2007).

Varasemate teadustööde katsed näitavad, et Sld2 puhul mitme saidi fosforüülimine tekitab Cdk-le aktiivsuse künnise, mistõttu algab kromosomaalne DNA replikatsioon alati õigel ajal (Tak et al., 2006; Tanaka et al., 2007; Araki, 2010b). S-faasi ajal algab DNA replikatsioon erinevates replikatsiooni alguspunktides ja ka erinevatel aegadel; ja kui vaadata Sld2 fosforüülimiskõverat, siis see sobib väga hästi kokku replikatsiooni alguspunktide aktivatsiooniga (Araki, 2010a). Varakult aktiveeritud replikatsiooni alguspunkte seostatakse fosforüülitud Sld2-ga, kui Sld2 kontsentratsioon on madal. Hiljem aktiveeritud replikatsiooni alguspunktid, mis esinevad hilises S-faasis, vajavad kõrgemaid kontsentratsioone fosforüülitud Sld2-te, millest tekib ka ajaline erinevus (Araki, 2010a). Mitme saidi fosforüülimine tagab ka

kõrge läve Dpb11 ja Sld2 vaheliste komplekside moodustamiseks (Tak et al., 2006). Cdk aktiveerimine ja DNA replikatsiooni initsiatsioon muudab pre-RC replikatsioonijärgseks kompleksiks. See saavutatakse läbi aktiivsete Cdk-de, mis fosforüülivad pre-RC komponente ehk muudavad nad inaktiivseks. Seeläbi kaotavad pre-RC-d võimaluse uuesti aktiveeruda (Nguyen et al., 2001). Sld2 kõrge künnis The84 fosforüülimiseks on arvatavasti just sellejaoks mõeldud, et oleks tagatud kõikide pre-RC-de fosforüülitus. Sellega kindlustatakse replikatsiooni ühekordne algatamine. Matemaatiline modelleerimine just nagu kinnitaks selliseid mehhanisme ja tundub, et mitme saidiline fosforüülimine aitab kaasa replikatsiooni alguspunktide ühtsele aktiveerimisele, millega tagatakse S-faasi toimumine kindla aja jooksul (Brümmer et al., 2010).

2. Uurimus

2.1 Töö eesmärgid

Magistritöö eesmärki on:

1. Uurida pagaripärmi valgu Sld2 spetsiifilist fosforüülimist Clb5-Cdk1 kompleksi poolt. Täpsemalt, kuidas on tagatud valgu Sld2 väga spetsiifiline fosforüülimine S-faasi Clb5-Cdk1 kompleksi poolt.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud bakteritüved, söötmed ja lahused

Antud töös loodud Sld2 mutantide kloonimisel kasutati *Escherichia coli* tüve TURBO Competent (High Efficiency) (F' proA+B+ lacIq ΔlacZM15 / fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV galK16 galE15 R(zgb-210::Tn10)TetS endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB) 5), (New England BioLabs inc).

Valkude puhastamiseks kasutati *Escherichia coli* tüve Rosetta (F-ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE (CamR)), (Novagen). *E. coli* Rosetta (DE3) bakterirakke kasvatati 2xYT söötmes (Tabel 1).

Tabel 1. Kasutatud söötmed, lahused

Söötme/puhvri nimetus	Koostis
Luria Bertani (LB) vedelsööde	5 g/l pärmiekstrakt, 10 g/l trüptoon, 10 g/l NaCl
2xYT (Yeast Extract Tryptone) vedelsööde	10 g/l pärmiekstrakt, 16 g/l trüptoon, 5 g/l NaCl
LB tardsöötme	LB sööde millesse lisatud 15 g/l agarit
1xTAE	40mM Tris, 20mM äädikhape, 1mM EDTA-Na ₂ -sool
GST-lüüsipuhver	50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 600 mM NaCl, 1% TritonX 100, 5% glütserool, 2mM DTT
GST-puhver	50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, , 0,1% NP-40, 5% glütserool, 1mM DTT
Elueerimispuhver	50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 0,1% NP-40, 25 mM L-glutatioon, 5 % glütserool, 1mM DTT
1x jooksupuhver	25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS
6x Laemmli-SDS puhvriga	375 mM Tris-HCl (pH 6,8), 9% SDS, 50% glütserool, 0,03% broomfenoolsinine

2.2.2. DNA konstruktside valmistamine PCR-iga

Kasutati Q5-saidipõhist mutageneesi (New England Biolabs), mis võimaldab mutatsioonide sisseviimist PCR-reaktsiooni abil. PCR-id DNA mutantide ja trunkeeringute jaoks tehti Thermo Scientific *Phusion High-Fidelity* (HF) DNA polümeraasi ja oligonukleotiididega (tabel 4). PCR-i reaktsioonid viidi läbi mahus 50 µl. Vastavalt fragmendi pikkusele ja oligonukleotiidide sulamistemperatuuridele reguleeriti DNA sünteesiaega ja praimerite seondumiseks vajalikku kinnitustemperatuuri PCR-programmis. PCR-i reaktsiooni komponendid on toodud tabelis 2, programmi tsüklid tabelis 3 ning praimerid tabelis 4.

Tabel 2. PCR-i reaktsiooni komponendid ühe reaktsiooni kohta

Reaktsiooni komponent	Ruumala (µl)
5 x <i>Phusion green HF</i> puhver	10
Phusion™ High-Fidelity DNA polümeraas (1 U)	0,5
10 µM <i>Forward</i> ja <i>reverse</i> praimerite segu	5
märklaud DNA (100 ng/ul)	5
25 mM dNTP	0,5
MQ	33
Kokku	50

Tabel 3. PCR-i programm

Etapi jrk	Reaktsioon	Temperatuur (°C)	Aeg
1.	Algne denaturatsioon	98	5 min
2.	DNA denaturatsioon	98	20 sek
3.	Praimerite seondumine DNA-le	58-68	20 sek
4.	DNA süntees	72	30sek/1000bp
5.	PCRi produktide lõplik pikendamine	72	5 min

*Etappe 2 – 4 tehti 32 korda.

Tabel 4. Uurimistöös kasutatud praimerid

Praimeri nimetus	Forward praimer	Reverse praimer
Sld2ΔC50	GCG GCC GCA TCG TGA CTG ACT G	AGC AGC TCT TTT GGG AGC AGC TCT TAT GAA GGT ATC TTC CCT TGC TTG GC
Sld2ΔC100	GCG GCC GCA TCG TGA CTG ACT G	AAC CTT TCT TCT TTT GGG TCT CTT TCT TAT GAA GG
Sld2ΔC150	GCG GCC GCA TCG TGA CTG ACT G	ATC GTA ACC ATT CTC GCC TTC TTC TCC TTC
Sld2ΔC193	GCG GCC GCA TCG TGA CTG ACT G	TCT AAT GAG TGG AGA CGG ACT AAA TGA AGT TG
Sld2 mut1	GTT ATC GCT GCT GCT CGA GAC AAT GAT CCA GAA ACC GAG ACC	AGC AGC TCT TTT GGG AGC AGC TCT TAT GAA GGT ATC TTC CCT TGC TTG GC
Sld2 mut2	GTT ATC GAG GAG GAG CGA GAC AAT GAT CCA GAA ACC GAG ACC	CTC CTC TCT TTT GGG CTC CTC TCT TAT GAA GGT ATC TTC CCT TGC TTG GC
Sld2 mut3	AAT GCT GCT AGC CAA GCA AGG GAA GAT ACC TTC ATA AGA	AGC TGC TGC AGC TTG AAA TAT GTC CTT CAC AAC TTT TGG TCT AAT TAG TTC ATC

Seejärel puhastati PCR produktid geelist. Selleks laeti proovid 1% agarosgeelile, millele oli lisatud DNA visualiseerimiseks Atlas ClearSight DNA Stain (BioAtlas) ning elektroforeesiti 1xTAE puhvris (koostis Tabel 1). Elektroforeesil eraldatud DNA fragmendid visualiseeriti UV-valguses, lõigati geelist ning puhastati Favorprep GEL/PCR puhastuskomplektiga (Favorgen) vastavalt tootja protokollile.

Geelist puhastatud PCR-i produktid ligeeriti tsirkulaarseks. 20 µl ligatsioonisegu sisaldas 100ng PCR-produkti, 10U T4 polünukleotiidkinaasi (*PNK*) (Thermo Scientific™T4 *Polynucleotide Kinase*), 1 µl *FastDigest DpnI* (Thermo Scientific) restriктаasi, 2 µl 10 x T4 ligaasipuhvrit ja kuni 20 µl mahuni MQ vett. Proove inkubeeriti temperatuuril 37 ° C 30 minutit. Pärast inkubeerimist lisati 2 µl 50% polüetüleenglükooli (PEG) 4000 (Sigma) ja 5U T4 DNA ligaasi (Thermo Scientific). Seejärel inkubeeriti proove toatemperatuuril veel 10 minutit ja kasutati transformatsiooniks. Ligatsioonisegud transformeeriti *E. coli* tüve TURBO rakkudesse kuumaehmatuse (*heat shock*) meetodil (protokoll antud järgnevas 2.2.3. peatükis). Selektiivsöötme (LB tardsööde + 100µg/ml) üleskasvanud kolooniatest eraldati

plasmiidne DNA *Plasmid DNA Extraction Mini Kit*-i (Favorgen) abil. Konstrukte kontrolliti esmalt restriksioon analüüsiga ning seejärel sekveneerimisega Eesti Biokeskuse tuumiklaboris. Eelpool kirjeldatud meetodit kasutati kõikide mutantide ja trunkeeringute tegemiseks.

2.2.3. Plasmidi transformatsioon bakterirakkudesse

E. coli tüvede TURBO ja Rosetta (DE3) rakkudesse plasmidi transformeerimiseks kasutati Ervin Valgu poolt valmistatud kompetentseid rakke, mis olid hoiustatud $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. 1.5ml tsentrifuugituubi pipeteeriti Rosetta rakkude korral 20 ng plasmiidset DNA-d, Turbo rakkude puhul 10 μl mutageneesi reaktsiooni. Lahusele lisati 50 μl kompetentseid rakke ning suspensiooni hoiti 30 minutit jääl, misjärel tehti rakkudele kuumaehmatus $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Segu tõsteti 5 minutiks jääle, seejärel lisati 500 μl LB söödet ning inkubeeriti 60 minutit $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ loksutil. Rakkude kogumiseks tsentrifuugiti segu 2 minutit 6000 rpm. Rakusademelt eemaldati sööde nii, et järgi jäi umbes 200 μl LB söödet, milles rakusade lahustati ning plaaditi LB plaatidele, mis sisaldasid sobilikke antibiootikume selektsiooniks.

2.2.4. GST – märgisega Sld2 konstruktide puhastamine

Substraatide puhastamiseks transformeeriti pGEX-4T-1 (Sigma) vektorisse kioneeritud konstruktid *E. Coli* tüve Rosetta rakkudesse. Sld2 valkude ekspresseerimiseks kasvatati ekspressiooni plasmidi sisaldavat kultuuri Infors HT multitron loksutil 160 pööret minutis temperatuuril $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ühes liitris 2x YT söötmes (Tabel 1), kuhu oli lisatud 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampitsilliini ja 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ klooramfenikooli. Kui kultuuri optiline tihedus jõudis $\text{OD}_{600}=0,6$ siis temperatuur langetati $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ kraadini ja lisati kultuurile valgu ekspressiooni indutseerimiseks IPTG-d (isopropüül- β -D-tiogalaktopüranosiid) (Biosolve Chemicals) lõppkonsentratsioonini 1mM ning 16 tundi hiljem koguti rakud kokku tsentrifuugides 12 minutit 5000 rpm Sorvall LYNX 6000 (Thermo Scientific) tsentrifuugiga. Rakkude sade külmutati vedelas lämmastikus ning hoiustati $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Rakkude sade sulatati jääl ning lahustati 15 ml GST-lüüsipuhvris (Tabel 1), millesse oli lisatud 1 mg/ml lüsotsüümi (Sigma) ja 2 mM ditiotreitooli (DTT) ning proteaaside inhibiitorid (1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatiin A, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotiniin). Rakkude lüüsimiseks hoiti rakkude suspensioon $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures 20 minutit pöörleval (*end-over-end*) segajal, misjärel lüsaat sonikeeriti 3 korda 40 sekundit 60% võimsuse juures Bandelin Sonoplus HD 2070

ultraheligenaatoriga, jahutades sonikeerimiste vahel lüsaati 5 minutit jääl. Järgnevalt lüsaadid tsentrifuugiti 30 minutit 16 000 g 4 °C Eppendorf 5810R tsentrifuugiga. Samal ajal pipeteeriti 400 µl *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* (Sigma) graanulid Bio-Spin kromatograafiakolonnile (Biorad) ning pesti 4ml GST-lüüsipuhvriga. Tsentrifuugitud lüsaadist eraldati supernatant ning selles lahustati *Glutathione Sepharose* graanulid ning saadud suspensioon tõsteti 15 ml tsentrifuugituubi. GST-valgu seondumiseks keradega, hoiti lüsaati 4 °C juures 60 minutit pöörleval (*end-over-end*) segajal, misjärel kanti suspensioon kromatograafiakolonnile, lastes sellel läbi kolonni joosta. Ning kolonni pesti kõige pealt 16 ml GST-lüüsipuhvriga ning siis 4 ml GST puhvriga (Tabel 1). Valkude elueerimiseks suspendeeriti graanulid ülesse 400 µl elueerimispuhvril (Tabel 1) ning pärast viit minutit koguti eluaat. Kolonni elueeriti 400 µl kaupa 3 korda, eluaadid külmutati vedelas lämmastikus ja hoiustati -80°C juures.

2.2.5. *In vitro* GST-Sld2 valkude fosforüülimine

GST-Sld2 konstruktid kontsentratsioonid määrati, võrreldes valkude signaalide intensiivsusi Coomassie Brilliant Blue G250 (Applichem) värvilahusega (40% metanool, 7% äädikhape, 0,025% Coomassie Brilliant Blue G-250) värvitud SDS polüakrüülamiid (SDS-PAA) geelidel kalibreerimiskõveraga, mis saadi veise seerumi albumiini (BSA ehk Bovine Serum Albumin) (Thermo Scientific) teadaoleva kontsentratsiooniga proovide põhjal. Valkude fikseerimiseks loksutati SDS-PAA-geele 30 minutit puhvril, mis sisaldas 30% etanooli ja 30% äädikhapet. Geele loksutati vähemalt tund aega G250 värvilahuses ning pesti 2 tundi MQ veega, misjärel geelid skaneeriti ning valkude signaalide intensiivsused kvantifitseeriti programmiga ImageQuant TL (Amersham Biosciences). Substraatide fosforüülimist mõõdeti järgmises 20ul reaktsioonisegus: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 180 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 500 nM Cks1, 500 µM ATP, 0,1 µCi [γ -³²P]ATP, 200 µg insuliin, 400 nM substraatvalk. Sld2 substraatide fosforüleerimisel kasutati 5nM Clb5-Cdk1 ensüümi, mis oli puhastatud Ervin Valgu poolt.

GST-Sld2 konstruktidesse inkorporeeritud 32P signaali hindamiseks, valgud lahutati ja geelid kuivatati (protokoll antud järgnevas 2.2.6. peatükis), kasutati Storage Phosphor Screen (GE Healthcare). Geele eksponeeriti sel viisil 12 tundi. Peale seda signaalid detekteeriti Typhoon Trio (Amersham Biosciences) abil ja kvantifitseeriti programmiga ImageQuant TL (Amersham Biosciences). Kõiki kinaasikatseid korrati vähemalt kaks korda.

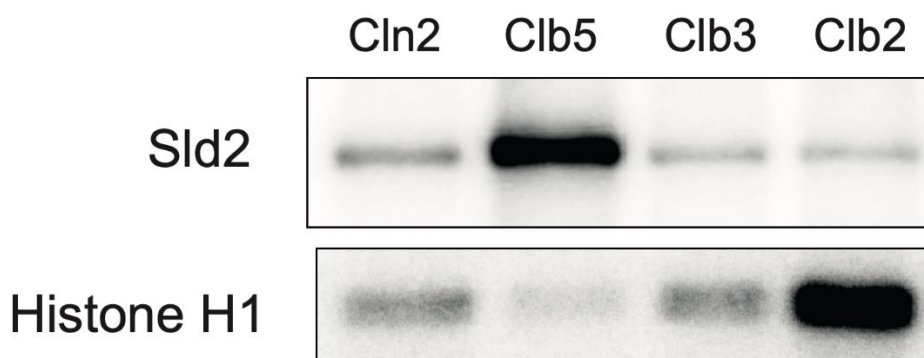
2.2.6. Valgu elektroforees ja geeli kuivatamine

10% SDS-polüakrüülamiidgeelis lahutati valgud 1 x SDS jooksupuhvris (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS) konstantsel voolutugevusel 15mA geeli kohta, 1.5 tundi kasutades selleks elektroforeesi seadet (*SE260 Mighty Small II Deluxe Mini Vertical Protein Electrophoresis Unit*) ja (*Amersham Pharmacia Biotech EPS 301*) vooluplokki. Kui valgud olid lahutatud, siis geelide värvimiseks asetati need CBB R-250 värvi, kuumutades lahust 60 kraadini ja seejärel loksutades geele 5 minutit. Seejärel geelid pesti, esmalt 40% metanooli ja 7% äädikhapet sisaldava lahusega ning seejärel MQ veega. Siis asetati geelid filterpaberile, kaeti kilega ja seejärel kuivatati 80 kraadi juures 30 minutit kasutades geelikuivatit GD-4543 (Scie-Plas).

2.3 Tulemused ja arutelu

On näidatud, et Cdc45-MCM-GINS (CMG) kompleksi moodustumine S-faasis peab olema reguleeritud, et tagada DNA lahti kerimine samal ajal kui toimub DNA süntees (Kamimura et al., 1998). Pagaripärmis on DNA replikatsiooni alustamiseks hädavajalik valk Sld2 (Masumoto et al., 2002). Sld2 koos Sld3 ja Dpb11 aitavad moodustada CMG kompleksi replikatsiooni alguspunktides S-faasi ajal, värvates sinna GINSi komplekse. Kogu protsess on fosforüülimisest sõltuv ja kontrollitud Cdk1 poolt (Tanaka et al., 2007).

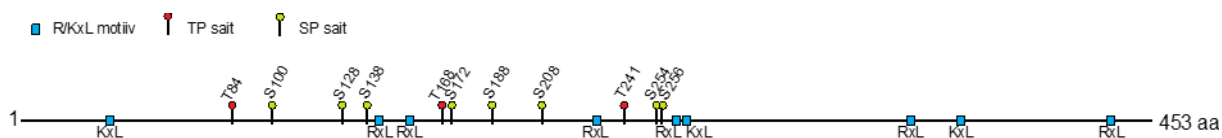
Varasemalt on meie uurimisgrupis kirjeldatud valke, mis saavad spetsiifiliselt fosforüleeritud erinevate tsükliin-Cdk1 kompleksi poolt (Loog ja Morgan, 2005). Nende hulgast kerkis esile ka valk Sld2, mis *in vitro* kinaasikatsetes on väga spetsiifiliselt fosforüleeritud Clb5-Cdk1 kompleksi poolt (joonis 5).



Joonis 5. *Saccharomyces cerevisiae* valk Sld2 on spetsiifiliselt fosforüülitav Clb5-Cdk1 kompleksi poolt. *In vitro* kinaasikatse erinevate tsükliin-Cdk1 kompleksidega näitab, et Sld2 on tugevalt Clb5-Cdk1 spetsiifiline substraat. Histoon H1-te on kasutatud kinaasi aktiivsuse kontrollina, kuna histooni fosforüülimine ei sõltu tsükliini seondumisest vaid tugineb fosforüülimiskoha konsensusel (Loog ja Morgan, 2005). Cln2 - puhastatud Cln2/Cdk1 kompleks, Clb5 - puhastatud Clb5/Cdk1 kompleks, Clb3 - puhastatud Clb3/Cdk1 kompleks, Clb2 - puhastatud Clb2/Cdk1 kompleks, Sld2 - GST märgisega bakterist puhastatud valk Sld2.

Varasemalt avaldatud tulemustes on näidatud, et Clb5-Cdk1 kompleksi kõrge spetsiifilisus sõltub eelkõige hüdrofoobsest piirkonnast (HP), mida kasutatakse substraadi R/KxL motiiviga seondumiseks (Loog ja Morgan, 2005).

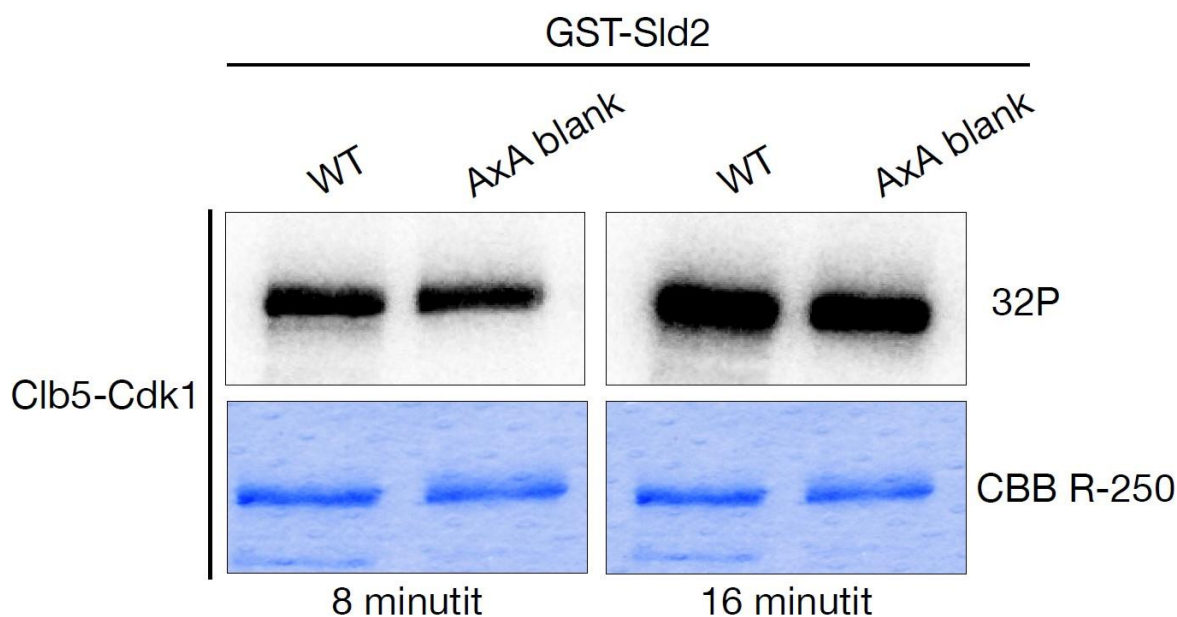
Sld2 aminohappelist järjestust vaadates leidsime, et selles sisaldub 9 KxL või RxL motiivi koos 11 võimaliku Cdk1 fosforüülimiskohaga (SP või TP) (joonis 6).



Joonis 6. Valk Sld2 sisaldab 9 KxL või RxL motiivi ja 11 võimaliku fosforüülimiskohta Cdk1 jaoks. KxL – motiiv, mis koosneb lüsiinist (K), juhuslikust aminohappest ja leutsiinist (L); RxL – motiiv, mis koosneb arginiinist (R), juhuslikust aminohappest ja leutsiinist (L); S – seriin, T – treoniin, P – proliin.

See viis meid mõttele, et eelpool mainitud spetsiifiline fosforüülimine võib olla seotud Sld2 valgus esinevate K/RxL motiividega. Kuna meil puudusid eelnevad teadmised sellest, kas spetsiifilise fosforüleerimise eest vastutavad kõik eelpool mainitud motiivid koos või on spetsiifilisuse eest vastutav ainult üks kindel motiiv üheksast, siis otsustasime muuta kõigis motiivides leiduvad lüsiinid (K), arginiinid (R) ja leutsiinid (L)alaniinideks (A). Varasemates töodes on näidatud, et K/RxL motiivi muutmine AxA motiiviks on piisav, et rikkuda motiivi seondumine Clb5 tsükliiniga selle pinnal leiduva HP kaudu (Ohtoshi ja Otoshi, 2001). Sellise mutandi nimetasime Sld2 AxA blank'iks.

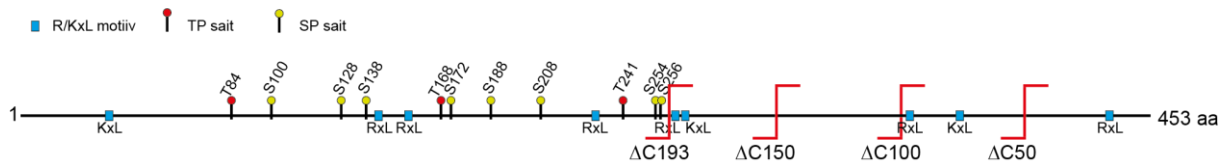
Võrdlemaks metsiktüüpi Sld2 ja mutantse Sld2 fosforüleerimist Clb5-Cdk1 kompleksi poolt viisime läbi puhastatud valkudega *in vitro* kinaasikatse (joonis 7).



Joonis 7. Sld2 spetsiifiline fosforüülimine Clb5 poolt ei sõltu RxL ja KxL motiivide olemasolust. *In vitro* kinaasikatses kasutati Clb5-Cdk1 kompleksi bakterist GST-märgisega puhastatud metsiktüüpi Sld2 ja Sld2 AxA blank fosforüleerimiseks. Proovid on võetud kinaasikatsesest kahel ajapunktil: 8 ja 16 minutit. WT – metsiktüüpi Sld2 valk; AxA blank – Sld2 valk, milles RxL ja KxL motiivid muudetud AxA motiivideks; 32P – autoradiograafia pilt; CBB R-250 – Coomassie brilliant blue R-250 värvinguga polüakrüülamiidgeel. Lõikamata geelid on toodud lisas 1.

Katse tulemusest on näha, et K/RxL motiivide eemaldamine Sld2 valgust ei vähenda selle fosforüülitust võrreldes metsiktüüpi valguga. Võib öelda, et Sld2 valgus leiduvad üheksa K/RxL motiivi ei ole vastutavad selle Clb5-Cdk1 spetsiifilise fosforüülimise eest.

Nüüd tekkis meil küsimus, kui fosforüülimise eest ei vastuta K/RxL motiivid, mis siis tagab kõrge spetsiifilisuse Clb5-Cdk1 suhtes? Tuginedes meie uurimisrühmas varasemalt tehtud töödele (Örd et al., 2020; Faustova ja Loog, 2021), võib väita, et kindlate tsükliin-Cdk1 komplekside spetsiifilises ära tundmises võivad osaleda erinevad, valkudes leiduvad, SLiM'id. Kuna vaadates Sld2 aminohappelist järjestust ei suutnud me leida ühtegi muud meile teada olevat motiivi peale K/RxL'ide, mis võiksid vahendada Clb5-Cdk1 spetsiifilist seondumist, siis otsustasime teha Sld2 valgu C-terminaalsed trunkeeringud (joonis 8).

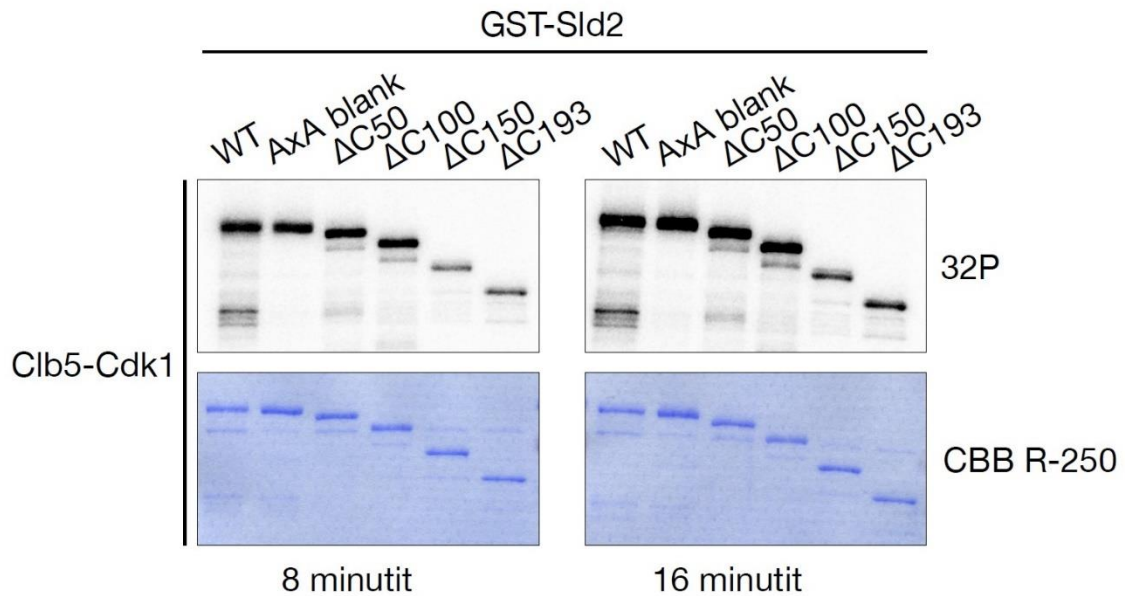


Joonis 8. Valku Sld2 tehtud 50 aminohappelised C-terminaalsed trunkeeringud. KxL – motiiv, mis koosneb lüsiinist (K), juhuslikust aminohappest ja leutsiinist (L); RxL – motiiv, mis koosneb arginiinist (R), juhuslikust aminohappest ja leutsiinist (L); S – seriin, T – treoniin, P – proliin; $\Delta C50$ – 50 aminohappeline trunkeering valgu C-terminusest; $\Delta C100$ – 100 aminohappeline trunkeering valgu C-terminusest; $\Delta C150$ – 150 aminohappeline trunkeering valgu C-terminusest; $\Delta C193$ – 193 aminohappeline trunkeering valgu C-terminusest.

Eemaldatava osa suuruseks valiti esmalt 193 aminohapet valgu C-terminusest ning trunkeeringu sammuks 50 aminohapet (aa). 193 aa selle pärast, et kui lühendada valku rohkem, siis oleks eemaldatud juba ka võimalikud Cdk1 fosforülimiskohad (vastavalt seriin positsioonis 254 ja troniin positsioonis 256). Kahe fosforülimiskoha kaotus oleks võinud anda eksliku tulemuse, vähendades Sld2 valgu fosforülitust kinaasikatses. Samuti tundus 50 aa suurune samm paras, et hiljem oleks lihtne efekti andnud piirkonda teha juba täpsemad trunkeeringud. Samuti jäävad kirjeldatud SLiM'id enamasti 5-15 aa pikkuseks (Gould et al., 2009). N-terminaalset osa otsustati esmalt mitte trunkeerida.

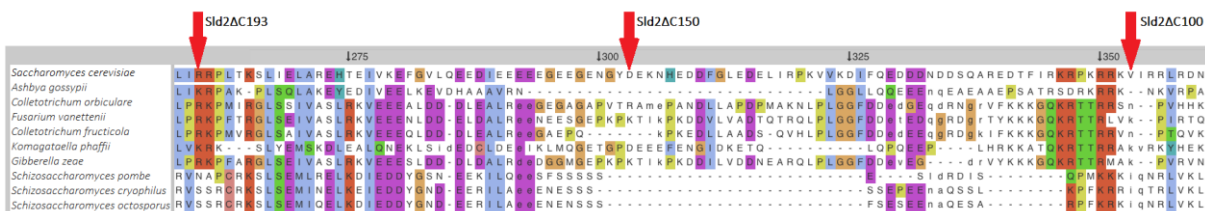
Uurides nende trunkeeringute fosforülimist Clb5-Cdk1 kompleksi poolt *in vitro* kinaasikatses, on näha Sld2 fosforülimise märgatavat langust peale 150 C-terminaalse aa eemaldamist (joonis 9).

Edasine trunkeerimine efekti enam ei suurendanud. Kuna me eelnevalt kontrollisime RxL ja KxL motiivide mõju Sld2 fosforülimisele ja näitasime, et need ei omanud efekti fosforülimisele, peab järelikult olema mingi muu motiiv kahe trunkeeringu vahel (vastavalt siis $\Delta C100$ ja $\Delta C150$), mis tekitab Clb5-Cdk1 kompleksile spetsiifilisuse Sld2 suhtes.



Joonis 9. GST-Sld2 Δ C150 trunkeeringus on Clb5-Cdk1 kompleksi spetsiifilisust tagav motiiv. *In vitro* kinaasikatses kasutati Clb5-Cdk1 kompleksi bakterist GST-märgisega puhastatud metsiktüüpi Sld2 ja Sld2 trunkeeringute fosforüülimiseks. Proovid on võetud kinaasikatsesest kahel ajapunktil: 8 ja 16 minutit. WT – metsiktüüpi Sld2 valk; Δ C50 – 50 aminohappeline trunkeering Sld2 valgu C-terminusest; Δ C100 – 100 aminohappeline trunkeering Sld2 valgu C-terminusest; Δ C150 – 150 aminohappeline trunkeering Sld2 valgu C-terminusest; Δ C193 – 193 aminohappeline trunkeering Sld2 valgu C-terminusest. 32P – autoradiograafia pilt; CBB R-250 – Coomassie brilliant blue R-250 värvinguga polüakrüülamiidgeel. Lõikamata geelid on toodud lisas 2. Veapiirid näitavad keskväärtuse 95% usaldusintervalle.

Selleks, et teada saada, millise motiiviga võib tegemist olla, oli järgmiseks sammuks *S.cerevisiae* Sld2 valgujärjestuse võrdlemine teiste seente (ingl *fungi*) Sld2 valkude järjestusega eesmärgiga leida konserveerunud piirkondi liikide vahel. Valgujärjestuse võrdlemiseks kasutasime veebipõhist ProViz (Protein Vizualisation) (<http://slim.icr.ac.uk/proviz/>) tarkvara, mis automaatselt valis välja kümme Sld2 valgu järjestust erinevatest seentest (joonis 10).



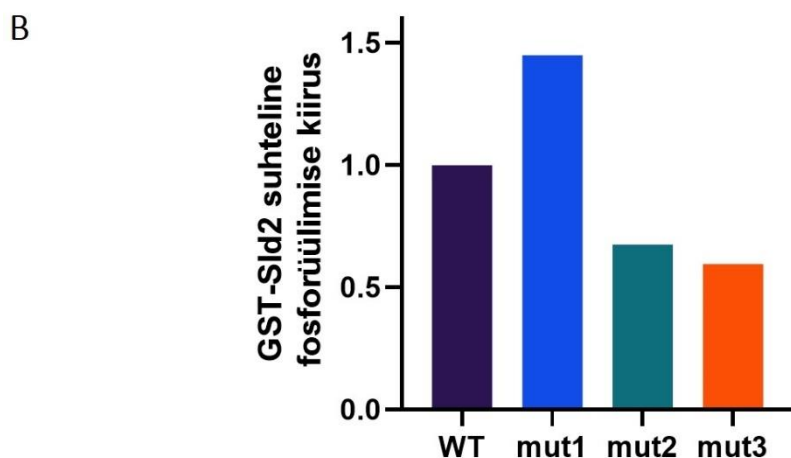
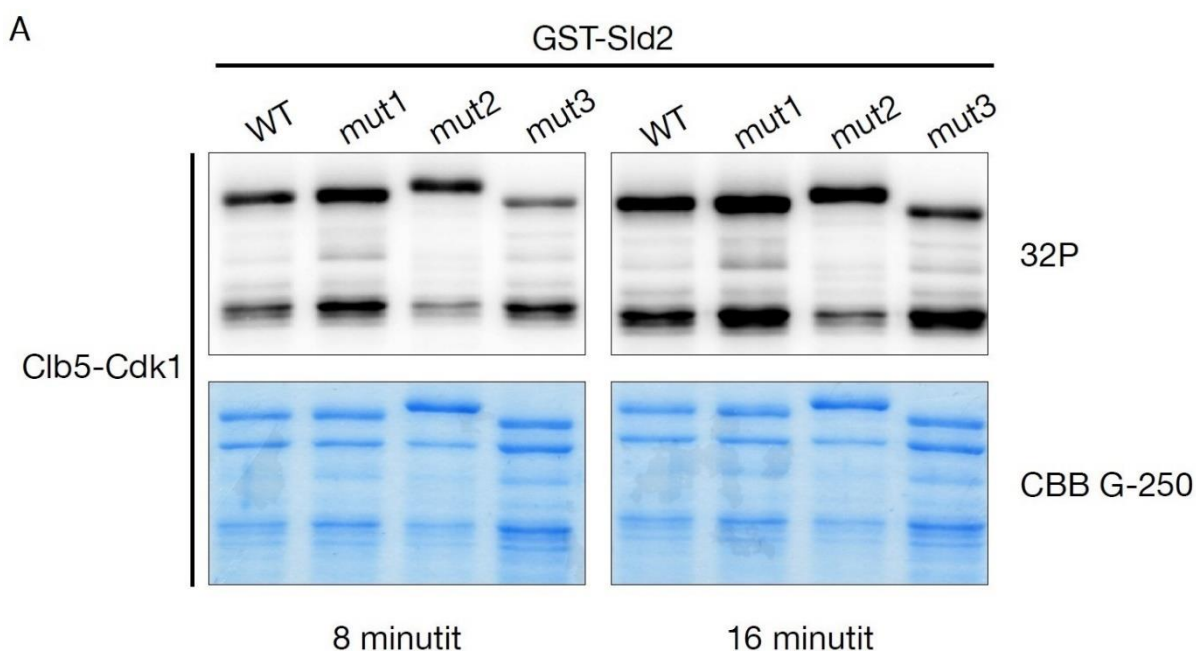
Joonis 10. *S.cerevisiae* Sld2 valgu järjestus teiste liikide Sld2 järjestustega joondatud. Punaste nooltega näidatud C-terminaalsed trunkeringud.

Joonduse tulemusena leidsime, et huvipakkuvasse piirkonda jäävad konserveerunud positiivselt laetud aminohapped: lüsiinid (K) ja arginiinid (R). Lisaks eelpool mainitutele on selles piirkonnas konserveerunud negatiivselt laetud aminohapped: glutamiinhape (E) ja asparagiinhape (D).

Võttes arvesse leitud konserveerunud piirkondi, alustasime piirkondade muteerimisega täispikas (1-453 aa) Sld2 valgus, et hinnata nende aminohapete rolli Clb5 tsükliinil seondumisel. Esimese mutatsiooniga vahetasime positiivselt laetud aminohapped neutraalseteks aminohapeteks ehk vahetasime konserveerunud alas K346, R347, K352, R355, R356 ja L357 alaniinideks. See tähistati Sld2 mut1. Teise mutatsioonina soovisime tugevamat muutust ja seetõttu vahetasime positiivsed aminohapped, negatiivseteks aminohapeteks ehk K346, R347, R351, K352, R355, R356 ja L357 muutsime glutamiinhapeteks. See tähistati nimega Sld2 mut2. Konserveerunud negatiivselt laetud aminohapped koos nende lähedusse jäävate negatiivselt laetud aminohapetega muutsime alaniinideks. Selle tulemuseks oli Sld2 mut3; E329, D330, D331, D332, D334 ja D335 muudetud alaniinideks.

Analüüsimaiks konserveerunud piirkondade mõju Sld2 spetsiifilisele fosforüülimisele Clb5-Cdk1 kompleksi poolt viisime läbi *in vitro* kinaasikatse, milles võrdlesime mutantide fosforüülimist metsiktüüpi Sld2 valgu fosforüülimisega (joonis 11). Tulemusest on näha, et positiivsete aminohapete asendamine alaniinidega (Sld2 mut1), ei vähenda mutandi fosforüülitust võrreldes metsiktüüpi Sld2 valguga. Võib isegi öelda, et fosforüülimine on natuke parem. Muutes aga samad aminohapped negatiivselt laetuteks (Sld2 mut2), fosforüülitus langes võrreldes metsiktüüpi Sld2 valguga. Sel korral tuleb võrrelda ka Sld2 valkude koguseid katses (Sld2 mut2 kogus suurem kui metsiktüüpi valgul). Sld2 mut3 korral,

kus negatiivsed aminohapped asendatialaniinidega on Clb5 poolne fosforüleeritus vähenenud.

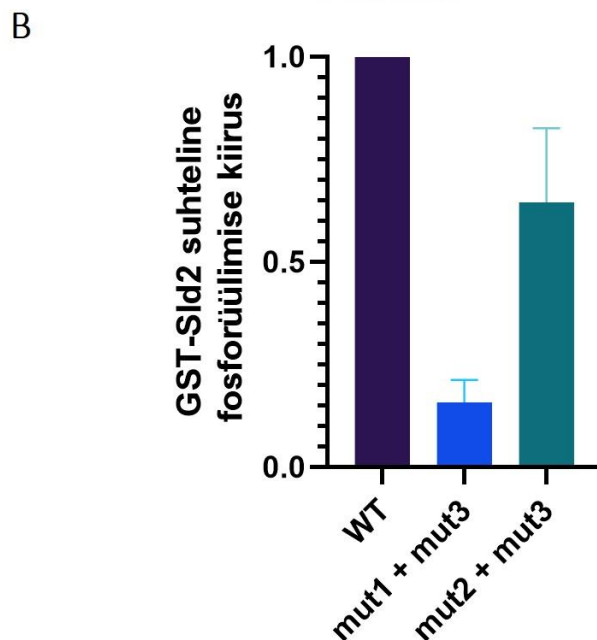
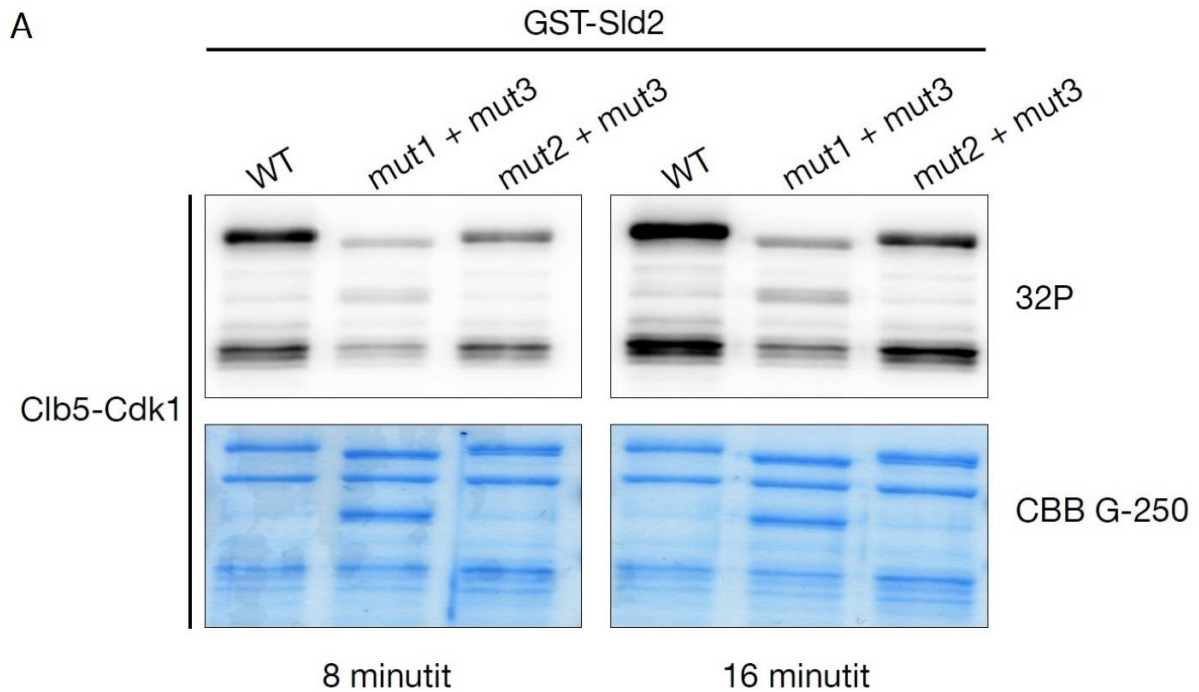


Joonis 11. Metsiktüüpi Sld2 valgu fosforülimine võrreldes mutantidega.

(A) Autoradiograaf, mis näitab Sld2 mutantsete valkude fosforülimist kahel erineval ajapunktil Clb5-Cdk1 kompleksi poolt *in vitro*. Autoradiograafide all on toodud CBB G-250 värviga värvitud 10% SDS geelid, millelt on näha et mut2 kontsentratsioon on kõrgem, kui teistel substraatidel. (B) Kahes sõltumatus *in vitro* kinaasikatsete fosforülimissignaalid kvantiseeriti ning on toodud graafikul Sld2 mut1, mut2 ja mut3 suhtelised fosforülimiskiirused võrreldes GST-Sld2 WT valguga. Mut2 intensiivsuse mõõtmisel on arvesse võetud kontsentratsioonide erinevust (mut2 1.5x rohkem kui WT). WT – metsiktüüpi Sld2 valk; mut1 – Sld2 valgu mutant: K346A, R347A, K352A, R355A, R356A ja L357A; mut2 – Sld2 valgu mutant: K346E, R347E, K352E, R355E, R356E ja L357E; mut3 – Sld2 valgu mutant: E329A, D330A, D331A, D332A, D334 ja D335A. Lõikamata geelid on toodud lisas 3.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et konserveerunud piirkondadest mängib olulist rolli Sld2 valgus fosforüülimisel negatiivsetest aminohapetest koosnev ala. Positiivsete aminohapete muutminealaniinideks ei muutnud fosforüülimist, küll aga nende asendamine negatiivsetega pärssis Sld2 valgus fosforüülimist. Seda võiks seletada sellega, et liiga palju negatiivseid laenguid koondus ühte Sld2 piirkonda. Nendele tulemustele tuginedes ei saa väita, milline on konkreetne motiiv, mis spetsiifika eest vastutab, või kas on tegemist ühe pikema motiivi kahe erineva osaga, mis spetsiifika eest vastutab, või kas on tegemist ühe pikema motiivi kahe erineva osaga, mis siis vastavalt seonduvad tsükliini pinnal olevatel positiivsetele ja negatiivsetele laengutele (aminohapetele) ning tagavad sellega kõrge spetsiifilisuse.

Lisaks eelpool mainitud mutatsioonidele otsustasime teha ka nendest kombinatsioonid. Kombineerides Sld2 valgus eelnevalt tehtud mutante mut1 (K346A/R347A/K352A/R355A/R356A/L357A) ja mut3 (E329A/D330A/D331A/D332A/D334/D335A) ning mut2 (K346E/R347E/K352E/R355E/R356E/L357E) ja mut3 võrldesime nende mutantide fosforüülimist metsiktüüpi valguga (joonis 12).

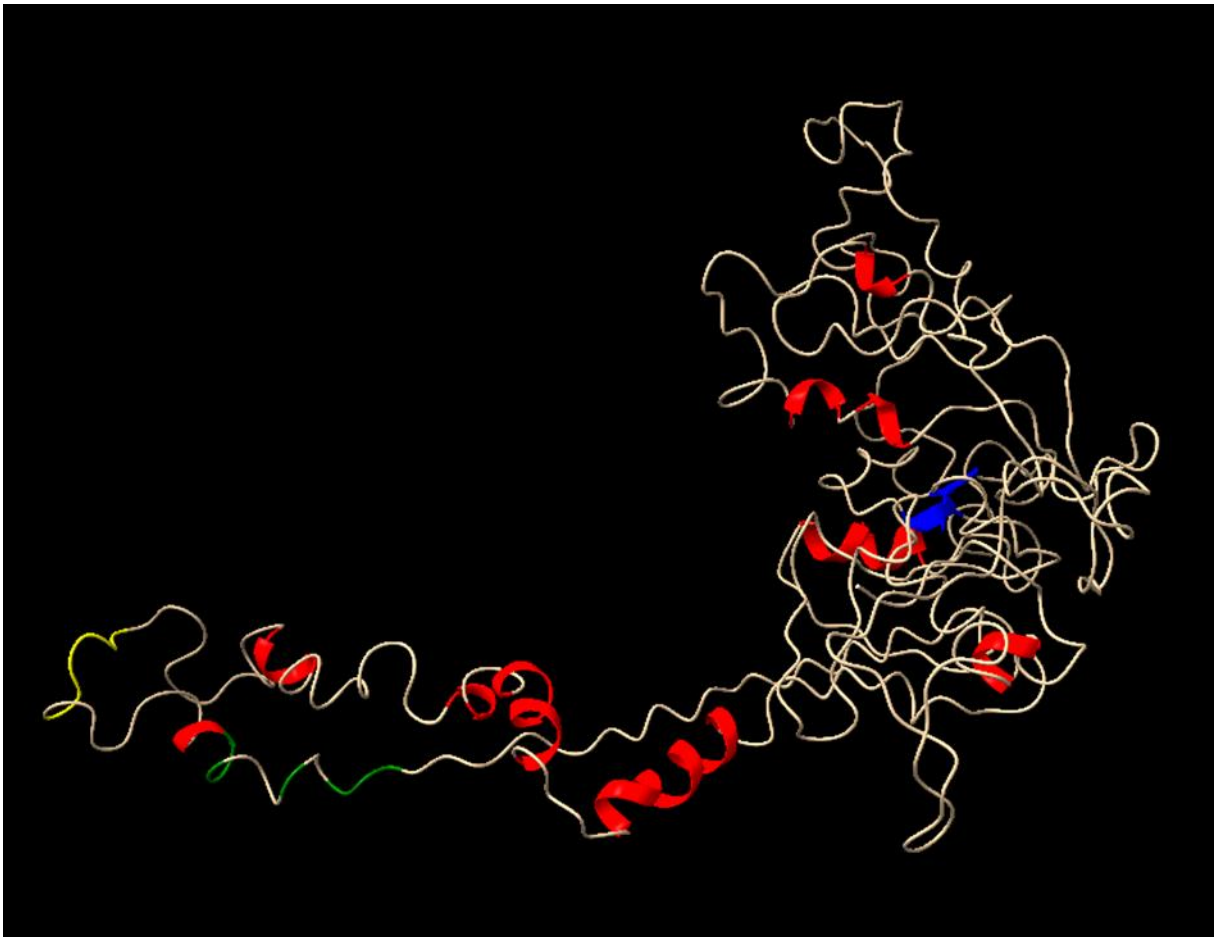


Joonis 12. Sld2 spetsiifiliseks fosforüülimiseks Clb5-Cdk1 poolt on vajalik positiivselt ja negatiivselt laetud aminohapete olemasolu Sld2 piirkonnas 303-353. (A) Autograaf, mis näitab Sld2 kombineeritud mutatsioonide fosforüülimist Clb5-Cdk1 kompleksi poolt *in vitro*. (B) Kolmes sõltumatus *in vitro* kinaasikatsete fosforüülimissignaali kvantiseeriti ning on toodud graafikul Sld2 mut1 + mut3 ja mut2 + mut3 suhtelised fosforüülimiskiirused võrreldes GST-Sld2 WT valguga. WT – metsiktüüpi Sld2 valk; mut1 + mut3 – Sld2 valgu mutant: mut1: K346A/R347A/K352A R355A/R356A/L357A ja mut3: E329A/D330A/D331A/D332A/D334/D335A kombineeritult; mut2 + mut3 – Sld2 valgu mutant: mut2 (K346E/R347E/K352E/ R355E/R356E/L357E) ja mut3 kombineeritult. Veapiirid näitavad keskvaertuse 95% usaldusintervalle Lõikamata geelid on toodud lisas 4.

Katse tulemustest on näha, et spetsiifiliseks fosforüülimiseks on vajalikud Sld2 valgus negatiivsed ja positiivsed aminohapped piirkonnas 303-353. Nende aminohapete muutmiselalaniinideks langeb Sld2 valgus fosforüülimine Clb5-Cdk1 kompleksi poolt oluliselt. Asendades aga konserveerunud positiivsed aminohapped negatiivsetega ja konserveerunud negatiivsed aminohapped alaniinidega, ei olnud efekt fosforüülimisele nii suur. Seda võib seletada ka sellega, et põhimõtteliselt liigutati lihtsalt Clb5 tsükliinile seondumiseks oluline negatiivselt laetud piirkond natukene C-terminuse poole, kuid seda ei eemaldatud, nagu esimeses kombinatsioonis. Lihtsalt kontekst ei ole täpselt sama nagu metsiktüüpi valgus ja see toob kaasa mõningase fosforüülimise languse.

S.cerevisiae S-faasi valk Sld2 kristallstruktuur on siiani teadmata. On tehtud paljuid hüpoteese, milline Sld2 valk võiks välja näha ja kuidas see töötama peaks. Nagu eelnevalt mainitud, arvatakse, et Clb5-Cdk1 kompleksi poolt fosforüülimine muudab valgus konformatsiooni ja fosforüülides valku mitmeid mitmeid kordi, muutub valgus struktuur (joonis 4) (Tanaka et al., 2007). Sellise valgus konformatsiooni muutmise eeldab valgus seda, et valk ei ole väga struktuurne, seetõttu vajab paljusid ebakorrapäraseid piirkondi.

Soov oli välja selgitada Sld2 valgus sekundaarstruktuuri ja vaadata kuhu asetsevad meie avastatud motiivid, et aru saada nende rollist. Kasutades programmi I-Tasser (<https://zhanglab.dcmf.med.umich.edu/I-TASSER/>) tegime Sld2 valgule sekundaarstruktuuri ennustuse (joonis 12).



Joonis 12. Ennustatud *S.cerevisiae* sekundaarstruktuur Sld2 valgust. Punasena märgitud alfa heeliksid, siniseks on värvitud beeta lehed, kollasena esitatud leitud negatiivne jada (mut3), rohelisena kujutatud leitud positiivne jada (mut1/mut2).

Sekundaarstruktuuri ennustusest märkame, et Sld2 on väga vähe struktuure. Alfa heelikseid ja beeta lehti leidub valgus minimaalselt. Mis vastaks justkui teooriale, et ebakorrapäraseid piirkonnad tagavad valgule elastsuse. Mida vähem kindlaid struktuure seda lihtsam on valku voltida. Kui vaatame, kus asuvad leitud Clb5-Cdk1 kompleksi seondumiskohad, märgitud joonisel kollase ja rohelisena, siis ka seondumismotiivid asuvad ebakorrapärastes piirkondades. Sellest võib järeldada, et nad on lihtsasti kättesaadavad Clb5-Cdk1 kompleksile. Selle alusel võib oletada, et see piirkond on Clb5 tsükliinile hästi kättesaadav ja kasutatav spetsiifiliseks seondumiseks.

Võttes kokku tulemused siiani, siis minu arust võib väita, et konserveerunud negatiivsed aminohapped Sld2 valgus piirkonnas 303-353 on vajalikud spetsiifiliseks fosforüülimiseks Clb5-cdk1 kompleksi poolt. Analüüsima peab ka konserveerunud positiivsete aminohapete rolli. Üksnes neidalaniinideks muutes, fosforüülimisele efekti ei olnud, küll oli aga alaninideks

asendamisel efekt koos Sld2 mut3'ga. Selle tulemuse põhjal võiks arvata, et positiivsetel laengutel võib olla tsükliinile seondumisel stabiliseeriv roll.

Kokkuvõte

Käesoleva magistr töö peamiseks eesmärgiks oli uurida Sld2 valku, mis esineb S-faasis ja on Clb5-Cdk1 kompleksi poolt mitmest saidist spetsiifiliselt fosforüülitav valk, millel on väga tähtis roll rakutsükli. Uurides Sld2 spetsiifilist fosforüülimist *in vitro* kinaasikatsetes avastasime, et K/RxL motiivid, mis asuvad tsükliin Clb5 sihtmärkvalkudes, ei taga S-Cdk1 kompleksi spetsiifilisust Sld2 suhtes. Sld2 valku C-terminaalsest otsast trunkeerides avastasime aminohappelise vahemiku, mille eemaldamise korral Clb5-Cdk1 kompleksi fosforüülimise spetsiifilisus kadus. Järjestades *Saccharomyces cerevisiae* Sld2 valku teiste liikidega leidsime konserveerunud positiivselt ja negatiivselt laetuid aminohappeid. Neid aminohappeid täispikas Sld2 valgus muteerides vähenes Clb5-Cdk1 fosforüülimisvõime Sld2 suunas. Leitud konserveerunud motiivid asuvad Sld2 valgu ebakorrapärasel piirkonnas, mille alusel võib oletada, et see piirkond on Clb5 tsükliinile hästi kättesaadav ja kasutatav spetsiifiliseks seondumiseks.

Antud töö on osa suuremast projektis, milles uuritakse Sld2 valgu spetsiifilist fosforüülimist pagaripärmi rakutsükli S-faasis Clb5-Cdk1 kompleksi poolt. Tulevikus on plaanis analüüsida, kuidas tehtud mutatsioonid mõjutavad pärmi rakutsükli *in vivo* tingimustes.

Specific phosphorylation of the yeast protein Sld2 by the Clb5-Cdk1 complex

Sven Sakson

Summary

The cell cycle of baker's yeast or *Saccharomyces cerevisiae* is highly regulated by a single cyclin-dependent kinase, or Cdk. Cdk forms various complexes with cyclins, each stage of the cell cycle has its own cyclins. The role of these cyclins is to ensure the course of a very fine-tuned cell cycle. The main task of the S-phase is to correctly duplicate genetic information. The cyclins that ensure S-phase passage are Clb5 and Clb6. Clb5 forms a complex with Cdk1 followed by phosphorylation of specific substrate proteins. One such protein that is phosphorylated is the Clb5-specific protein Sld2, which requires multiphosphorylation to play its role in CMG complex formation.

The aim of this master's thesis was to study the specific phosphorylation of the baker's yeast protein Sld2 by the Clb5-Cdk1 complex. In particular, how highly specific phosphorylation of the Sld2 protein by the S-phase Clb5-Cdk1 complex is ensured.

Studying the specific phosphorylation of Sld2 in an *in vitro* kinase assay, we found that R/L motifs located on substrates of cyclin-dependent kinases do not confer specificity of the S-Cdk complex. By making various mutations in the Sld2 protein, we found motifs that ensure the specificity of the Clb5-Cdk1 complex. We noted that the negatively and positively charged amino acid sequences on the surface of the substrate play a major role in the specificity of the Clb5-Cdk1 complex.

In the future, it is planned to look at this area in more detail and, if possible, to describe the motive that ensures specificity. At this point, we mutated Clb5 potential binding site for the Sld2 protein. Based on our previous work and existing Clb5 mutants, we plan to try to localize the region on the cyclin surface that is responsible for binding the region found in the Sld2 protein.

Kirjanduse ülevaade

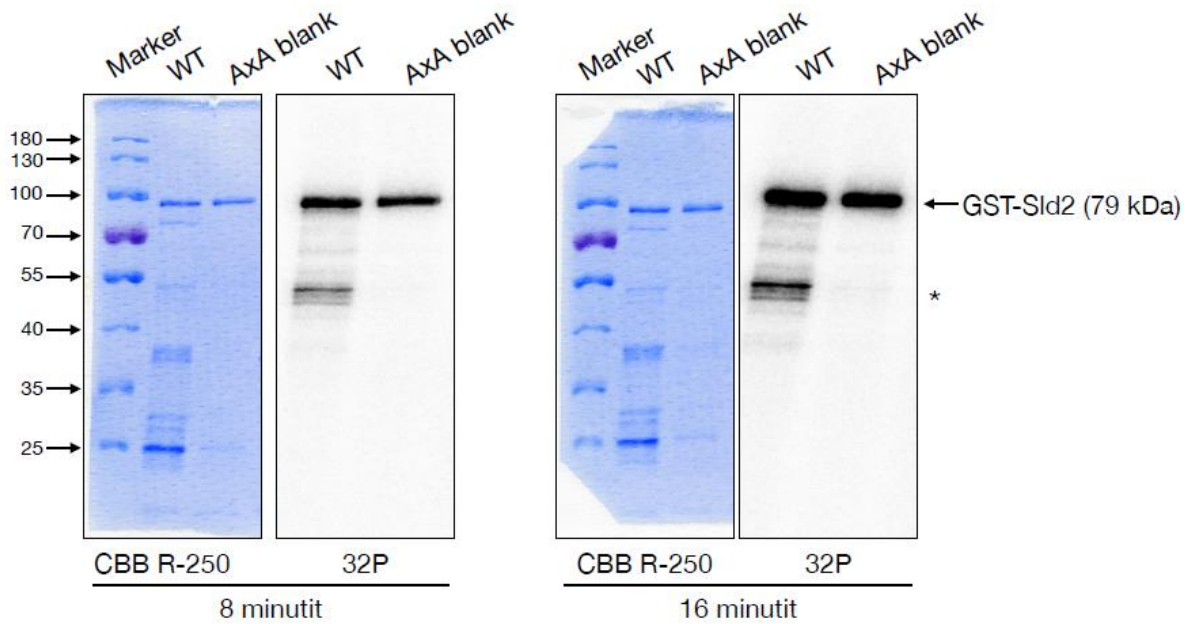
- Alamäe, T., Arend, A., Gerhold, J., Ingerpuu, S., Kisand, K., Kollist, H., Kuuse, S., Laanemets, K., Lavõgina, D., Loog, M., Lubenets, D., Kristjuhan, A., Kõivumägi, M., Maimets, T., Mikelsaar, A., Mazina, O., Padu, E., Paves, H., Peterson, P., ... Uibo, R. (2018). *Rakubioloogia* (M. Viikmaa & R. Sikut, Eds.). University of Tartu Press.
- Araki, H. (2010a). Cyclin-dependent kinase-dependent initiation of chromosomal DNA replication. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 22, Issue 6).
- Araki, H. (2010b). Regulatory mechanism of the initiation step of DNA replication by CDK in budding yeast. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1804, Issue 3).
- Beaudette, K. N., Lew, J., & Wang, J. H. (1993). Substrate specificity characterization of a cdc2-like protein kinase purified from bovine brain. *Journal of Biological Chemistry*, 268(28).
- Brocca, S., Šamalíková, M., Uversky, V. N., Lotti, M., Vanoni, M., Alberghina, L., & Grandori, R. (2009). Order propensity of an intrinsically disordered protein, the cyclin-dependent kinase inhibitor Sic1. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 76(3).
- Brümmer, A., Salazar, C., Zinzalla, V., Alberghina, L., & Höfer, T. (2010). Mathematical modelling of DNA replication reveals a trade-off between coherence of origin activation and robustness against rereplication. *PLoS Computational Biology*, 6(5).
- Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlacht, B. D., & Dutta, A. (1996). Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Molecular and Cellular Biology*, 16(9).
- Dunker, A. K., Brown, C. J., Lawson, J. D., Iakoucheva, L. M., & Obradović, Z. (2002). Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry*, 41(21).
- Enserink, J. M., & Kolodner, R. D. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. In *Cell Division* (Vol. 5).
- Faustova, I., & Loog, M. (2021). SLiMs in intrinsically disordered protein regions regulate the cell cycle dynamics of ORC1-CDC6 interaction and pre-replicative complex assembly. *Molecular Cell*, 81(9).
- Fong, J. H., Shoemaker, B. A., Garbuzynskiy, S. O., Lobanov, M. Y., Galzitskaya, O. v., & Panchenko, A. R. (2009). Intrinsic disorder in protein interactions: Insights from a comprehensive structural analysis. *PLoS Computational Biology*, 5(3).
- Glover, J. N. M., Williams, R. S., & Lee, M. S. (2004). Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: Tangled up in two. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 29, Issue 11).

- Gould, C. M., Diella, F., Via, A., Puntervoll, P., Gemünd, C., Chabanis-Davidson, S., Michael, S., Sayadi, A., Bryne, J. C., Chica, C., Seiler, M., Davey, N. E., Haslam, N., Weatheritt, R. J., Budd, A., Hughes, T., Paś, J., Rychlewski, L., Travé, G., ... Gibson, T. J. (2009). ELM: The status of the 2010 eukaryotic linear motif resource. *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL.1).
- Holt, L. J., Tuch, B. B., Villen, J., Johnson, A. D., Gygi, S. P., & Morgan, D. O. (2009). Global analysis of cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science*, 325(5948).
- Kamimura, Y., Masumoto, H., Sugino, A., & Araki, H. (1998). Sld2, Which Interacts with Dpb11 in *Saccharomyces cerevisiae*, Is Required for Chromosomal DNA Replication. *Molecular and Cellular Biology*, 18(10).
- Köivomägi, M., Valk, E., Venta, R., Iofik, A., Lepiku, M., Balog, E. R. M., Rubin, S. M., Morgan, D. O., & Loog, M. (2011b). Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature*, 480(7375).
- Köivomägi, M., Valk, E., Venta, R., Iofik, A., Lepiku, M., Morgan, D. O., & Loog, M. (2011a). Dynamics of Cdk1 Substrate Specificity during the Cell Cycle. *Molecular Cell*, 42(5).
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Bretscher, A., Ploegh, H., & Matsudaira, P. (2008). *Molecular Cell Biology 6th Edition* (6th ed.).
- Loog, M., & Morgan, D. O. (2005). Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature*, 434(7029).
- Masumoto, H., Muramatsu, S., Kamimura, Y., & Araki, H. (2002). S-Cdk-dependent phosphorylation of Sld2 essential for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Nature*, 415(6872).
- Mendenhall, M. D., & Hodge, A. E. (1998). Regulation of Cdc28 Cyclin-Dependent Protein Kinase Activity during the Cell Cycle of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4).
- Mendenhall, M. D., Jones, C. A., & Reed, S. I. (1987). Dual regulation of the yeast CDC28-p40 protein kinase complex: Cell cycle, pheromone, and nutrient limitation effects. *Cell*, 50(6).
- Morgan, D. (2007). *The cell cycle: Principles of control* (E. Lawrence, Ed.). Oxford university press.
- Muramatsu, S., Hirai, K., Tak, Y. S., Kamimura, Y., & Araki, H. (2010). CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol ϵ , and GINS in budding yeast. *Genes and Development*, 24(6).
- Newcomb, L. L., Diderich, J. A., Slattery, M. G., & Heideman, W. (2003). Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes. *Eukaryotic Cell*, 2(1).

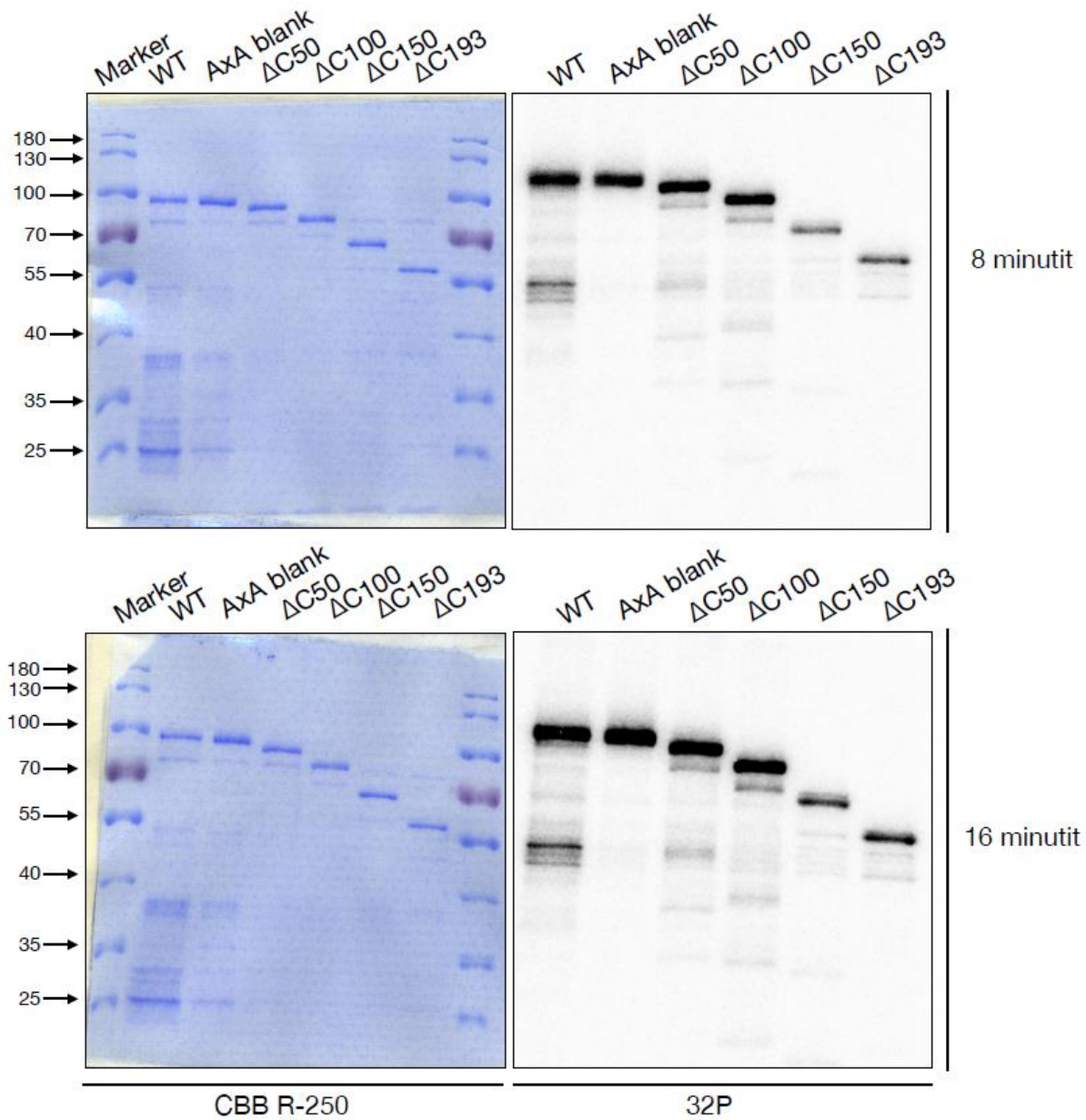
- Nguyen, V. Q., Co, C., & Li, J. J. (2001). Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature*, 411(6841).
- Nishizawa, M., Kawasumi, M., Fujino, M., & Toh-e, A. (1998). Phosphorylation of Sic1, a cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor, by Cdk including Pho85 kinase is required for its prompt degradation. *Molecular Biology of the Cell*, 9(9).
- Ohtoshi, A., & Ohtoshi, H. (2001). Analysis of β 3-endonexin mutants for their ability to interact with cyclin A. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(4).
- Örd, M., Möll, K., Agerova, A., Kivi, R., Faustova, I., Venta, R., Valk, E., & Loog, M. (2019). Multisite phosphorylation code of CDK. *Nature Structural and Molecular Biology*, 26(7).
- Örd, M., Puss, K. K., Kivi, R., Möll, K., Ojala, T., Borovko, I., Faustova, I., Venta, R., Valk, E., Kõivomägi, M., & Loog, M. (2020). Proline-Rich Motifs Control G2-CDK Target Phosphorylation and Priming an Anchoring Protein for Polo Kinase Localization. *Cell Reports*, 31(11).
- PATT, H. M., & QUASTLER, H. (1963). Radiation effects on cell renewal and related systems. *Physiological Reviews*, 43.
- Saha, P., Eichbaum, Q., Silberman, E. D., Mayer, B. J., & Dutta, A. (1997). p21CIP1 and Cdc25A: competition between an inhibitor and an activator of cyclin-dependent kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 17(8).
- Santamaría, D., Barrière, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Cáceres, J. F., Dubus, P., Malumbres, M., & Barbacid, M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, 448(7155).
- Schafer, K. A. (1998). The Cell Cycle: A Review. In *Veterinary Pathology* (Vol. 35, Issue 6).
- Schulman, B. A., Lindstrom, D. L., & Harlow, E. (1998). Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18).
- Sigalov, A. B., Zhuravleva, A. v., & Orekhov, V. Y. (2007). Binding of intrinsically disordered proteins is not necessarily accompanied by a structural transition to a folded form. *Biochimie*, 89(3).
- Stevenson-Lindert, L. M., Fowler, P., & Lew, J. (2003). Substrate specificity of CDK2-cyclin A: What is optimal? *Journal of Biological Chemistry*, 278(51).
- Tak, Y. S., Tanaka, Y., Endo, S., Kamimura, Y., & Araki, H. (2006). A CDK-catalysed regulatory phosphorylation for formation of the DNA replication complex Sld2-Dpb11. *EMBO Journal*, 25(9).
- Tanaka, S., Komeda, Y., Umemori, T., Kubota, Y., Takisawa, H., & Araki, H. (2013). Efficient Initiation of DNA Replication in Eukaryotes Requires Dpb11/TopBP1-GINS Interaction. *Molecular and Cellular Biology*, 33(13).

- Tanaka, Seiji, Tak, Y. S., & Araki, H. (2007). The role of CDK in the initiation step of DNA replication in eukaryotes. *Cell Division*, 2.
- Tanaka, Seiji, Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y., & Araki, H. (2007). CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature*, 445(7125).
- Tyers, M., Tokiwa, G., & Futcher, B. (1993). Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of cln1, cln2 and other cyclins. *EMBO Journal*, 12(5).
- Tyers, M., Tokiwa, G., Nash, R., & Futcher, B. (1992). The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO Journal*, 11(5).
- van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R. J., Daughdrill, G. W., Dunker, A. K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D. T., Kim, P. M., Kriwacki, R. W., Oldfield, C. J., Pappu, R. v., Tompa, P., Uversky, V. N., Wright, P. E., & Babu, M. M. (2014). Classification of intrinsically disordered regions and proteins. In *Chemical Reviews* (Vol. 114, Issue 13).
- Verma, R., McDonald, H., Yates, J. R., & Deshaies, R. J. (2001). Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk. *Molecular Cell*, 8(2).
- Wohlschlegel, J. A., Dwyer, B. T., Takeda, D. Y., & Dutta, A. (2001). Mutational Analysis of the Cy Motif from p21 Reveals Sequence Degeneracy and Specificity for Different Cyclin-Dependent Kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 21(15).
- Wright, P. E., & Dyson, H. J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: Re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of Molecular Biology*, 293(2).

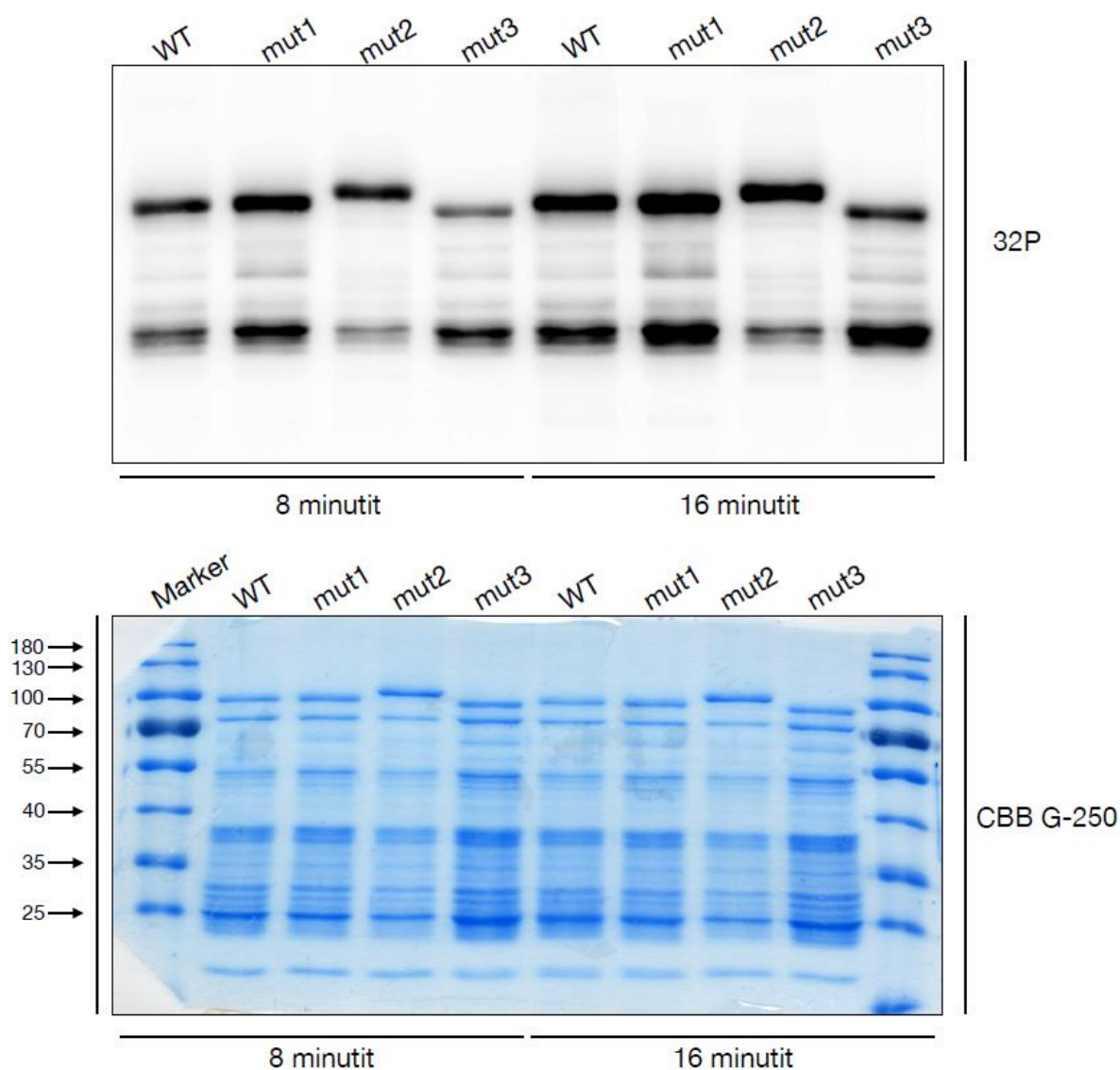
Lisad



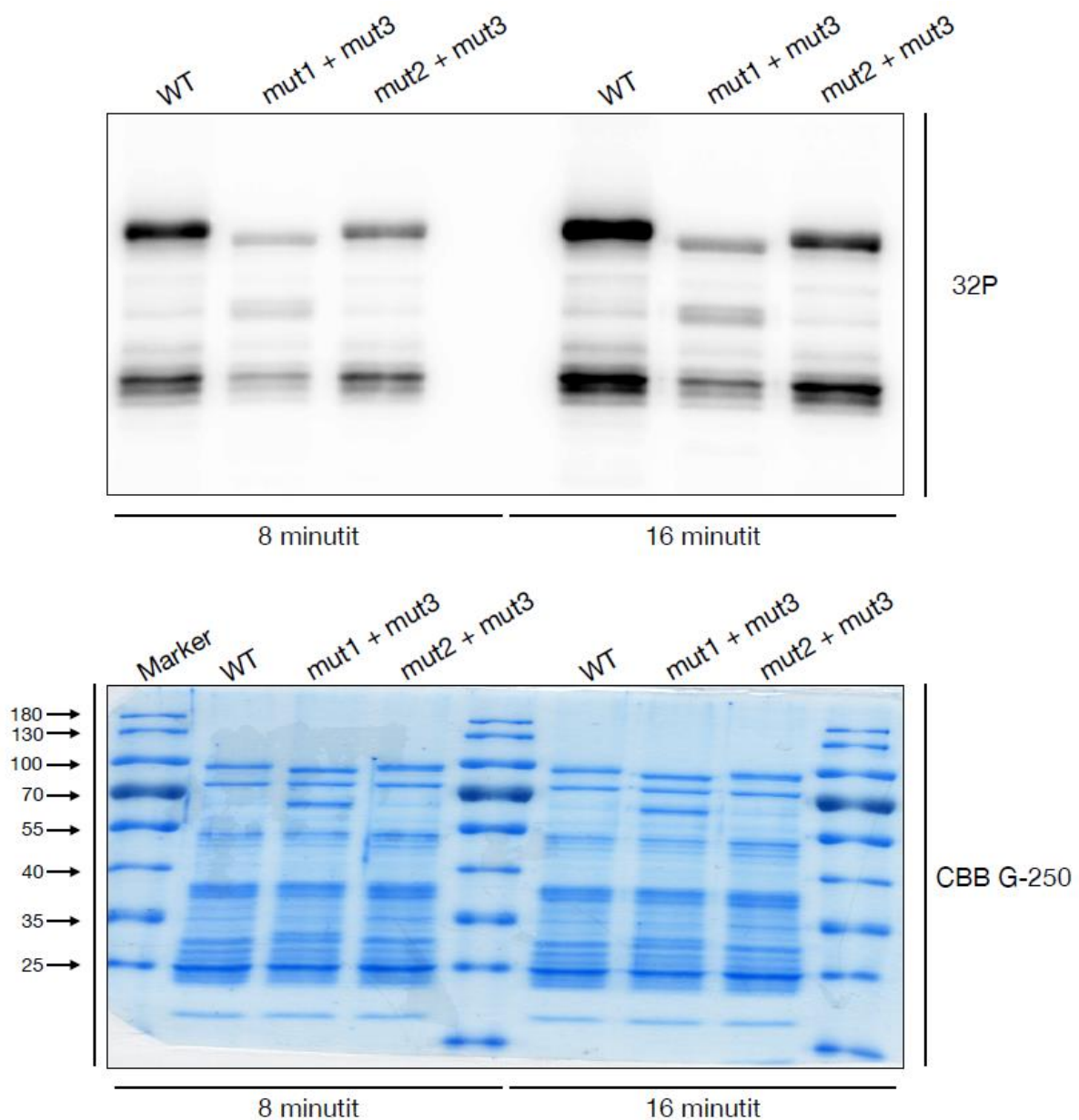
Lisa joonis 1. Sld2 spetsiifiline fosforüülimine Clb5 poolt ei sõltu RxL ja KxL motiivide olemasolust. WT – metsiktüüpi Sld2 valk; AxA blank – Sld2 valk, milles RxL ja AxA motiivid muudetud AxA motiivideks; 32P – autoradiograafia pilt; CBB R-250 – Coomassie brilliant blue R-250 värvinguga polüakrüülamiidgeel. Tärniga (*) tähistatud valgu degradatsioon.



Lisa joonis 2. GST-Sld2 Δ C150 trunkeeringus on Clb5-Cdk1 kompleksi spetsiifilisust tagav motiiv. Proovid on võetud kinaasikatsest kahel ajapunktil: 8 ja 16 minutit. WT – metsiktüüpi Sld2 valk (79kDa); Δ C50 – 50 aminohappeline trunkeering Sld2 valgu C-terminusest (74kDa); Δ C100 – 100 aminohappeline trunkeering Sld2 valgu C-terminusest (68kDa); Δ C150 – 150 aminohappeline trunkeering Sld2 valgu C-terminusest (63kDa); Δ C193 – 193 aminohappeline trunkeering Sld2 valgu C-terminusest (58kDa). 32P – autoradiograafia pilt; CBB R-250 – Coomassie brilliant blue R-250 värvinguga polüakrüülamiidgel.



Lisa joonis 3. Metsiktüüpi Sld2 valgu fosforüülimine võrreldes mutantidega. Proovid on võetud kinaasikatsest kahel ajapunktil: 8 ja 16 minutit. WT – metsiktüüpi Sld2 valk; mut1 – Sld2 valgu mutant: K346A, R347A, K352A, R355A, R356A ja L357A; mut2 – Sld2 valgu mutant: K346E, R347E, K352E, R355E, R356E ja L357E; mut3 – Sld2 valgu mutant: E329A, D330A, D331A, D332A, D334 ja D335A. 32P – autoradiograafia pilt; CBB G-250 – Coomassie brilliant blue G-250 värvinguga polüakrüülamiidgeel.



Lisa joonis 4. Sld2 spetsiifiliseks fosforülimiseks Clb5-Cdk1 poolt on vajalik positiivselt ja negatiivselt laetud aminohapete olemasolu Sld2 piirkonnas 303-353. Proovid on võetud kinaasikatsest kahel ajapunktil: 8 ja 16 minutit. WT – metsiktüüpi Sld2 valk; mut1 + mut3 – Sld2 valgu mutant: mut1: K346A/R347A/K352A R355A/R356A/L357A ja mut3: E329A/D330A/D331A/D332A/D334/D335A kombineeritult; mut2 + mut3 – Sld2 valgu mutant: mut2 (K346E/R347E/K352E/ R355E/R356E/L357E) ja mut3 kombineeritult. ³²P – autoradiograafia pilt; CBB G-250 – Coomassie briliant blue G-250 värvinguga polüakrüülamiidgeel.

Lihtlitsents

Mina, Sven Sakson,

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

Pagaripärmi valgu Sld2 spetsiifiline fosforüülimine Clb5-Cdk1 kompleksi poolt,

mille juhendaja on Ervin Valk,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **03.06.2024** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Sven Sakson

03.06.2021