

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

Tuuliki Ojala

**Clb3-Cdk1-spetsiifilise seondumismotiivi kirjeldamine ja olulisus
substraatvalgul Ypr174c**

Magistritöö

30 EAP

Juhendajad MSc Mihkel Örd
prof. Mart Loog

Tartu 2018

Infoleht

Clb3-Cdk1-spetsiifilise seondumismotiivi kirjeldamine ja olulisus substraatvalgul Ypr174c

Tsükliin-sõltuvad kinaasid reguleerivad eukarüootse rakutsükli progressiooni. Tsükliinid vahendavad interaktsioone tsükliin-CDK kompleksi ja substraatvalkude vahel, kuid on spekulatsioonid, et tsükliinid on üksteise suhtes reduntantsed. Siiski on näidatud, et varajased tsükliin-CDK kompleksid kasutavad spetsiifilisi seondumismotiive, et kompenseerida oma madalat aktiivsust. Lisaks on tuvastatud mitmed substraadid, mis fosforüleeritakse spetsiifiliselt individuaalsete tsükliin-CDK komplekside poolt. Käesolev töö näitab, et paralooigid Clb3 ja Clb4 on funktsionaalselt erinevad. Lisaks näidatakse, et Clb3-Cdk1 fosforüleerib käävi polaarkehale lokaliseeruvat valku Ypr174c *in vivo* ning vastav fosforüleerimine on sõltuv lühikesest lineaarsest konsensusjärjestusest PxxPx_F. Ypr174c fosforüleerimise täpsem funktsioon ei ole teada, kuid on võimalik, et Ypr174c fosforüleerimine reguleerib interaktsiooni Polo kinaasiga Cdc5.

Märksõnad : Cdk1, Clb3, Clb4, rakutsükkel, Ypr174c, Cdc5

CERCS kood : P310 (Proteiinid, ensüümid)

Mapping of Clb3-Cdk1 specific docking motif on substrate protein Ypr174c and analysis of Ypr174c phosphorylation

Cyclin-dependent kinases (CDKs) regulate progression through the eukaryotic cell cycle. Cyclins activate CDK and participate in substrate proteins recognition. It is proposed that most cyclins are redundant, however, it's been shown that early cyclin-CDK complexes use specific docking motifs to overcome their low activity and regulate specific processes. In addition, a variety of cyclin specific substrates have been found. Current thesis proposes that paralogues Clb3 and Clb4 are functionally different. Additionally, it was shown that spindle pole body associated protein Ypr174c is phosphorylated by Clb3-Cdk1 complex *in vivo* and the phosphorylation is dependent on a short linear motif with consensus sequence PxxPx_F. The exact role of Ypr174c is unknown, but it is proposed that Ypr174c phosphorylation regulates its binding to Polo kinase Cdc5.

Keywords : Cdk1, Clb3, Clb4, cell cycle, Ypr174c, Cdc5

CERCS code : P310 (Proteins, enzymology)

Sisukord

Infoleht	2
Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> rakutsükkel.....	7
1.2 Tsükliin-sõltuvad kinaasid	7
1.3 <i>S. cerevisiae</i> tsükliinid	10
1.3.1 G1-tsükliinid.....	11
1.3.2 B-tüüpi tsükliinid.....	12
1.3.3 S-faasi tsükliinid	12
1.3.4 M-faasi tsükliinid.....	13
1.4 Tsükliinide transkriptsiooniline regulatsioon	15
1.5 Tsükliin-CDK substraatide spetsiifiline fosforüleerimine	18
1.5.1 Kvantitatiivne mudel	18
1.5.2 Tsükliinide seondumismotiivid	19
2. Eksperimentaalne osa	21
2.1 Töö eesmärgid.....	21
2.2 Materjal ja metoodika	21
2.2.1 Kasutatud tüved ja söötmed.....	21
2.2.2 Oligonukleotiid-suunatud mutagenees	22
2.2.3 Kloneerimine PCR meetodil ja restriksiooniensüümide abil	22
2.2.4 <i>E. coli</i> transformatsioon.....	23
2.2.5 <i>S. cerevisiae</i> transformatsioon.....	23
2.2.6 Western Blot analüüs.....	25

2.2.7	GST-märgisega valkude puhastamine	26
2.2.8	<i>In vitro</i> kinaasikatse.....	27
2.2.9	Mikroskoopia.....	27
2.3	Tulemused.....	29
2.3.1	Tsükliinid Clb3 ja Clb4 on erineva substraadispetsiifilisusega.....	29
2.3.2	Clb3-Cdk1 aktiivsus Ypr174c suhtes on sõltuv PxP motiivist.....	31
2.3.3	Cdk1 fosforüleerib Ypr174c positsioonidel S158, S170 ja S175.....	32
2.3.4	Ypr174c fosforüleerimine <i>in vivo</i> ja selle mõju valgu tasemele	34
2.3.5	Ypr174c-GFP lokaliseerimine rakkudes	36
2.3.6	Ypr174c mõju Cdc5 tasemele <i>in vivo</i>	37
2.3.7	Ypr174c mõju rakutsükli ajastusele	39
2.3.8	Ypr174c mõju Clb2 tasemele	41
2.4	Arutelu	42
2.4.1	Tsükliin-substraat seondumismotiivid on olulised ka mitootilistel tsükliinidel	42
2.4.2	Ypr174c fosforüleerimine on vajalik valgu lokaliseerimiseks.....	43
2.4.3	Ypr174c mõjutab Cdc5 lokaliseerimist käävi polaarkehale	44
2.4.4	Clb3-Cdk1 ja Ypr174c osalevad CLB2 transkriptsiooni regulatsioonis.....	46
	Kokkuvõte	47
	Kirjanduse loetelu.....	49
	Lihtlitsents	60

Kasutatud lühendid

APC – i.k *anaphase promoting complex* (Anafaasi viiv kompleks)

BSA – i.k *bovine serum albumin* (Veise seerumi albumin)

CAK – i.k *CDK-activating kinase* (CDK-d aktiveeriv kinaas)

CDK – i.k *cyclin-dependent kinase* (Tsükliin-sõltuv kinaas)

CSM – i.k *complete supplement mixture* (Täissööde)

FEAR – i.k *Cdc14 Early Anaphase Release* (Varase anafaasi Cdc14 rada)

HPM – i.k *hydrophobic patch mutant* (Hüdrofoobse tasku mutant)

LB – Luria-Bertani

MEN – i.k *Mitotic Exit Network* (Mitoosist väljumise rada)

NLS – i.k *Nuclear Localization Sequence* (Tuuma lokalisatsiooni signaal)

SC – i.k *synthetic complete* (Süntetiline ehk miinimumsööde)

SPB – i.k *spindle pole body* (Käävi polaarkeha)

YPD – i.k *yeast extract peptone dextrose* (Pärmiekstrakt peptoon dekstroos)

Sissejuhatus

Tsükliin-sõltuvad kinaasid (CDK, i.k *cyclin-dependent kinase*) reguleerivad eukarüootse rakutsükli progressiooni. Pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* on peamine rakutsükli reguleeriv tsükliin-sõltuv kinaas Cdk1, mis seob üheksat erinevat tsükliini rakutsükli erinevates etappides. Arvatakse, et tsükliinide varieeruv ekspressioon tagab faasispetsiifiliste substraatide fosforüleerimise ja rakutsükli ühesuunalise kulgemise. Kuid tsükliinide deletsioonitüvede analüüsimise tagajärjel on leitud, et enamuse tsükliin on üksteise suhtes reduntantsed. Poolduva pärmi *Schizosaccharomyces pombe* puhul on näidatud, et CDK Cdc2 funktsioonide täitmiseks on piisav ainult üks tsükliin ning, et CDK aktiivsuse kvantitatiivsed muutused, mitte tsükliin-spetsiifilised interaktsioonid substraatidega on kesksed rakutsükli regulatsioonis. Kuid on leitud, et varajased tsükliin-CDK kompleksid kasutavad tsükliini-spetsiifilisi seondumismotiive substraatidel, et kompenseerida oma madalat aktiivsust. Lisaks on kirjeldatud tsükliini-spetsiifilised substraadid, näidates, et tsükliinide vahel on toimunud funktsionaalne eristumine.

G1- ja S-faasi tsükliin-CDK komplekside puhul on kirjeldatud nende substraatide äratundmiseks vajalikud motiivid ning on teada substraadid, mille fosforüleerimine on oluline nende komplekside funktsioonide täitmisel. G2-faasis ekspresseeruvate mitoetiliste tsükliinide Clb3 ja Clb4 kohta on teada üksikuid detaile, kuid seni ei ole kirjeldatud nende substraatide äratundmise mehhanisme.

Käesoleva magistritöö kirjanduse osas antakse ülevaade kinaasist Cdk1 ning tsükliin-CDK komplekside funktsioonidest rakutsükli regulatsioonis. Lisaks kirjeldatakse tsükliinide transkriptsiooni ning tsükliin-CDK komplekside substraadi spetsiifilisust.

Eksperimentaalse osa eesmärkideks on analüüsida Clb3-Cdk1 ja Clb4-Cdk1 substraatide fosforüleerimise tsükliin-spetsiifilisust ning näidata, et ka hilised tsükliin-CDK kompleksid on sõltuvad tsükliin-spetsiifilistest seondumismotiividest. Lisaks kirjeldada Clb3-spetsiifilist fosforüleerimist vahendav seondumismotiiv valgus Ypr174c ning analüüsida Ypr174c fosforüleerimise olulisust *S. cerevisiae* rakkudes.

Käesolev magistritöö on teostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* rakutsükkel

Saccharomyces cerevisiae rakutsükli puhul eristatakse nelja erinevat faasi – G1-, S-, G2- ja M-faas. Rakutsükli käigus toimub geneetilise informatsiooni ülekandmine ühest põlvkonnast teise, milleks on vajalik S-faasis toimuv täpne DNA replikatsioon ja tütarchromatiidide segregatsioon M-faasis ehk mitoosis. Neid eraldavates kasvufaasides G1 (i.k. *Gap 1*) ja G2 (i.k. *Gap 2*) toimub ettevalmistus vastavalt replikatsiooniks või segregatsiooniks, samuti on nendes faasides olulised kontrollpunktid, mis koordineerivad raku suurust rakutsükli progressiooniga (Cooper, 2000).

Ühest faasist teise üleminek on reguleeritud erinevate tsükliin-CDK (i.k. *cyclin-dependent kinase*) komplekside järjestikuse aktivatsiooni ja inaktivatsiooni kaudu.

1.2 Tsükliin-sõltuvad kinaasid

CDK-d ehk tsükliin-sõltuvad kinaasid on valgukinaasid, mis on aktiivsed vaid kompleksis tsükliiniga. CDK moodustab antud kompleksi katalüütilise subühiku, millel üksi puudub täielikult või on väike kinaasne aktiivsus (Mendenhall ja Hodge, 1998).

CDK-d on proliin-suunatud seriini-treoniini kinaasid ehk nad fosforüleerivad substraadil seriini- või treoniinijääki S/T-P (Ser/Thr-Pro) motiivides. Sageli on eelistatud S/T-P-X-K/R (Ser/Thr-Pro-suvaline aminohape-Lys/Arg) järjestus, kuid see ei kehti kõikide CDK-de puhul (Moreno ja Nurse, 1990; Suzuki *et al.*, 2015).

CDK-de peamiseks funktsiooniks on tagada rakutsükli ühesuunaline kulgemine. Lisaks on CDK-de osalust kirjeldatud protsessides nagu transkriptsioon, DNA kahjustuste reparatsioon, valkude proteolüüs, epigeneetiline regulatsioon, metabolism, spermatogenees jne (Lim ja Kaldis, 2013).

CDK struktuur kirjeldati esmalt inimese Cdk2 kristallstruktuuri baasil. Leiti, et Cdk2 struktuur on kahesagaraline, mille N-terminaalse sagara moodustavad peamiselt β -leht- ja C-terminaalse sagara α -heeliks-struktuurid (Joonis 1). ATP seondub nende sagarate vahele. N-terminuses on ka CDK-dele unikaalne C-heeliks, mis sisaldab konserveerunud PSTAIRE (Pro-Ser-Thr-Ala-Ile-Arg-Glu) järjestust, ja C-terminuses paikneb fosforüleerimisele tundlik kinaasi aktivatsioonijärjestus ehk T-ling (De Bondt *et al.*, 1993). T-ling on paljudes kinaasides autofosforüleeritud, kuid CDK-des fosforüleeritakse see CAK ehk CDK-d aktiveeriva kinaasi poolt (i.k. *CDK-activating kinase*)

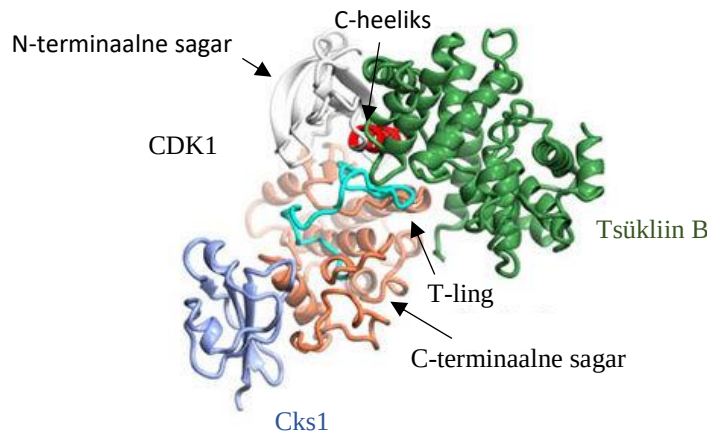
(Kaldis *et al.*, 1998). T-lingul paikneva treoniini fosforüleerimine on vajalik tsükliin-CDK kompleksi stabiliseerimiseks (Echalier *et al.*, 2010; Pavletich, 1999).

Arvatakse, et CDK ensümaatilise aktiivsuse puudumine ilma tsükliinita tuleneb sellest, et CDK N-terminaalne sagar paikneb C-terminaalse suhtes ebatäpselt ja olulised katalüütilised jäägid, mis on vajalikud fosfaadi ülekandmiseks, ei ole õigesti joondatud. Lisaks on substraadi seondumissait varjatud T-lingu poolt. (Mendenhall ja Hodge, 1998)

Tsükliin defineeritakse nende võime järgi siduda ja aktiveerida CDK-d, kuid lisaks sellele on nad äratuntavad konserveerunud tsükliini domääni (i.k *cyclin box*) järgi (Kobayashi *et al.*, 1992). See koosneb struktuursest motiivist (i.k *cyclin fold*), mille moodustavad viis α -heeliksit (Noble *et al.*, 1997).

Tsükliin-CDK komplekside struktuuri on analüüsitud inimese CDK1 ja CDK2 kristallstruktuuride abil (Brown *et al.*, 2015; Connell-Crowley *et al.*, 1993; Jeffrey *et al.*, 1995). Inimese tsükliin A-CDK2 kompleksi kristallstruktuuri baasil leiti, et CDK2 interaktsioon tsükliin A-ga põhjustab CDK2-s konformatsioonilised muutused, mis on eeldatavasti vastutavad kinaasi aktiivsuse tõusu eest (Connell-Crowley *et al.*, 1993; Jeffrey *et al.*, 1995). Nimelt seob tsükliini domään CDK2 C-heeliksit, põhjustades selle rotatsiooni ning ATP fosfaate siduvate aminohappejääkide reorientatsiooni, et tekiks aktiivne ATP-seondumissait. Lisaks eemaldab interaktsioon tsükliinidega CDK katalüütilisest saidist T-lingu, et T-lingul paiknev treoniin oleks fosforüleeritav CAK poolt. (Malumbres, 2014).

Rakutsükliit reguleerivate tsükliin-CDK kompleksi kuulub ka valk Cks (i.k *Cdc28 Kinase Subunit*). Pagaripärmi Cks1 puhul on näidatud, et Cks1 stabiliseerib tsükliin-CDK komplekse, mis on olulised G1-faasis (Reynard *et al.*, 2000). Lisaks on näidatud, et Cks1 interakteerub spetsiifiliste fosforüleeritud treoniinidega CDK substraatidel, et vahendada substraadi edasist fosforüleerimist CDK poolt (McGrath *et al.* 2013, Kõivomägi *et al.* 2013). (Joonis 1)



Joonis 1. Cdk1 struktuur. Cdk1-tsükliin B-Cks1 kompleksi mudel. Pildil on näidatud CDK1 N-terminaalne sagar (valge), C-terminaalne sagar (oranž), CDK1 aktivatsiooni järjestus ehk T-ling (tsüaansinine) ja tsükliin (roheline)- CDK interaktsiooniks vajalik C-heeliiks (punane). Lisaks tsükliin-CDK kompleksi stabiliseeriv valk Cks1 (jääsinine). Kohandatud (Brown *et al.*, 2015).

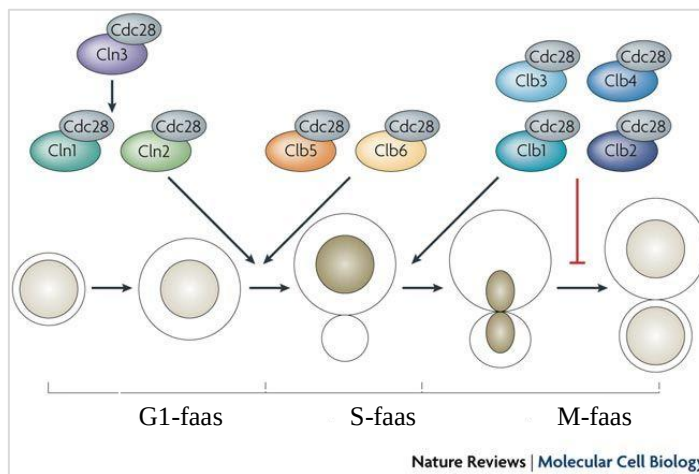
S. cerevisiae peamine rakutsükliit koordineeriv kinaas on Cdc28 (i.k. *cell division cycle*) ehk Cdk1. Cdk1 osaleb nii transkriptsiooni regulatsioonis, DNA ja käävi polaarse keha ehk SPB (i.k. *spindle pole body*) duplikatsioonil, pungumises, raku morfogeneesis, mitootilise käävi moodustamises ja paljudes teistes protsessides (Kellog 2003, Bloom 2007).

Lisaks kinaasile Cdk1 on *S.cerevisiae*’s tuvastatud veel viis CDK-d, millest üks – Pho85 – osaleb samuti osaliselt rakutsükli regulatsioonis, olles vajalik G1-S faasi üleminekul, juhul kui Cdk1 ei ole aktiivne (Huang *et al.*, 2009; Kung *et al.*, 2005). Cdk1 ja Pho85 kinaase aktiveerivad vastavalt üheksa ja kümme erinevat tsükliini, mis on reguleeritud rakutsüklist sõltuval viisil. Neli ülejäänud CDK-d (Kin28, Srb10, Bur1 ja Ctk1) reguleerivad mRNA sünteesi ning igaühete neist aktiveerib ainult üks spetsiifiline tsükliin (Malumbres, 2014).

Vaatamata CDK-de paljususele nii pagaripärmis kui ka inimeses, kust on leitud tervenisti 22 CDK-d (Liu ja Kipreos, 2000), on mõlemas organismis rakutsükli läbiviimiseks hädavajalik ainult üks CDK, milleks pagaripärmis on Cdk1 ning inimeses CDK1 (Santamaría *et al.*, 2007).

1.3 *S. cerevisiae* tsükliinid

Cdk1-l on tuvastatud üle 300 substraadi *in vivo* (Holt *et al.*, 2009). Cdk1 kinaasi aktiveerivad tsükliinid jaotatakse G1-tsükliinideks (Cln1-Cln3) ja B-tüüpi tsükliinideks (Clb1-Clb6). G1-tsükliinid reguleerivad sündmusi, mis toimuvad mitoosist S-faasini (kaasa arvatud). B-tüüpi tsükliinid on oma nime saanud tänu homoloogiale, mida nad omavad kõrgemate eukarüootide B-tsükliinidega. Neid ekspresseeritakse kolme järjestikuse lainena G1-faasi lõpust mitoosini. Clb5 ja Clb6 ekspressioon on kõrgeim G1- ja S-faasi ajal, Clb3 ja Clb4 tase tipneb vahetult pärast DNA replikatsiooni ning Clb1 ja Clb2 ekspressioon on kõrgeim mitoosi ajal. (Bloom ja Cross, 2007; Malumbres, 2014) (Joonis 2)



Joonis 2. *S. cerevisiae* tsükliinid rakutsükliis. Cln1-Cln3 reguleerivad protsesse G1-faasist S-faasini (kaasa arvatud). S-faasis reguleerivad rakutsükliit peamiselt Clb5 ja Clb6. Neile järgnevad ekspressioonilt ja funktsionaalselt Clb3 ja Clb4 ning seejärel Clb1 ja Clb2. Kohandatud (Bloom ja Cross, 2007).

Kõik Cdk1 tsükliinid peale Cln3 omavad paralooget, mis sarnaneb neile nii transkriptsiooni-mustrilt kui ka üldiselt aminohappeliselt järjestuselt. Cln1 ja Cln2 on 57% ulatuses identsed, kusjuures homoloogia tsükliini domääni ümbruses on tervenisti 72%. Clb5 ja Clb6 on 50% ulatuses identsed, Clb3 ja Clb4 ning Clb1 ja Clb2 on üksteisega 62% ulatuses sarnased. (Mendenhall ja Hodge, 1998)

Need sarnasused väljenduvad ka erinevate tsükliinide funktsioonide ja substraatide kattuvuses. Kusjuures on leitud, et kuigi Clb3 sarnaneb järjestuselt rohkem Clb4-ga, kattuvad Clb3 mitootilised funktsioonid ja substraadid pigem Clb2 omadega. (Fitch *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 1992)

Cln3 omab ainult 20-25% homoloogiat Cln1 ja Cln2 järjestusega, sarnanedes pigem S-faasi tsükliinidega Clb5 ja Clb6. Cln3 tase rakus on 5 kuni 100 korda väiksem kui teiste G1-faasi tsükliinide tase (Levine *et al.*, 1996; Mendenhall ja Hodge, 1998) ning erinevalt teistest tsükliinidest, mis on tugevalt rakutsükli poolt reguleeritud, on Cln3 transkriptsioon detekteeritav terve rakutsükli jooksul (McInerney *et al.*, 1997; Tyers *et al.*, 1993).

1.3.1 G1-tsükliinid

G1-faasi tsükliinid *CLN1*, *CLN2* ja *CLN3* on funktsionaalselt redundantid. Kõigi kolme G1-faasi tsükliini deletsiooni ($\Delta cln1\Delta cln2\Delta cln3$) puhul jääb rakk G1-faasi arresti ja rakk ei ole võimeline initsieerima uut rakutsükli (Richardson *et al.*, 1989). Kuid ühe või kahe G1-tsükliini deletsiooniga tüvi on eluvõimeline ehk rakutsükli progressiooniks piisab ainult ühe G1-tsükliini olemasolust (Miller ja Cross, 2000).

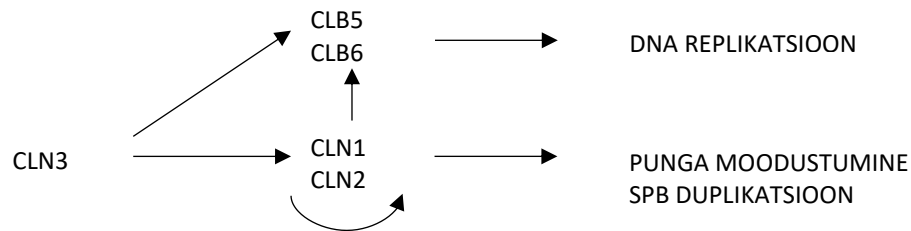
G1-tsükliinid on vajalikud uue rakutsükli alustamiseks, lisaks osalevad nad DNA replikatsioonil, käävi polaarkoha duplikatsioonil ja pungumises. Vaatamata redundantantsusele ei ole erinevad tsükliinid võimelised neid protsesse läbi viima sama efektiivselt (Tyers *et al.*, 1993), mis viitab sellele, et tsükliinide vahel on siiski toimunud funktsionaalne eristumine. (Joonis 3)

Enne S-faasi üleminekut on vajalik, et raku suurus ja valkude süntees G1-faasis saavutaks kindla läve ja seda reguleeriv kontrollpunkt on sõltuv Cln3-st (Talia *et al.*, 2007). Kõrge Cln3 tasemega rakkude G1-faas on lühem ning rakud on väiksemad ja Cln3 deletsiooniga rakud on normaalsest suuremad ning G1-faas on tavalisest pikem (Tyers *et al.*, 1992). Lisaks on Cln3 oluline hilisemate G1-faasi geenide transkriptsiooni aktivatsioonil (sealhulgas *CLN1*, *CLN2*, *CLB5* ja *CLB6*), mõjutades sedasi kaudselt DNA replikatsiooni, kuid sellest pikemalt hiljem (Dirick *et al.*, 1995a; Tyers *et al.*, 1993).

Sarnaselt Cln3-le, osalevad Cln1 ja Cln2 transkriptsiooni regulatsioonis, reguleerides positiivselt nii enda, kui ka Clb5 ja Clb6 ekspressiooni (Ogas *et al.*, 1991). Lisaks on kirjeldatud, et Cln2-Cdk1 vahendab Clb5 aktivatsiooni, fosforüleerides B-tüüpi tsükliin-Cdk1 inhibiitori Sic1, et aidata kaasa selle degradatsiooni suunamisele (Kõivomägi *et al.*, 2011a).

CLN1 ja *CLN2* deletsiooni puhul on rakkude kasv aeglane ja punga teke ning DNA sünteesi initsiatsioon toimub viivitusega (Dirick *et al.*, 1995b; Hadwiger *et al.*, 1989; Stuart ja Wittenberg, 1995). Cln1 ja Cln2 on olulised punga tekkel, indutseerides kortikaalsete aktiinifilamentide polarisatsiooni, kuid täpsem mehhanism ei ole teada (Cvrkovci ja Nasmyth, 1993). Lisaks on

näidatud, et G1-faasi tsükliinid osalevad pärmi tsentrosoomi ehk käävi polaarkoha (SPB, *i.k spindle pole body*) duplikatsiooni initiatsioonis (Haase *et al.*, 2001).



Joonis 3. G1-faasi tsükliinide funktsioonid. Kuigi nii Cln3, kui ka Cln1-Cln2 osalevad transkriptsiooni aktivatsioonis, on G1-faasi tsükliinide funktsioonide puhul on selge eristumine. Cln3 on oluline valdavalt transkriptsiooniliste protsesside jaoks, Cln1 ja Cln2 osalevad lisaks punga tekkes ja SPB duplikatsioonis. (Cvrkovci ja Nasmyth, 1993). Kohandatud.

Vaadeldes G1-tsükliinide lokalisatsiooni, leiti, et Cln3 on peamiselt tuumas, Cln1 ja Cln2 leidub nii tuumas kui ka tsütoplasmas, kuid Cln1 valku on rohkem tuumas ning Cln2 on valdavalt tsütoplasmaatiline (Miller ja Cross, 2000).

1.3.2 B-tüüpi tsükliinid

B-tüüpi tsükliinid võib tulenevalt nende ekspressioonist ja funktsioonist jaotada omakorda S-faasi (Clb5-6) ja M-faasi (Clb1-Clb4) tsükliinideks.

1.3.3 S-faasi tsükliinid

S-faasi tsükliinid Clb5 ja Clb6 koekspressseeruvad Cln1 ja Cln2-ga ning Clb5 ja Clb6 üleekspressioon päästab G1-tsükliinide kolmikmutandi $\Delta cln1\Delta cln2\Delta cln3$ letaalsuse (Epstein ja Cross, 1992; Kühne ja Linder, 1993; Schwob ja Nasmyth, 1993). Tavaliselt on aga Clb5 ja Clb6 G1-faasis inhibeeritud B-tüüpi tsükliin-Cdk1 inhibiitori Sic1 poolt ja nende funktsiooniks rakutsükli algatamine, vaid DNA replikatsiooni initsiatsioon ja järgnevalt reinitatsiooni blokeerimine. Lisaks reguleerivad nad negatiivselt Cln1-Cln3 aktiivsust (Basco *et al.*, 1995; Dahmann *et al.*, 1995; Locke ja Nekich, 2000).

Clb5 puudumisel on S-faas tavapärasest pikem ja $\Delta clb5\Delta clb6$ topeltmutandil on replikatsooni initsiatsioon viivitatud, kuigi S-faas terviklikult on normaalse pikkusega (Epstein ja Cross, 1992; Kühne ja Linder, 1993; Schwob ja Nasmyth, 1993). Clb6 deletsiooni puhul on erinevalt Clb5-st

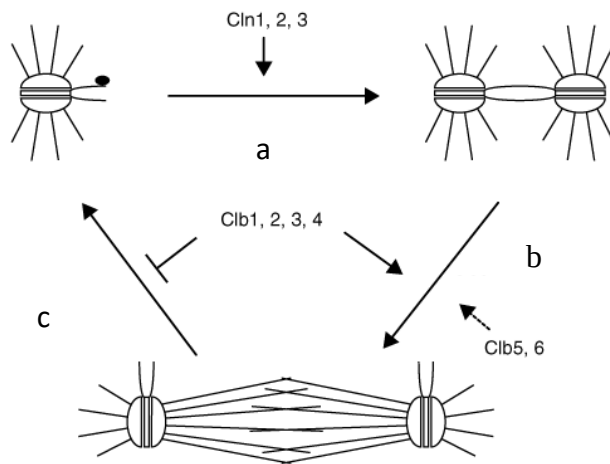
hoopis G1-faas normaalsest lühem ja tulenevalt sellest on ka rakud väiksemad. On leitud, et Clb6 üleekspressioon represseerib Cln2 ja Clb2 transkriptsiooni, kuid Clb5 ei oma sellist mõju transkriptsioonile (Basco *et al.*, 1995; Schwob ja Nasmyth, 1993), viidates sellele, et sarnaselt paraloogidele Cln1 ja Cln2 on ka Clb5 ja Clb6 puhul toimunud funktsioonide jaotumine.

1.3.4 M-faasi tsükliinid

Clb3, Clb4 transkriptsioon on täheldatav S-faasi alguses ja see püsib hilise anafaasini (Epstein ja Cross, 1992; Fitch *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 1992). Clb1-Clb4 lokaliseeruvad peamiselt tuuma ning nende lokalisatsiooni on täheldatud SPB-del ja mitootilisel käävil (Bailly, 2003). Nii $\Delta clb3$, $\Delta clb4$, ega $\Delta clb3\Delta clb4$ ei oma silmmärgatavat mitootilist fenotüüpi, kuid kombineerides $\Delta clb3\Delta clb4$ kaksikmutandi $\Delta clb5$ mutandiga, ei ole rakk võimeline moodustama kääve ning ei ole eluvõimeline (Fitch *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 1992; Schwob ja Nasmyth, 1993). Seega on tsükliinidel Clb3 ja Clb4 tõenäoline roll käävi moodustumises.

Käävi moodustumise tsükkel algab käävi polaarkehade duplikatsiooniga hilises G1-faasis (või varajases S-faasis). Peale duplikatsiooni toimub SPB-de separatsioon ja mitootilise käävi moodustumine, mis on vajalik kinetohooride bipolaarseks orientatsiooniks. Eelnimetatud protsess tagab tütarchromatiitide lahknemise eri rakkudesse. Spetsiifilised tsükliin-CDK kompleksid reguleerivad SPB duplikatsiooni ja tagavad selle, et sama rakutsükli jooksul ei toimuks SPB-de reduplikatsiooni. (Joonis 4).

On näidatud, et SPB-de duplikatsiooni initsiatsioonil osaleb Cln2-Cdk1 ning reduplikatsiooni takistavad B-tüüpi tsükliinid (Clb1-Clb4) (Haase *et al.*, 2001). Arvatakse, et Clb5-Cdk1 ning Clb6-Cdk1 aktiivsus on vajalik etappides pärast SPB duplikatsiooni (Haase *et al.*, 2001; Segal *et al.*, 1998, 2000). (Joonis 4) SPB-de lahknemiseks tütarakkudesse toimub mitootilise käävi elongatsioon, mille jaoks on oluline Clb2-Cdk1 aktiivsus (Amon *et al.*, 1993).



Joonis 4. Erinevate tsükliin-CDK komplekside olulisus käävi moodustumise tsükliis a) Käävi moodustumise tsükkel algab SPB-de duplikatsiooniga hilises G1-faasis (või varajases S-faasis), milleks on vaja Cln1-Cln3-Cdk1 aktiivsus. b) SPB-de separatsiooniks ja mitootilise käävi moodustumiseks on vajalikud B-tüüpi tsükliin-Cdk1 kompleksid. c) Clb1-Clb4-Cdk1 kompleksid takistavad reduplikatsiooni toimumist. Kohandatud (Haase *et al.*, 2001).

Clb3-Clb5 on osaliselt reduntantsed, kui vaadelda nende olulisust käävi moodustamises ja orienteerimises (Fitch *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 1992; Schwob ja Nasmyth, 1993). Kuid siiski on tuvastatud potentsiaalsed substraadid, mis omavad kõrgemat spetsiifilisust ühe või teise tsükliin-Cdk1 kompleksi suhtes. Näiteks, on näidatud, et käävi moodustamises osalev valk Tub4 on Cdk1-Clb3 substraat *in vivo* ja *in vitro*, kuid Tub4 fosforüleerimise olulisus ei ole kirjeldatud (Ear *et al.*, 2013). Lisaks näitasid Kõivomägi *et al.*, 2011, et käävi polaarkehadele lokaliseeruv valk Ypr174c on fosforüleeritud Clb3-Cdk1 poolt *in vitro* oluliselt kõrgema aktiivsusega, kui teiste tsükliin-Cdk1 komplekside puhul (Kõivomägi *et al.*, 2011). Ypr174c funktsioon rakus on kirjeldamata. Samuti ei ole teada kas Clb3-Cdk1 fosforüleerib Ypr174c *in vivo* või mõjutab SPB-dega seotuid protsesse läbi Ypr174c.

Käävi orienteerimine on oluline, et toimuks SPB-de ja tütarkromatiidide võrdne jaotumine tütarrakkudesse. Üks moodus, kuidas Cdk1 osaleb käävi orienteerimises on läbi käävi polaarkehade asümmeetria määramise. Leiti, et mikrotuubulitega interakteeruv valk Kar9 lokaliseerub ainult punga ehk tulevase tütarrakku liikuva käävi polaarkehale (Liakopoulos *et al.*, 2003). Kui muteerida Kar9 järjestuses Cdk1 fosforüleerimissaidid, on Kar9 detekteeritav mõlemal SPB-l ning mõlemad SPB-d liiguvad punga. Kar9 on nii Clb3, Clb4 kui ka Clb5 substraat (Liakopoulos *et al.*, 2003; Maekawa *et al.*, 2003). Kuid leid, et Clb4 lokaliseerub *in vivo* vanemraku

SPB-le, kus Kar9 on vähem, viitab sellele et, Kar9 fosforüleerimine just Clb4-Cdk1 poolt takistab seondumist vanemraku SPB-ga, säilitades nii SPB-de asümmeetria (Liakopoulos *et al.*, 2003).

Clb1 ja Clb2 transkriptsioon saavutab kõrgpunkti 10 minutit enne anafaasi (Fitch *et al.*, 1992). Sarnaselt eelnevatele tsükliinidele on ka Clb1 ja Clb2 osaliselt funktsionaalselt reduntantsed, kuid võrreldes Clb2-ga on Clb1-Cdk1 kinaasne aktiivsus mitootilistes rakkudes madal ja *CLB1* deletsiooni puhul ei ole täheldatud mitoosis märgatavat fenotüüpi (Grandin ja Reed, 1993a). Vastupidiselt Clb1-le on Clb2 fenotüüpiselt olulisim B-tüüpi tsükliin, *CLB2* deletsiooni puhul on rakud ebatavaliselt suured ja kultuuris on kõrge G2-rakkude osakaal. Kombineerides *CLB2* deletsiooni *CLB1* või *CLB3* deletsiooniga, ei ole rakud eluvõimelised, kuid *CLB4* ega *CLB5* deletsioon koos *CLB2* deletsiooniga ei ole letaalne (Amon *et al.*, 1993; Epstein ja Cross, 1992; Fitch *et al.*, 1992; Ghiara *et al.*, 1991; Richardson *et al.*, 1992; Surana *et al.*, 1991)

Clb2 osaleb käävi elongatsioonil ja on vajalik raku anafaasi üleminekul. Lisaks reguleerib Clb2 negatiivselt SBF-sõltuvat transkriptsiooni ja punga teket (Amon *et al.*, 1993; Lew ja Reed, 1993).

Clb1-spetsiifiliste funktsioonide kohta mitoosis on vähe teada ning arvatakse, et Clb1 on hoopis peamine meioosi reguleeriv tsükliin. Meiootiliste protsesside läbiviimisel osalevad ka Clb3 ja Clb4, kuid Clb2 ekspressiooni ja tähtsust meioosis ei ole täheldatud (Grandin ja Reed, 1993b).

1.4 Tsükliinide transkriptsiooniline regulatsioon

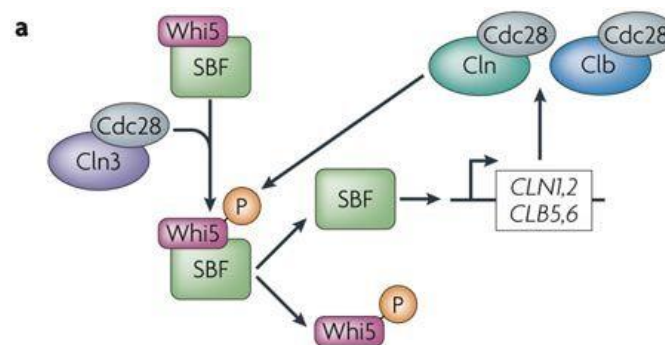
On leitud, et normaalsest kõrgem Clb2 tase (umbes kahekordne üleekspressioon) kiirendab mitootilisi sündmusi, kuid väga kõrge üleekspressioon (kaheksa või enam koopiat *GAL1::CLB2*) on letaalne (Surana, 1993, Cross, 2011, Wäsch ja Cross 2002). Tsükliinid sünteesitakse ja lagundatakse rakutsükli jooksul perioodiliselt (King *et al.*, 1996; Sherr, 1994) ja tsükliinide süntees on reguleeritud peamiselt transkriptsiooni tasemel (Koch ja Nasmyth, 1994). Tavapäraselt on tsükliinide transkriptsioon ja seega CDK aktiivsus reguleeritud läbi tsükliin-CDK enda aktiivsuse.

S. cerevisiae's on varajaselt ekspresseeritud ehk G1- ja S-faasi tsükliinide transkriptsioon valdavalt sõltuv transkriptsioonifaktoritest SBF (kompleks valkudest Swi4 ja Swi6) ja MBF (kompleks valkudest Mbp1 ja Swi6). *CLN1* ning *CLN2* ekspressioon on SBF-sõltuv ning *CLB5* ja *CLB6* MBF-sõltuv. (Koch ja Nasmyth, 1994)

G1- ja S-faasi geenide (sealhulgas G1-tsükliinid) aktiveerimiseks fosforüleeritakse CDK poolt transkriptsioonilised inhibiitorid, et eemaldada need transkriptsioonifaktoritelt. See tekitab

positiivse tagasiside tsükli, millele järgneb negatiivse tagasiside tsüklil, et järgnevalt transkriptsioon inaktiveerida.

SBF-vahendatud transkriptsiooni aktivatsiooniks on vajalik Cln3-Cdk1 aktiivsus (Wijnen *et al.*, 2002). Cln3-Cdk1 fosforüleerib valgu Whi5, mis on SBF kompleksi transkriptsiooniline repressor, et indutseerida selle eksport tuumast ja seeläbi aktiveerida *CLN1* ja *CLN2* transkriptsioon (De Bruin *et al.*, 2004). Cln1-Cdk1 ja Cln2-Cdk1 taseme tõustes fosforüleerivad need samuti Whi5 valku (Skotheim *et al.*, 2008), et seda inaktiveerida ja enda ekspressiooni edendada. Selline positiivne tagasiside on vajalik, et rakud saaksid alustada uut rakutsükli (Skotheim *et al.*, 2008). (Joonis 5)



Joonis 5. SBF-vahendatud transkriptsiooni aktivatsioon Cdk1 aktiivsuse mõjul. Whi5 seob SBF-kompleksi, takistades G1-faasi geenide transkriptsiooni aktivatsiooni. Cln3-Cdk1 fosforüleerib valku Whi5, misjärel see dissotsiitseerub SBF-kompleksist ja SBF-kompleks on võimeline aktiveerima spetsiifiliste geenide transkriptsiooni, sealhulgas Cln1 ja Cln2, mis omakorda fosforüleerivad Whi5, tekitades positiivse tagasiside tsükli. (Bloom ja Cross, 2007)

SBF-vahendatud geeniekspressioon inaktiveeritakse hiljem läbi SBF-kompleksi kuuluva valgu Swi4 fosforüleerimise, mis viiakse läbi mitoetiliste tsükliin-Cdk1 komplekside poolt, millest olulisim on tõenäoliselt Clb2-Cdk1 (Amon *et al.*, 1993; Baetz ja Andrews, 1999; Koch *et al.*, 1996). (Joonis 6)

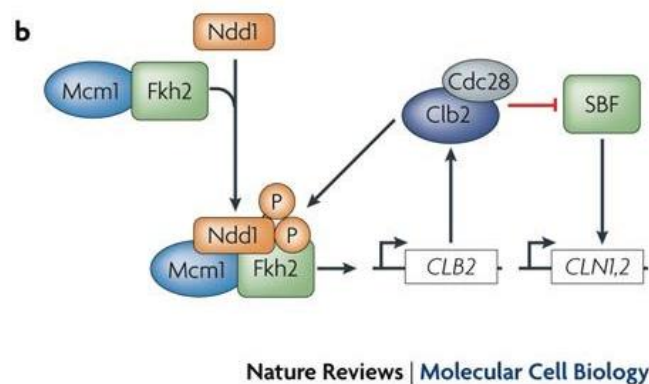
MBF-vahendatud transkriptsiooni aktivatsiooni ja repressiooni on vähem uuritud, kuid on näidatud, et Clb6-Cdk1 fosforüleerib MBF-kompleksi moodustava valgu Swi6, et indutseerida selle eksporti tuumast ja inhibeerida transkriptsiooni (Geymonat *et al.*, 2004).

Mitoetiliste tsükliinide ekspressiooni vahendavad transkriptsioonifaktorid Fkh1 ja Fkh2 (i.k *forkhead*) (Kumar *et al.*, 2000; Linke *et al.*, 2017a). Kuigi Fkh1 ja Fkh2 funktsioonid kattuvad, on

näidatud, et *CLB2*, *CLB3* ja *CLB4* transkriptsiooni aktivatsiooni mõjutab peamiselt Fkh2 (Kumar *et al.*, 2000; Linke *et al.*, 2017a).

Fkh2 aktiivsuseks on vajalik kompleksi moodustamine valkudega Mcm1 ning Ndd1 (Koranda *et al.*, 2000). Nii Fkh2 kui ka Ndd1 fosforüleeritakse Cdk1 poolt, mis tugevdab nende omavahelist interaktsiooni (Pic-Taylor ja Sharrocks, 2004).

On näidatud, et Clb5-Cdk1 fosforüleerib Fkh2 ja Ndd1, kuid *CLB5* deletsioon ei oma olulist negatiivset mõju Fkh2 fosforüleerimisele *in vivo*, ehk teised B-tüüpi tsükliin-Cdk1 kompleksid võivad samuti aktiveerida Fkh2. Näiteks on kirjeldatud, et Clb2-Cdk1 reguleerib G2-faasis positiivselt enda ekspressiooni läbi Ndd1 ja Fkh2 fosforüleerimise, et vahendada Mcm1-Fkh2-Ndd1 interaktsiooni ja tekkinud kompleksi sidumist *CLB2* promooterile (Darieva *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 2003). (Joonis 6)



Joonis 6. Clb2 osaleb transkriptsiooni regulatsioonis. Ndd1 ja Fkh2 fosforüleerimine tsükliin-Cdk1 kompleksi poolt vahendab Fkh2-Ndd1-Mcm1 interaktsiooni ning vastava kompleksi seondumist *CLB2* promooterile ja selle aktivatsiooni. Clb2 fosforüleerib omakorda Ndd1 ja Fkh2, et võimendada enda transkriptsiooni. Lisaks enda transkriptsiooni edendavale positiivsele tagasisidele osaleb Clb2 ka SBF-kompleksi inhibitsioonis, et redutseerida *CLN1* ja *CLN2* transkriptsiooni. (Bloom ja Cross, 2007)

Kuid vaadeldes *CLB2* transkriptsiooni Clb3, Clb4 ja Clb5 puudumisel ei ole *CLB2* promooter täielikult aktiivne, seega osalevad Ndd1 ja Fkh2 fosforüleerimises tõenäoliselt lisaks mitmed erinevad Clb-Cdk1 kompleksid, et tekitada *CLB2* ekspressiooni basaalne tase, millele järgneks Clb2-Cdk1 vahendatud positiivse tagasiside tsükel ja Clb2 oluline taseme tõus (Linke *et al.*, 2017b; Yeong *et al.*, 2001)

CLB2 geeniklastrisse kuulub ka valgukinaas Cdc5, mis mõjutab samuti positiivselt *CLB2*, *CDC5* ja teiste *CLB2* geeniklastrisse kuuluvate geenide transkriptsiooni läbi Ndd1 fosforüleerimise (Darieva *et al.*, 2006).

Peale mainitud transkriptsioonifaktorite on tuvastatud veel mitmeid transkriptsioonifaktoreid mille ekspressioon on rakutsükli spetsiifiline ning mis on Cdk1 sihtmärgid *in vitro* (Ubersax *et al.*, 2003).

Clb3-Cdk1 funktsioonidest *in vivo* teatakse vähe, kuid on näidatud, et Clb3-Cdk1 aktiivsus *in vitro* on kõrge transkriptsioonifaktorite Ndd1, Ash1, Tos4, Plm2, Yox1 suhtes (Kõivomägi *et al.*, 2011). On võimalik, et Clb3-Cdk1 on oluline transkriptsiooni regulaator, vahendades rakutsükli regulatsiooni peamiselt läbi transkriptsioonifaktorite fosforüleerimise.

Tos4 seob ja aktiveerib *FKH2* promooterit (Horak *et al.*, 2002), mõjutades sel viisil kaudselt Fkh2-sõltuvate geenide transkriptsiooni.

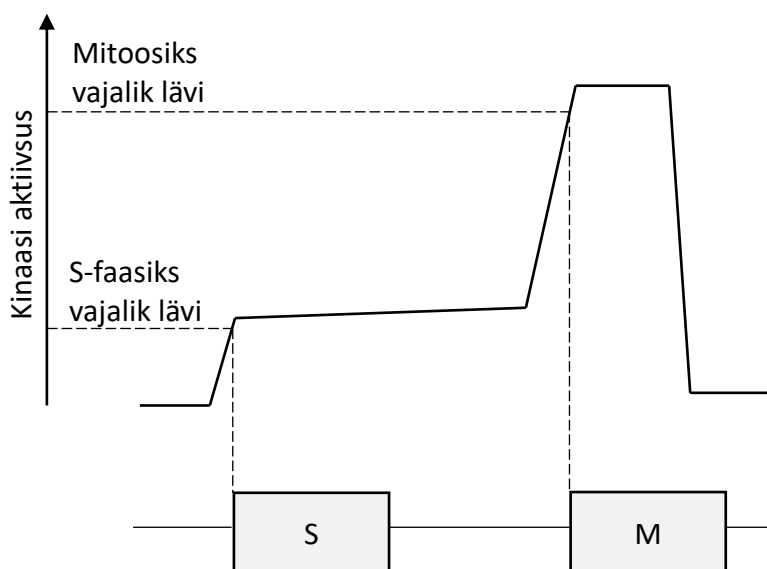
1.5 Tsükliin-CDK substraatide spetsiifiline fosforüleerimine

Kuigi on levinud arusaam, et S-faasi ning mitoosi täpne ajastamine saavutatakse peamiselt tänu tsükliinide varieeruvale ekspressioonile, ei toeta seda mudelit asjaolu, et erinevate tsükliinide eemaldamine ei mõjuta oluliselt rakutsükli vältel toimuvate protsesside järjekorda.

1.5.1 Kvantitatiivne mudel

Poolduvas pärmis *S. pombe*'s on näidatud, et üksik geneetiliselt modifitseeritud tsükliin-CDK kimäär (mitootiline tsükliin Cdc13 koos CDK Cdc2-ga) võib asendada kõiki *S. pombe* nelja tsükliin-CDK kompleksi mitootilise tsükli ajal ja kuut tsükliin-CDK kompleksi meiootilise tsükli ajal (Swaffer *et al.*, 2016; Uhlmann *et al.*, 2011).

Seletamaks, kuidas rakk on võimeline viima läbi rakutsükli sõltudes ainult ühest tsükliin-CDK kompleksist pakuti juba 1990ndatel välja kvantitatiivne mudel. Stern ja Nurse leidsid, et kvantitatiivsed muutused CDK aktiivsus tasemes, mitte tsükliin-CDK komplekside spetsiifilisuses, on kriitilised, et suunata korrapärast S-faasi initsiatsiooni ja mitoosi (Stern ja Nurse, 1996). Kvantitatiivse mudeli järgi on vajalik S-faasi initsiatsiooniks valgukinaasi aktiivsuse tõus väga madalalt tasemelt keskmise tasemeni ning saavutatud taseme hoidmine takistab S-faasi reinitatsiooni. Järgnev aktiivsuse tõus kõrge tasemeni initsieerib mitoosi. (Joonis 7).



Joonis 7. Kvantitatiivne mudel. Mudeli selgitus on tekstis. Kohandatud (Stern ja Nurse, 1996).

Selle mudeli järgi peaks Cdk1 madal aktiivsus olema piisav, et fosforüleerida varajaste rakutsükli sündmuste jaoks vajalikud substraadid, aga mitte piisav, et fosforüleerida hiliste sündmuste aktiveerimiseks vajalikud substraadid. Hilised rakutsükli substraadid fosforüleeritakse ainult siis, kui Cdk1 aktiivsus on väga kõrge. Kui Cdk1-sõltuv rakutsükli regulatsioon toetuks valdavalt kvantitatiivsele mudelile, peaks S- ja M-faasi vaheline Cdk1 aktiivsuse erinevus olema väga suur ja sel juhul S-faas, mille indutseerimiseks on vajalik madal Cdk1 aktiivsus, oleks ülitundlik isegi väiksele aktiivsuse kõikumisele, mis võib ennatlikult indutseerida järgnevad sündmused (Kõivomägi *et al.*, 2011b).

1.5.2 Tsükliinide seondumismotiivid

Cdk1 poolt äratuntav S/T-P-X-K/R konsensusait esineb paljudel CDK substraatidel, aga kõik tsükliin-CDK kompleksid ei fosforüleeri neid substraate ühtemoodi (Bloom ja Cross, 2007; Kõivomägi *et al.*, 2011b; Loog ja Morgan, 2005). Lisaks varieerub tsükliinide võime aktiveerida kinaasi Cdk1. Näiteks on näidatud, et Clb5 aktiveerib Cdk1 nõrgemini kui Clb2 (Loog ja Morgan, 2005), aga vaatamata sellele, ei ole Clb2 võimeline Clb5 promooteri all läbi viima DNA replikatsiooni initsiatsiooni sama efektiivselt, kui seda teeb Clb5 (Cross *et al.*, 1999). Samuti ei ole Clb5 võimeline isegi väga kõrge üleekspressiooni korral inhibeerima mitoosist väljumist, mida on täheldatud Clb2 üleekspressiooni puhul (Jacobson *et al.*, 2000).

Peale selle on affiinsus-puhastamise ning mass-spektromeetria abil tuvastatud valgud, mis interakteeruvad spetsiifiliselt Cln2, Clb3 või Clb5-ga (Archambault *et al.*, 2004) ja hiljemalt ka

spetsiifilised järjestused, mis käituvad kui tsükliini seondumismotiivid (i.k. *docking site*) substraatidel.

Esimene selline järjestus avastati B-tüüpi tsükliinide puhul, kui inimese tsükliin A puhul tuvastati hüdfoobne järjestus, mis vahendab interaktsioone RXL (Arg-suvaline aminohape-Leu) motiiviga substraatidel. See järjestus asub Cdk2 aktiivsaidist umbes 35 ongströmi kaugusel ning sisaldab MRAIL (Met-Arg-Ala-Ile-Leu) järjestust, mis on konserveerunud paljudes imetajate tsükliinides. (Adams *et al.*, 1996; Schulman *et al.*, 1998)

Selle hüdfoobse tasku mutatsioon ehk *hpm* (i.k. *hydrophobic patch mutant*) eemaldab RXL motiivi sisaldavate substraatide interaktsiooni tsükliiniga, aga ei mõjuta tsükliin-CDK omavahelist interaktsiooni. Samuti ei mõjuta hüdfoobne tasku Cdk1 kinaasi aktiivsust mittespetsiifiliste ehk RXL järjestust mitteomavate substraatide suhtes. Seega on hüdfoobne tasku vajalik interaktsiooniks spetsiifilise sihtmärgiga. RXL ja teised spetsiifilised seondumissaidid on vajalikud, et kompenseerida varajaste tsükliin-CDK komplekside madalat üldist aktiivsust (Kõivomägi *et al.*, 2011b; Loog ja Morgan, 2005).

Pärmi tsükliinidest leiti sarnane järjestus esimesena Clb5 puhul, mis sisaldab kolme hüdfoobset jääki (M197, L201, W204). Nende kolme konserveerunud hüdfoobse aminohappejäägi asendaminealaniinidega (M197A, L201A, W204A) vähendab oluliselt Clb5-Cdk1 aktiivsust RXL motiivi omavate substraatide suhtes. Vastav leutsiin ja trüptofaan on konserveerunud kõikide pärmi B-tüüpi tsükliinide vahel (Cross ja Jacobson, 2000).

Nii Clb5, Clb3 kui ka Clb2 *hpm* mutandid omavad RXL motiiviga substraatide suhtes efekti, kuid see varieerub. Näiteks tuvastati substraadid, mis on Clb3-spetsiifilised (tundmatu funktsiooniga valk Ypr174c ja transkriptsioonifaktorid Ash1, Tos4), omades ka negatiivset mõju fosforüleerimisele Clb3 *hp* puhul, aga ei ole head Clb5 substraadid (Kõivomägi *et al.*, 2011b).

G1 tsükliinidel Cln1-Cln2 on leitud samuti hüdfoobne järjestus, mis aitab kaasa substraadi äratundmisele. Kuid erinevalt B-tüüpi tsükliinidest tunnevad Cln1 ja Cln2 ära LLPP (Leu-Leu-Pro-Pro) järjestuse ning Cln3 või Clb1-Clb6 ei oma spetsiifilisust LLPP suhtes (Bhaduri ja Pryciak, 2011; Bhaduri *et al.*, 2015; Kõivomägi *et al.*, 2011b).

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärkideks on:

1. uurida potentsiaalsete Clb3-Cdk1 ja Clb4-Cdk1 substraatide fosforüleerimise tsükliin-spetsiifilisust;
2. kirjeldada Clb3-spetsiifilist fosforüleerimist vahendav seondumismotiiv valgus Ypr174c;
3. uurida, kas Ypr174c on fosforüleeritud Cdk1 poolt *in vivo*;
4. analüüsida, millised fosforüleerimissaidid fosforüleeritakse Ypr174c valgus *in vitro* ja *in vivo* ning kirjeldada Clb3 olulisust Ypr174c fosforüleerimisel *in vivo*;
5. selgitada Clb3 hüdrofoobse tasku interaktsioonide olulisust ning Ypr174c valgu ja selle fosforüleerimise funktsiooni *in vivo*.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud tüved ja söötmed.

Kõik kasutatud *S. cerevisiae* tüved põhinesid tüvel W303 MATa bar1::hisG.

Pärmikultuuride kasvatamiseks kasutati CSM (i.k. *complete supplement mixture*) söödet (7 g/l pärmi lämmastiku alus (BD Biosciences), 0.79 g/l CSM pulber (Formedium), 20 g/l glükoos (Oriola)) või YPD (i.k. *Yeast extract, Peptone, Dextrose*) söödet (10 g/l pärmiekstrakt (Formedium), 20 g/l pepton (Formedium), 20 g/l glükoos (Oriola)).

Pärmirakkude selektsioonil kasuti SC-HIS (i.k. *synthetic complete*) (7 g/l pärmi lämmastiku alust ilma aminohapeteta (BD Biosciences), 1,9 g/l CSM-HIS (Formedium), 20 g/l glükoos (Oriola)) ja SC-TRP (7 g/l pärmi lämmastiku alust ilma aminohapeteta (BD Biosciences), 1,9 g/l CSM-TRP (Formedium), 20 g/l glükoos (Oriola)). *URA3* geeni vastuselektsiooniks plaaditi rakud 5-fluorooroothapet (5-FOA) sisaldava söötmega plaatidele (7 g/l pärmi lämmastiku alus (BD Biosciences), 1,9 g/l CSM-URA (Formedium), 50 µg/ml uratsiil, 1 g/l 5-fluorooroothape (Carbosynth), 20 g/l glükoos (Oriola)).

Bakterikultuurid kasvatati LB (Luria-Bertani) söötmes (10 g/l trüpton (BD Biosciences), 5 g/l pärmiekstrakt (Formedium), 10 g/l NaCl) või 2xYT (i.k. *Yeast Extract Tryptone*) söötmes (16 g/l trüpton (BD Biosciences), 10 g/l pärmiekstrakt (Formedium), 5 g/l NaCl).

Erinevate konstruktide kloneerimiseks kasutati *E.coli* tüve DH5 α rakke (Invitrogen) ning rekombinantsete valkude ekspresseerimiseks BL21-CodonPlus(DE3)-RP rakke (Stratagene).

2.2.2 Oligonukleotiid-suunatud mutagenees

Oligonukleotiid-suunatud mutageneesi abil tehti konstruktid, mis sisaldasid Ypr174c üksikuid aminohappe asendusi (S158A, S170A, S175A, P190A). Ülejäänud kasutatud Ypr174c aminohappe asendustega konstruktid olid valmistatud teiste laborikaaslaste poolt (Rait Kivi, Mardo Kõivomägi).

Mutageneesiks disainiti umbes 40 aluspaari pikkused oligonukleotiidid, mis sisaldasid lisaks huvipakkuva geeni komplementaarsetele alale ka soovitud asendust.

Oligonukleotiidide kineerimiseks inkubeeriti kineerimisseguga (100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 425 μ M ATP, 6,5 μ M oligonukleotiid ja 0,15 U/ μ l T4 polinukleotidi kinaas (Thermo Scientific)) 45 minutit 37 °C juures, misjärel kuumutati segu ensüümi inaktiveerimiseks 10 minutit 65 °C juures. Oligonukleotiidide seondumiseks üheaheelalisele DNA-le (ssDNA) segati 0,5 μ l 6,5 μ M kineeritud oligonukleotiid, 50 ng ssDNA-d, 1 μ l 10-kordset seondumispuhvrit (500 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl (pH 7,4), 20 mM MgCl₂) ja ddH₂O lõppmahuni 10 μ l. Segu inkubeeriti 8 minutit 75 °C termostaadis, misjärel lasti segul jahtuda toatemperatuurile umbes 30 minutit.

ssDNA-le komplementaarse ahela sünteesimiseks ning DNA otste ligeerimiseks lisati 10 μ l seondumissegule 10x sünteesi puhver (100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 50 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 10 mM ATP, 5 mM dNTP), 0,83 μ l (5 U/ μ l) T4 DNA polümeraas (Thermo Scientific) ja 1,5 μ l (5 U/ μ l) T4 ligaas (Thermo Scientific) ning inkubeeriti 5 minutit jääs, seejärel 5 minutit toatemperatuuril ja 30 minutit 37 °C kapis. Segule lisati 5 μ l 1xTE puhvrit (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA) ning seejärel transformeeriti 2,5 μ l segust bakteritüve DH5 α rakkudesse.

2.2.3 Kloneerimine PCR meetodil ja restriksiooniensüümide abil

Erinevate Ypr174c mutantsete valkude puhastamiseks kloneeriti need pGEX-4T1 vektorisse. Selleks amplifitseeriti huvipakkuv järjestus koos BamHI ja XhoI restriktasidide lõikejärjestustega, kasutades *Phusion High Fidelity* polümeraasi (Thermo Scientific) vastavalt tootja juhistele. PCR produktide kontrollimiseks elektroforeesiti saadudprodukte 1% agarosgeelis (kuhu oli lisatud 0,3 μ g/ml etiidiumbromiid) 1x TAE puhvris (40mM Tris-atsetaat (pH 8,3), 1 mM EDTA). PCR

produktide puhastamiseks kasutati *Gel/PCR Purification Kit-i* (Favorgen), järgides tootja protokoll.

Puhastatud PCR produkte lõigati BamHI ja XhoI *FastDigest* restriктаasidega (Thermo Scientific) vastavalt tootja juhiste ja ligeeriti pGEX-4T1 (töödeldud samuti BamHI, XhoI ja fosfataasiga FastAP (Thermo Scientific)) vektoriga, kasutades T4 DNA ligaasi (Thermo Scientific), järgides samuti tootja protokoll. Ligatsioonisegust ruumalaga 10 µl transformeeriti 2 µl DH5α rakkudesse.

2.2.4 *E. coli* transformatsioon

50 µl kompetentsetele rakkudele (valmistanud Rait Kivi) lisati 50-100 pg DNA-d, segu inkubeeriti 30 minutit jääs, misjärel tehti rakkudele kuumašokk, inkubeerides segu kaks minutit 42 °C termostaadis ja seejärel üks minut jääs. Transformatsioonisegule lisati 500 µl LB söödet ja segu inkubeeriti 37 °C loksutis 30 minutit. Rakud tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 3000 g 2 minutit ja plaaditi LB plaatidele.

pET28a transformatsiooni puhul (oligonukleotiid-suunatud mutageneesil) kasutati selektsiooniks LB plaate, kuhu oli lisatud 100 µg/ml kanamütsiini (Applichem). pGEX-4T1 konstruktid transformatsiooni puhul plaaditi rakud LB plaatidele, kuhu oli lisatud 100 µg /ml ampitsilliini (Sigma).

Ypr174c-GST puhastamiseks transformeeriti pGEX-4T1 konstruktid BL21-CodonPlus(DE3)-RP rakkudesse, kasutades eelnevalt kirjeldatud protokoll. Rakkude selektsiooniks plaaditi need LB plaatidele, kuhu oli lisaks ampitsilliinile lisatud ka 100 µg/ml klooramfenikooli (Applichem).

2.2.5 *S. cerevisiae* transformatsioon

Endogeense *CLB2*-yeCitrine, *CDC5*-Venus tüvede tegemiseks ning Ypr174c C-terminaalseks märgistamiseks 6HA-märgisega kasutati PCR meetodil ja homoloogilisel rekombinatsioonil baseeruvat süsteemi (Janke *et al.*, 2004). Matriitsina kasutati Ypr174c-6HA puhul pYM17 plasmidi (Janke *et al.* 2004) ning Cdc5-Venus ja Clb2-yeCitrine puhul pYM31 plasmidi, kuhu oli sisse viidud vastavalt Venus või yeCitrine fluorestseeruvat valku kodeeriv järjestus. PCR viidi läbi kasutades Taq DNA polümeraasi vastavalt tootja juhistele (Solis BioDyne). Puhastatud PCR produkt transformeeriti pärmirakkudesse.

Metsiktüüpi Ypr174c asendamiseks üksikute fosforüleerimismotiivide mutantidega amplifitseeriti oligonukleotiid-suunatud mutageneesi käigus saadud konstruktid praimeritega, mis lisaks geeniga

kattuvale alale sisaldasid ka üles- ja allavoolu järjestustega kattuvat ala. Selleks kasutati samuti Taq DNA polümeraasi vastavalt tootja juhistele.

Cdk1 aktiivusse sensorina kasutatava NLS-mooduli (i.k. *Nuclear Localization Sequence*) integreerimiseks erinevatesse tüvedesse lineariseeriti (NLS-moodul)-mCherry liitvalku kodeeriv pRS304 plasmiid (valmistanud Mihkel Örd) restriктаasiga PacI (Thermo Scientific) ning integreeriti *ADH1* promooteri lookusesse.

Erinevate pärmitüvede tegemiseks transformeeriti eelnevalt kirjeldatud PCR meetodil saadud produktid või lineariseeritud plasmiidid pärmirakkudesse. Selleks kasvatati pärmirakud 20-50 ml YPD söötmes 30 °C loksutil kuni kultuuri optilise tiheduseni $OD_{600}=0,6-0,8$. Seejärel kultuur tsentrifuugiti 1 minut 2500 g ning sademelt eemaldati vedelik. Rakud resuspendeeriti 1 ml ddH₂O ja tsentrifuugimist korrati. Pesu korrati 1 ml PLI lahuses (5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 mM EDTA, 100 mM liitiumatsetaat) ja seejärel resuspendeeriti rakud rakkude ruumalast kahekordses PLI ruumalas. Rakke inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril ning seejärel lisati segule 2-5 µg puhastatud PCR-i produkti, 10 µl *Salmon Sperm* DNA-d (10 mg/ml) (Sigma) ning vett lõppmahuni 100 µl. Saadud segule lisati veel 100 µl toatemperatuuril inkubeeritud pärmirakke, 48 µl DMSO ja 700 µl PLII (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 40% polüetüleenglükool (PEG 3350), 100 mM liitiumatsetaat). Segu suspendeeriti korralikult ning seejärel inkubeeriti 40 minutit 42 °C termostaadis. Pärast inkubeerimist hoiti segu 2 minutit jääl, misjärel tsentrifuugiti segu lauatsentrifuugis 30 sekundit 3000 g. Rakud pesti 1 ml ddH₂O-ga ning tsentrifuugimist korrati. Sademe pealt eemaldati vedelik, rakud resuspendeeriti ddH₂O-s ning plaaditi.

Ypr174c-6HA tüvede tegemisel plaaditi rakud YPD söötmega plaadile, millelt järgmine päev tehti tempelkülv YPD plaadile, kuhu oli lisatud norseotritsiin lõppkontsentratsiooniga 100 mg/l (Werner BioAgents). Cdc5-Venus ning Clb2-yeCitrine transformatsioonisegu plaaditi SC-HIS söötmega plaatidele.

Ypr174c S158A, S170A ja 175A asenduste tegemiseks plaaditi vastava konstruktiga transformeeritud rakud YPD plaadile, millelt tehti järgmine päev tempelkülv 5-fluorooroothappega (5-FOA) plaatidele.

NLS-moodulit sisaldavad tüved plaaditi SC-TRP söötmega plaatidele.

2.2.6 Western Blot analüüs.

Western Blot analüüsiks kasvatati pärmirakud 30 °C loksutil 5 ml YPD söötmes kuni OD₆₀₀=0,6-0,8 ning tsentrifuugiti 1 minut 3500 g. Sademelt eemaldati vedelik ning proovid külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80 °C kapis. Lüüsimiseks suspendeeriti rakud 200 µl uurea lüüsipuhvris (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 7 M uurea, 2 M tiouurea, 65 mM CHAPS, 65 mM DTT, 1 mM PMSF, 180 µg/ml Na₃VO₄, 2,1 mg/ml NaF, 17,3 mg/ml β-glütserofosfaat). Segule lisati üks-ühele suhtes *Silibeat* kerasid läbimõõduga 0,4-0,6 mm (Biotop). Rakud lüüsi 40 sekundit 4 m/s *FastPrep-24* homogenisaatoriga (MB Biomedicals).

Sademe eemaldamiseks tsentrifuugiti lüsaati 10 minutit 13400 rpm lauatsentrifuugis, misjärel pipeteeriti supernatant uude tuubi. Kontsentratsioonide võrdsustamiseks kasutati *Bio-Rad Protein Assay* lahust (Bio-Rad) vastavalt tootja juhiste.

Valkude analüüsimiseks kasutati standardset SDS-poliakrülamidegeeli (SDS-PAA).

Pärast elektroforeesi inkubeeriti poliakrülamidegeeli 15 minutit *semi-dry* puhvris (5,8 g/l Tris, 2,9 g/l glütsiin, 0,37 g/l SDS, 20% metanool) ning lahutatud valgud kanti nitrotselluloosmembraanile *Pierce G2 Fast Blotter* (Thermo Scientific) aparaadiga, kasutades *Standard Semi-Dry* ülekandeprogrammi.

Nitrotselluloosmembraani blokeerimiseks inkubeeriti seda tund aega toatemperatuuril TBS-T puhvris (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,05% Tween 20, 150 mM NaCl), millele oli lisatud 5% rasvavaba lõssipulbrit. Seejärel inkubeeriti membraani 1 h primaarse hiire anti-HA 11 kloon 16B12 monoklonaalse IgG antikehaga (Biolegend), mida lahjendati 1/500 3% lõssipulbriga TBS-T puhvrisesse. Membraani pesti TBS-T puhvris 15 minutit ja kolm korda 5 minutit. Pärast pesu inkubeeriti membraani 30 minutit sekundaarse kitses toodetud hiire IgG vastase antikeha mädarõika peroksidaasi konjugaadiga (LabAs), mida lahjendati 1/7500 3% lõssipulbriga TBS-T puhvrisesse. Membraani pesu korrati nagu eelnevalt kirjeldatud. Seondunud antikehade detekteerimiseks kanti membraanile üks-ühele suhtes *SupersignalTM West Pico Chemiluminescent Substrate* reagente (Thermo Scientific) ja membraan eksponeeriti röntgenfilmile.

2.2.7 GST-märgisega valkude puhastamine

Rekombinantsed valgud ekspresseeriti BL21-CodonPlus(DE3)-RP rakkudes, mida kasvatati 250 ml 2x YT söötmes 37 °C juures kuni kultuuri optilise tiheduseni OD₆₀₀=0,6-0,8, misjärel indutseeriti valgu ekspressioon 0,3 mM IPTG (isopropüül β-D-1-tiogalaktopüranosiid) lisamisega. Valke ekspresseeriti loksutil üleöö 16 °C juures. Järgneval hommikul tsentrifuugiti kultuuri 10 minutit 5000 g, misjärel pesti sadet 30 ml-s 1x PBS lahuses ja proovid tsentrifuugiti uuesti. Pärast sademelt vedeliku eemaldamist, külmutati proovid vedellämmastikus ja säilitati -80°C juures.

Rakkude lüüsimiseks resuspendeeriti sade 7 ml lüüsi puhvris (50 mM Hepes-KOH (pH 7,0), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,1% NP-40, 1 mg/ml lüsotsüüm, 1 µg/ml aprotiniin, 1 µg/ml pepstatiin A, 1 mM PMSF, 0,1 U/µl DNAasI) ning inkubeeriti 20 minutit 4 °C juures seda aeg-ajalt segades. Rakkude lõplikuks lüüsimiseks sonikeeriti neid ultraheligeneraatoriga (Bandelin Sonoplus HD 2070) 3 x 30 sekundit, misjärel tsentrifuugiti sade lauatsentrifuugis 20 minutit 15 000 rpm 4 °C juures. Samal ajal valmistati ette kolonn, kuhu pipeteeriti 100-150 µl GST-kerasid (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow GST (GE Healthcare)) ja kolonni pesti 10-kordse kolonniruumala pesupuhvriga (50 mM Hepes-KOH (pH 7,0), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,1% NP-40).

Valgu sidumiseks keradele resuspendeeriti kerad 200 µl-s lüsaadis üles, kerad segati lüsaadiga ja lüsaati keradega inkubeeriti 1 h 4 °C juures *end-over-end* segajal (*Rotator-Mixer*, Biosan) 15 ml tsentrifuugituubis.

Pärast inkubatsiooni kanti lüsaat keradega uuesti kolonnile ning kolonni pesti neli korda kümnekordse kolonni ruumala pesupuhvriga.

Valgu elueerimiseks keradelt kanti kolonnile elueerimispuhvrit (50 mM Hepes-KOH (pH 7,0), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,1% NP-40, 7,6 mg/ml L-glutatioon) võrdselt ühekordse kolonni ruumalaga. Enne eluaadi kogumist inkubeeriti kolonni elueerimispuhvris 5 minutit toatemperatuuril. Elueerimist korrati kokku kolm korda, katsetes kasutati II eluaati.

Valkude puhtuse ja kontsentratsiooni analüüsiks laaditi 1-2 µl eluaatidest SDS-polüakrülamidgeelile koos BSA (i.k. Bovine Serum Albumin, veise seerumi albumiin) (Thermo Scientific) lahjenduste reaga, et luua puhastatud valkude kontsentratsiooni arvutamiseks vajalik kalibreerimiskõver. Pärast elektroforeesi fikseeriti geelid 15 minutit fikseerimispuhvris (30% etanool, 30% äädikhape) ning seejärel värviti geelid Coomassie Brilliant-Blue G-250 (Applichem) värvilahusega 1-2 tundi. Üleliigse värvi mahapesemiseks inkubeeriti geele üleöö vees.

Valgu kontsentratsioonide analüüsiks skanneeriti geelid Epson Scan skanneri abil (Epson) ning tulemused kvantiseeriti *ImagequantTM TL* programmiga (GE Healthcare).

2.2.8 *In vitro* kinaasikatse

Tsükliin-CDK komplekside spetsiifilisuse analüüsimiseks *in vitro* kasutati TAP-meetodil puhastatud tsükliin-Cdk1 komplekse (Clb2-, Clb3-, Clb4-, Clb5-, *clb2(hpm)*-, *clb3(hpm)*- ning *clb5(hpm)*-Cdk1), mis olid puhastatud pärmirakkudest eelnevalt kirjeldatud meetodil (Kõivomägi et al., 2013) (puhastanud Ervin Valk, Kaur Pääbo, Rait Kivi). Substraatidena kasutati 6xHis-märgisega koobalafiinsuskromatograafiaga puhastatud Ash1, Ndd1, Plm2, Tos4, Kar9 ja Sic1ΔC liitvalke ning GST-märgisega puhastatud Ypr174c liitvalku (valgud on puhastanud Mardo Kõivomägi, Rait Kivi, Mihkel Örd).

Ypr174c *in vitro* fosforüleerimise analüüsil kasutati eelnevalt mainitud pärmist puhastatud Clb3-Cdk1 ja Cln2-Cdk1 komplekse. Kõik kasutatud Ypr174c valgud olid puhastatud GST-märgisega.

Kinaasikatse reaktsioonisegu sisaldas 0,5- 2 μM substraatvalku, 50 mM Hepes-KOH (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,2 mg/ml BSA, 500 nM Cks1, 500 μM ATP, 0,1 μCi/μl [γ -³²P]ATP, 0,1 mg/ml 2HA peptiid, 2-3 nM puhastatud tsükliin-Cdk1 ja ddH₂O.

Reaktsiooni alustati ensüümisegu lisamisega substraadile ning reaktsioon peatati 2x Laemmli SDS puhvri lisamisel 12-ndal minutil.

Proovide elektrofooresiks kasutati standardset 10% SDS-PAA geeli või *Phos-Tag* (SDS-PAA geeli (8% akrüülamiid, 50 μM Phos-Tag (Wako Chemicals), 50 μM MnCl₂) ning värviti Coomassie Brilliant-Blue R-250 lahusega. Pärast värvimist pesti geeli *High Methanol Destain* lahuses (40% metanooli, 7% äädikhapet) ja seejärel veega. Substraatvalku inkorporeeritud ³²P signaalide detekteerimiseks kasutati Typhoon 5 skannerit (Amersham) ja signaalid kvantiseeriti ImageQuantTM TL programmi (GE Healthcare).abil.

2.2.9 Mikroskoopia

Pärmikultuurid kasvatati CSM söötmes, kuni OD₆₀₀=0,2-0,6. Seejärel pipeteeriti 0,3-0,6 μl rakukultuuri 0,18 mm kattedklaasile ning kaeti 1 mm paksuse CSM söötmega, millele oli lisatud 2% agaroosi (Lonza Nusieve GTG).

Rakkude visualiseerimiseks kasutati Zeiss Observer Z1 mikroskoopi 63x/1.4NA õliimmersiooni objektiiviga ja Orca-r2 C10600-10B kaamerat (Hamatsu Photonics). Agaroosiga kaetud rakkude

temperatuuri hoidmiseks 30°C juures kasutati Tempcontrol 37-2 digital (PeCon) ning pilte tehti nelja kuni kaheksa tunni jooksul iga kolme minuti tagant.

Tüvesid, mis ekspresseerisid NLS-mCherry liitvalku, ergastati 750 ms Colibri 540-80 LED mooduli abil, Clb2-yeCitrine ja Cdc5-Venus tüvesid ergastati 500 ms, kasutades Colibri 505 Led moodulit. Spc42-GFP ergastati 15 ms, kasutades Colibri 470 LED moodulit. Kõiki Colibri mooduleid kasutati 25% võimsusel.

Andmeanalüüsiks, mis hõlmas nii rakkude detekteerimist kui ka fluorestsentssignaalide kvantiseerimist, kasutati MATLAB-i (The Mathworks, Inc) (Doncic *et al.*, 2013).

Ypr174c-GFP konfokaalmikroskoopia piltide tegemiseks kasutati mikroskoopi LSM 710 (Zeiss), AlphaPInAPO 63x/1.46 õliimmersiooni objektiivi ning kaamerat Orca-R2 C10600-10B. Ypr174c-GFP ergastati kasutades RMC 7812 Z2 moodulit.

2.3 Tulemused

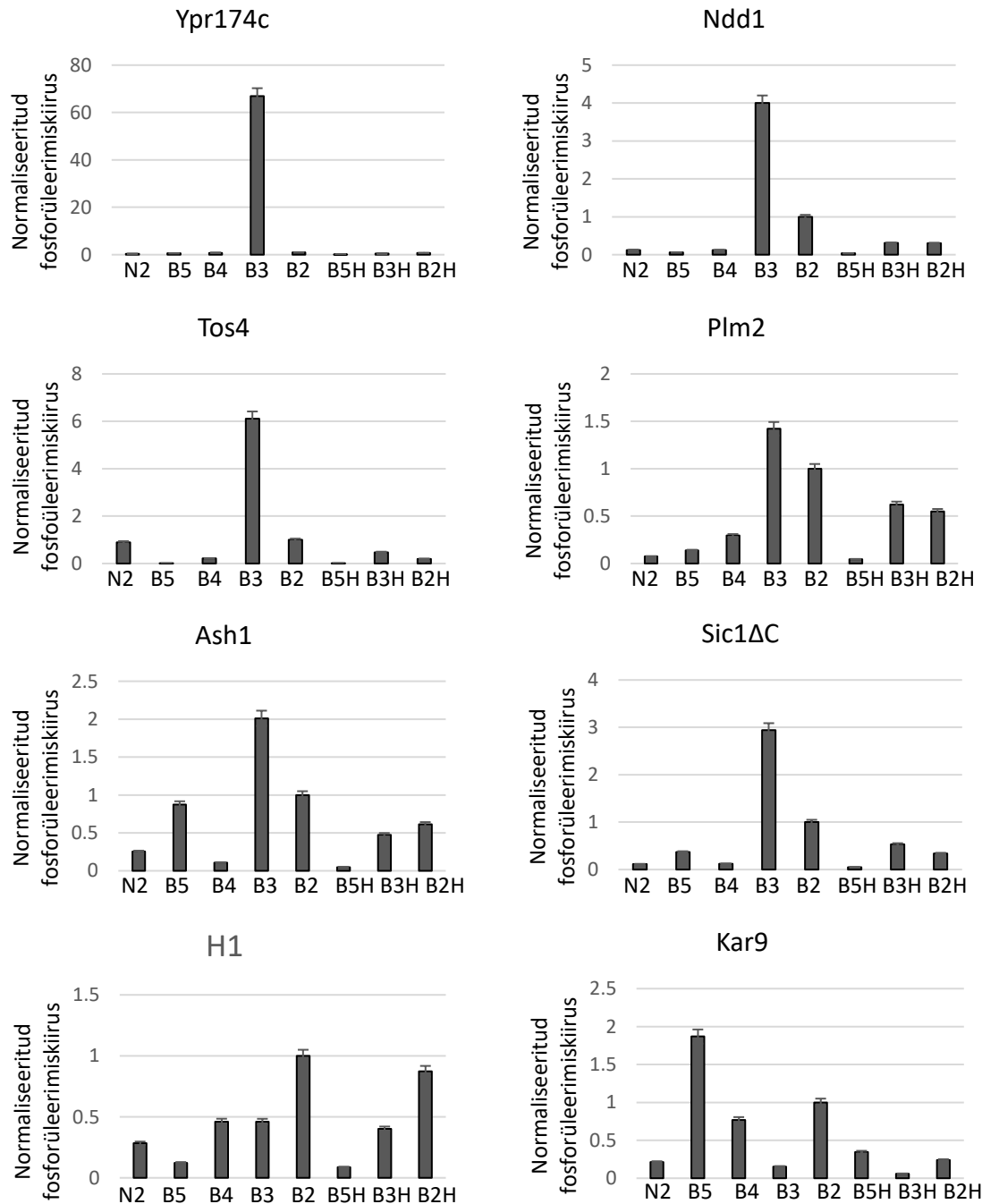
2.3.1 Tsükliinid Clb3 ja Clb4 on erineva substraadispetsiifilisusega

Esmalt küsiti, kas paraloogid Clb3-Cdk1 ja Clb4-Cdk1 omavad sarnast spetsiifilisust substraatide fosforüleerimisel. Selleks tehti *in vitro* kinaasikatse puhastatud valkudega, mille abil vaadati valitud substraatide fosforüleerimist erinevate metsiktüüpi tsükliin-Cdk1 komplekside ja B-tüüpi tsükliinide *hpm* mutantide Cdk1 komplekside poolt.

Tuginedes Kõivomägi *et al.*, 2011 artiklile, valiti välja substraadid, mis on tugevalt Clb3-spetsiifilised. Nendeks on transkriptsiooniga seotud valgud Ash1, Ndd1, Plm2 ja Tos4 ning teadmata funktsiooniga valk Ypr174c, kusjuures Ash1, Tos4 ja Ypr174c kiire fosforüleerimine Clb3-Cdk1 poolt sõltub Clb3 hüdrofoobsest taskust (Kõivomägi *et al.*, 2011). Lisaks analüüsiti Kar9 fosforüleerimist Cdk1 poolt, mille puhul on *in vivo* näidatud, et tegemist on Clb4-spetsiifilise substraadiga (Liakopoulos *et al.*, 2003). Paneelis on ka B-tüüpi tsükliinide inhibiitor Sic1, millelt on eemaldatud C-terminaalne CDK-tsükliin kompleksi inhibeeriv järjestus (Hodge ja Mendenhall, 1999), ning CDK-de mudelsubstraat histoon H1.

Signaalid kvantiseeriti ning pipeteerimisvea parandamiseks korrigeeriti tulemusi H1 suhtes, võttes arvesse mõõdetud tsükliin-CDK komplekside k_{cat}/K_M väärtusi (Kõivomägi *et al.*, 2011b). Kuna Clb4-Cdk1 k_{cat}/K_M histooni H1 puhul ei ole teada, võeti see võrdseks Clb3-Cdk1-ga. (Joonis 8)

Selgus, et lisaks eelnevalt kirjeldatud Clb3-spetsiifilistele substraatidele Ash1, Tos4 ja Ypr174c, on ka Ndd1, Plm2 ja Sic1 Δ C Clb3-Cdk1-vahendatud fosforüleerimine sõltuv tsükliini hüdrofoobsest taskust (Joonis 8). Lisaks ilmnes, et Clb4-Cdk1 kompleks fosforüleerib neid valke suhteliselt aeglaselt. Kar9 puhul aga on näha, et Clb4-Cdk1 aktiivsus Kar9 suhtes on kõrgem võrreldes Clb3-Cdk1 kompleksiga. Need tulemused näitavad, et paraloogsed tsükliinid Clb3 ja Clb4 suunavad Cdk1 kompleksi fosforüleerima erinevaid substraate ning seega on neil toimunud funktsionaalne eristumine lähtuvalt tsükliin-substraat seondumisest.



Joonis 8. *In vitro* Cdk1 substraatide fosforüleerimise tsükliinide spetsiifilisuse paneel. Paneelis on substraatidest teadmata funktsiooniga valk Ypr174c, transkriptsioonifaktorid Ndd1, Ash1, Tos4 ja selle paraloog Plm2, lisaks SBP-le lokaliseeruv valk Kar9 ning B-tüüpi tsükliinide inhiibitor Sic1. Y-teljel on Clb2 järgi normaliseeritud fosforüleerimisk iirus ning x-teljel erinevad tsükliin-Cdk1 kompleksid, kus tsükliiniks on kas G1-faasi tsükliin Cln2 (N2), S-faasi tsükliin Clb5 (B5) ning mitoosi-spetsiifilised tsükliinid Clb3 (B3) ja Clb2 (B2) ning Clb2, Clb3, Clb5 *hpm* mutandid (B5H, B3H, B2H). Veapiirideks on 95% usaldusvahemikud.

2.3.2 Clb3-Cdk1 aktiivsus Ypr174c suhtes on sõltuv PxF motiivist

Kuigi Ypr174c fosforüleeritakse kõigi katses olnud tsükliin-Cdk1 komplekside poolt, on Clb3-Cdk1 aktiivsus Ypr174c suhtes võrreldes teiste tsükliin-Cdk1 kompleksidega 50-100 korda kõrgem. Kuna eelnevalt on näidatud, et tsükliin-substraat seondumismotiivid võivad oluliselt kiirendada spetsiifiliste substraatide fosforüleerimist G1- ja S-faasi CDK komplekside poolt (Kõivomägi et al., 2011, Bhaduri ja Pryciak 2011), küsiti, kas ka Ypr174c valgu Clb3-spetsiifilisus tuleneb võimalikust seondumismotiivist, mis vahendab Ypr174c interaktsiooni Clb3-ga.

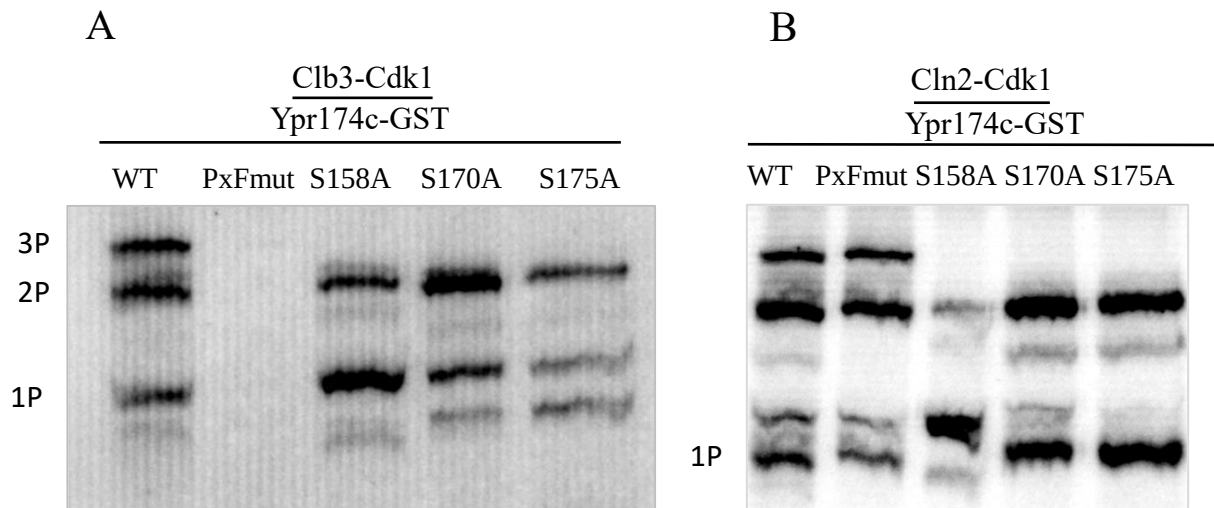
Ypr174c N- ja C-terminaalsed deletsioonid piiritlesid Clb3 seondumisala valgu C-terminaalsesse alasse (Mardo Kõivomägi, avaldamata). Selleks, et tuvastada spetsiifilised aminohapped, mis osalevad Ypr174c-Clb3 interaktsioonis, asendati Ypr174c järjestuses üksikud aminohapped positsioonides 189-198alaniinidega ning analüüsiti nende asenduste mõju Ypr174c fosforüleerimisele Clb3-Cdk1 poolt.

In vitro kinaasikatse puhastatud valkudega näitas, et P190, P193 ning F195 asendaminealaniinidega vähendas oluliselt Clb3-Cdk1 aktiivsust Ypr174c suhtes (Joonis 9). Nende aminohapete kolmikmutandi puhul vähenes fosforüleerimise efektiivsus 40-kordselt. Selle alusel võiks Clb3 seondumismotiiv valgul Ypr174c olla konsensusena PxxPxF, mis on järgnevalt tekstis lühendatud PxF motiiviks. Ülejäänud asendused ei mõjutanud Ypr174c fosforüleerimist Clb3-Cdk1 poolt. Seega võib Clb3-spetsiifilist fosforüleerimist vahendada lühike lineaarne motiiv konsensusliku järjestusega PxxPxF, ning kuna selle muteerimisel Ypr174c valgus on sarnane mõju Ypr174c fosforüleerimisele kui muteerides tsükliini Clb3 hüdrofoobse tasku (Joonis 8), võib järeldada, et leitud motiiv seondub ilmselt tsükliini hüdrofoobsesse taskusse.

Kaks ulatuslikku *S.cerevisiae* valkude fosforüleerimissaitide tuvastamist puudutavat tööd (Albuquerque *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2009), näitasid, et Ypr174c on fosforüleeritud seriinidel positsioonides S158, S170 ning S175. Kõivomägi *et al.* näitasid, et Clb5 puhul on tsükliini hüdrofoobsest taskust sõltuv fosforüleerimine efektiivsem fosforüleerimissaitide puhul, mis asuvad seondumismotiivist N-terminaalses suunas 16-20 aminohappe kaugusel (Kõivomägi *et al.* 2013). Lähtudes nendest teadmistest asendati S158, S170 ja S175 alaniinidega ning vaadeldi nende asenduste mõju Ypr174c fosforüleerimisele Clb3-Cdk1 (Joonis 11.A) kui ka Cln2-Cdk1 (Joonis 11.B) poolt *Phos-Tag* SDS-PAA geelis.

Esmalt selgus, et metsiktüüpi Ypr174c valgu fosforüleerimisel nii Cln2- kui ka Clb3-Cdk1 kompleksi poolt tekivad nii ühe, kahe kui kolme fosfaadiga produktid (Joonis 11). Fosforüleerimise profiil muutus üksikute fosfosaitide mutantide puhul nii Clb3-Cdk1 kui ka Cln2-Cdk1 puhul ehk mõlemad fosforüleerivad *in vitro* S158, S170 ning S175.

Tuvastatud Clb3 seondumismotiiv ei oma spetsiifilisust Cln2 suhtes ehk *ypr174c-PxFmut* fosforüleerimine Cln2-Cdk1 poolt ei muutunud. S158, S170, S175 asendused mõjusid Clb3-Cdk1 poolt fosforüleerimisele sarnaselt, kuid Cln2-Cdk1 puhul on fosforüleerimise profiil optimaalsesse konsensusmotiivi kuuluva S158 muteerimise puhul erinev, mis võib tähendada, et Cln2-Cdk1 kompleksi puhul S158 fosforüleerimine soodustab järgnevate saitide fosforüleerimist.



Joonis 11. Ypr174c-GST fosforüleerimine Clb3-Cdk1 (A) ja Cln2-Cdk1 (B) poolt *in vitro*. Valgu erinevalt fosforüleeritud vormid on lahutatud *Phos-Tag* (50 μ M) SDS-PAA (8%) geelil. Joonisel on näitud kinaasikatse autoradiograaf. 1P, 2P, 3P viitavad valgu erinevalt fosforüleeritud vormidele.

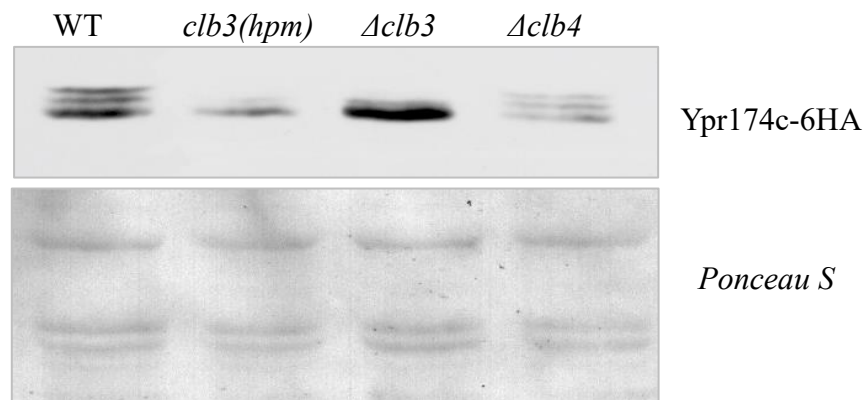
2.3.4 Ypr174c fosforüleerimine *in vivo* ja selle mõju valgu tasemele

Järgnevalt uuriti, kas Ypr174c on fosforüleeritud *in vivo* ja kas see on sõltuv Clb3 hüdrofoobsest taskust.

Selleks, et uurida, kas Ypr174c on fosforüleeritud Clb3-Cdk1 poolt *in vivo*, tehti *Western Blot* analüüs asünkroonsetest pärmikultuuridest, mis ekspresseerisid 6HA-epitoomärgisega Ypr174c liitvalku ning milles oli kas metsiktüüpi tsükliin Clb3, hüdrofoobse tasku mutatsiooniga Clb3 (*clb3(hpm)*) või *CLB3* deletsioon ($\Delta clb3$). Metsiktüüpi tsükliiniga Clb3 tüve puhul on näha, et SDS-PAA geelis on Ypr174c-6HA liitvalk lahutunud kolmeks erinevaks vormiks (Joonis 11), kusjuures niisugune jaotumine eri vormideks on sageli põhjustatud erinevalt fosforüleeritud vormide olemasolust. Nii *clb3(hpm)* kui ka $\Delta clb3$ tüvede puhul ei ole SDS-PAA geelis Ypr174c-6HA valgu kõrgemal jooksvaid vorme, mis kinnitab, et tegu on fosforüleeritud vormidega ning et Ypr174c fosforüleerimine *in vivo* vajab funktsionaalse hüdrofoobse taskuga Clb3-Cdk1 kompleksi (Joonis 12).

Võrreldes Ypr174c valgu taset, leiti, et *clb3(hpm)* puhul oli tase võrreldes metsiktüüpi tüvega madalam, kuid Clb3 deletsioonitüves oli Ypr174c tase kõrgem.

Lisaks vaadati Ypr174c taset ja fosforüleerimist *CLB4* deletsioonitüves (Joonis 12). Kuigi tase oli madalam, siis sarnaselt *in vitro* tulemusele ei oma Clb4 olulist mõju Ypr174c fosforüleerimisele. See kinnitab tsükliinide Clb3 ja Clb4 funktsionaalset diferentseerumist ka *in vivo*.



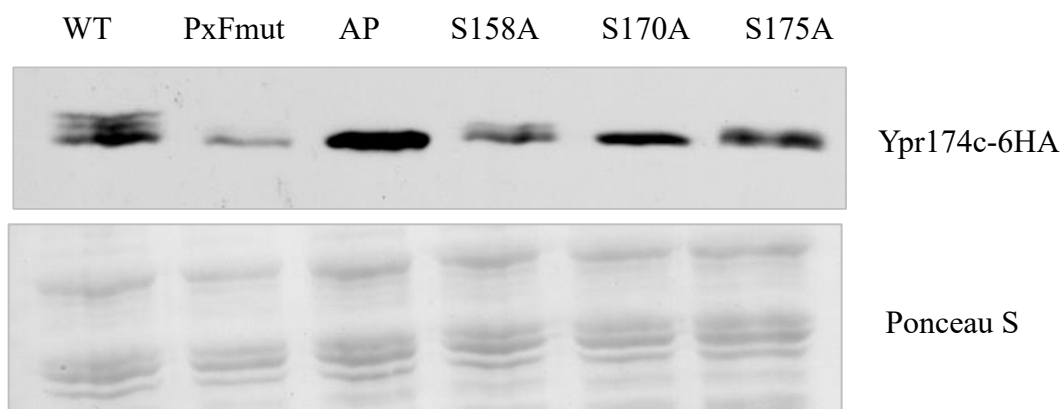
Joonis 12. Clb3-Cdk1 fosforüleerib Ypr174c valku *in vivo*. Joonisel on näidatud *Western Blot* analüüs asünkroonsetest kultuuridest, mis ekspresseerivad Ypr174c-6HA liitvalku. Valgud lüsaadis lahutati 10% SDS-PAA geelil. Alumisel pildil on laadimiskontroll, milleks on pärast valkude ülekandmist *Ponceau S* lahusega värvitud nitrotselluloosmembraan

Clb3 seondumismotiivi ning tuvastatud fosforüleerimissaitide olulisuse leidmiseks pärmirakkudes vaadeldi samuti nende mõju Ypr174c tasemele *Western Blot* meetodil. Selleks kasutati asünkroonseid kultuure, mis ekspresseerisid Ypr174c variante, milles oli kas Clb3 seondumismotiivi mutatsioon (PxFmut), kõigi Cdk1 konsensusmotiivide mutatsioon (AP) või üksikute fosforüleerimissaitide asendusalaniiniga (S158A, S170A, S175A).

Sarnaselt *in vitro Phos-Tag* SDS-PAA geelile muutus Ypr174 fosforüleerimise profiil *in vivo* nii *ypr174c-PxF* mutandi kui ka S158A, S170A ja S175A puhul (Joonis 13). Ypr174c tase alaneb Clb3 sidumissaidi mutandi puhul, sarnaselt joonisel 12 näidatud *clb3(hpm)* tüvele. Üksikute fosforüleerimismotiivide mutatsioone sisaldavad tüvede puhul kinnitati Ypr174c fosforüleerimist positsioonidel 158, 170 ja 175. Kuid Ypr174c taseme puhul ei ole olulist kõikumist võrreldes metsiktüüpi tüvega.

Kõikide Cdk1 fosforüleerimismotiivide eemaldamine mõjus vastupidiselt *ypr174c-PxF* mutandile ning Ypr174c tase *in vivo* oli võrreldes metsiktüüpi tüvega kõrgem.

Western Blot abil näidati, et Ypr174c tase *in vivo* on mõjutatud fosforüleerimisest Cdk1 poolt ja üksikud fosforüleerimismotiivide mutatsioonid ei mõju valgu stabiilsusele.



Joonis 13. Ypr174c fosforüleerimine ja tase *in vivo*. Valgud lüsaadis on lahutatud 10% SDS-PAA geelis. AP mutandi puhul on kõik viis Cdk1 konsensusmotiivi (SP) kuuluvat seriini asendatudalaniiniga (AP). Alumisel pildil on laadimiskontroll, milleks on *Ponceau S* värvilahusega värvitud nitrotselluloosmembraan.

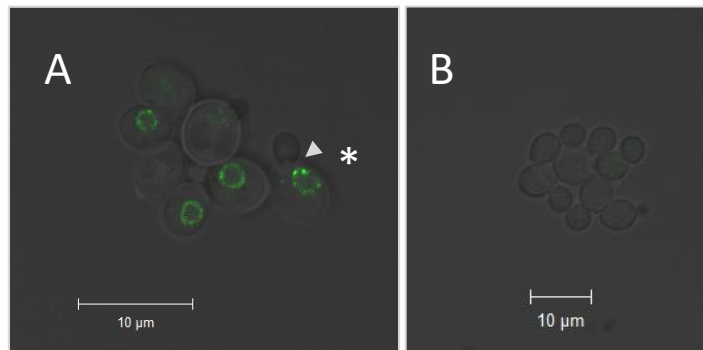
2.3.5 Ypr174c-GFP lokalisatsioon rakkudes

Järgnevalt vaadeldi Ypr174c fosforüleerimise mõju valgu lokalisatsioonile *in vivo*. Ypr174c lokaliseerub nii tuuma perifeeriasse kui ka käävi polaarkehadele (Sundin *et al.*, 2004) (Joonis 14.A). Uurimaks, kas Ypr174c fosforüleerimine Cdk1 poolt mõjutab Ypr174c lokalisatsiooni rakus, vaadeldi valgu lokalisatsiooni fluorestsentsmikroskoopia abil rakkudes, mis sisaldasid GFP-märgisega Ypr174c valku.

Asendades Ypr174c järjestuses kõik Cdk1 konsensusjärjestustes olevad seriinidalaniinidega, ei täheldanud me enam Ypr174c lokalisatsiooni tuuma perifeeriasse ega käävi polaarkehadele (Joonis 14.B). Seega Ypr174c fosforüleerimine SP-motiividel on oluline Ypr174c-GFP lokalisatsiooniks. Järgnevalt vaadati, kas üksikute fosforüleerimissaitide asendused (S158A, S170A, S175A) ning Clb3 seondumismotiivi mutatsioon (*ypr174c-PxFmut*) mõjutavad Ypr174c lokalisatsiooni, kuid ükski neist ei omanud olulist mõju Ypr174c lokalisatsioonile, vaid kõik sarnanesid metsiktüüpi Ypr174c lokalisatsioonile.

Seega üksikute Ypr174c fosforüleerimismotiivide fosforüleerimine positsioonides S158, S170 ja S175 ei ole kriitiline Ypr174c lokalisatsiooniks. Lisaks ei mõjuta Ypr174c Clb3 *hpm*-sõltuva fosforüleerimise puudumine Ypr174c lokalisatsiooni tuuma perifeeriasse ega SPB-dele.

Sellest tulenevalt võib Ypr174c lokalisatsiooniks vajalik fosforüleerimine SP motiividel toimuda mõne teise tsükliin-Cdk1 kompleksi poolt või ka mõne teise proliin-suunatud kinaasi poolt.



Joonis 14. Ypr174c-GFP valgu lokalisatsioon rakkudes. Joonisel on pildid, millel on ühildatud helevälja pilt ja GFP fluorestsentsi pilt. A) Ypr174c-GFP lokaliseerub tuuma perifeeriasse ja SPB-dele (*). B) *ypr174c-AP-GFP* puhul täheldati väga nõrka tsütoplasmaatilist GFP signaali.

2.3.6 Ypr174c mõju Cdc5 tasemele *in vivo*

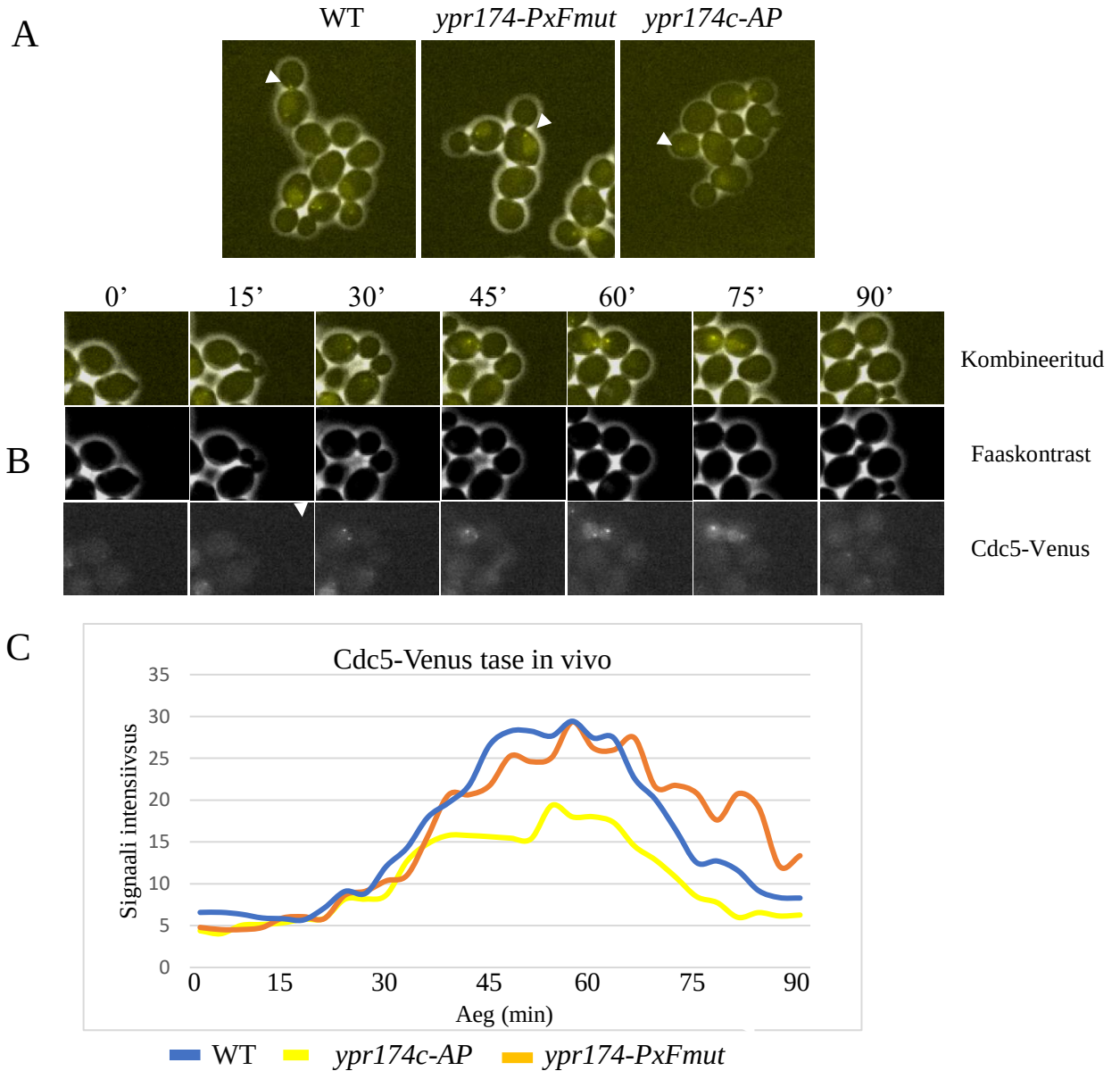
Ypr174c valgu järjestuses positsioonides 165-171 olevad aminohapped P-L-V-T-S-S-P (Pro-Val-Leu-Thr-Ser-Ser-Pro), kattuvad Polo kinaasidele omase domeeni *Polo Box* poolt ära tuntava konsensusjärjestusega [Pro/Phe]-[Φ/Pro]-[Φ]-[Thr/Gln/His/Met]-Ser-[pThr/pSer]-[Pro/X] (Φ on hüdrofoobne aminohape, p viitab sellele, et treoniin või seriin peab olema fosforüleeritud) (Elia *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2014). Samuti on pärmi kaksikhübriidi meetodi abil näidatud, et Ypr174c interakteerub Polo kinaasiga Cdc5 (Yu *et al.*, 2008). Kuna Ypr174 S170 on osa Polo kinaaside seondumismotiivist, võib selle fosforüleerimine mõjutada Cdc5 seondumist Ypr174c valguga.

Cdc5 lokaliseerub punga kaela ja käävi polaarkehadele (Song *et al.*, 2000), kus Cdc5 signaal ilmub vahetult peale käävi polaarkehade lahknemist. (Joonis 15.A, 15.B) On kirjeldatud, et Cdc5 lokalisatsioon käävi polaarkehadel on mitoosi jooksul muutuv, kusjuures on teada anafaasi ajal polaarkehadel Cdc5 valguga interakteeruv valk, aga ei ole teada, mis interaktsioon tagab Cdc5 lokalisatsiooni polaarkehadele varajases mitoosis (Botchkarev *et al.*, 2017).

Vaatamaks, kas Ypr174c võib osaleda Cdc5 lokalisatsioonil käävi polaarkehadele ning kas selleks on vajalik Ypr174c fosforüleerimine Clb3 poolt, vaadeldi ning kvantiseeriti endogeense Cdc5-Venus lokalisatsiooni ja taset eelnevalt kirjeldatud tüvedes (*ypr174c-AP*, *ypr174c-PxFmut*) aegvõtte fluorestsentsmikroskoopia abil.

ypr174c-PxFmut puhul ei täheldatud olulist mõju Cdc5 lokalisatsioonile (Joonis 15.A), samuti oli tase sarnane metsiktüüpi tüvega. Kuid erinev oli see, et Cdc5 tase püsis võrreldes metsiktüüpi tüvega kauem kõrge (Joonis 15.C).

Cdc5 taseme tõus *ypr174c-AP* tüves tõusis ja langes sarnaneselt metsiktüüpi tüve Cdc5 tasemega, kuid *ypr174c-AP* tüves oli Cdc5 tase oluliselt madalam. (Joonis 15.C) Cdc5-Venus signaalitugevus SPB-del oli võrreldes metsiktüüpi tüvega madalam, samuti tekkis signaal SPB-dele hiljem, umbes anafaasi ajal.



Joonis 15. Cdc5-Venus liitvalgu lokaliseerimine ja tase rakkudes sõltub valgust Ypr174c.

A) Näidispildid Cdc5-Venus lokaliseerimisest WT, *ypr174c-PxFmut* ja *ypr174c-AP* tüvedes. Valge nool tähistab Cdc5 signaali SPB-del. B) Näidispildid Cdc5-lokalisatsiooni ja taseme muutumisest (ajas) pärmirakkudes. Cdc5 signaal ilmub vahetult pärast SPB-de separatsiooni (30') ja degradeeritakse anafaasi lõpus (75'-90'). C) Cdc5-Venus fluorestsentssignaal ajas kvantiseeritult. Tulemuste sünkroonimiseks kvantiseeriti Cdc5 signaal rakkudes puna tekkimise hetkest. Y-teljel on aeg (minutites) ning x-teljel on fluorestsentssignaali intensiivsus.

2.3.7 Ypr174c mõju rakutsükli ajastusele

Ypr174c on paralooq valguga Nbp1, mis samuti lokaliseerub käävi polaarkedadele. Nbp1 osaleb SPB-de sisestamises tuumamembraani, olles hädavajalik SPB-de duplikatsiooni lõpuleviimiseks (Araki *et al.*, 2006). Kuigi Cdc5 täpsem funktsioon SPB-del mitoosis enne anafaasi on teadmata, on leitud, et Cdc5 mõjutab käävi polaarkedade separatsiooni, mis on vajalik käävi moodustumiseks (Park *et al.*, 2004), ja käävi positsioneerimist SPB-de vahel (Snead *et al.*, 2007).

Järgnevalt küsiti, kas Ypr174c mõjutab käävi polaarkedadega seotuid protsesse. Selleks vaadati *in vivo* aegvõtte mikroskoopia abil, kas erinevates tüvedes (*ypr174c-AP*, *ypr174c-PxFmut*, *clb3(hpm)*), *clb3/clb4(hpm)* on toimunud muutusi kahe käävi polaarkedadega seotud protsesside ajastuses rakutsükli. Esimesena vaadati aega, mis kulus SPB-de separatsiooni toimumiseks alates G1/S üleminekust. Teiseks vaadati aega, mis kulus käävi polaarkedade lahknemisest metafaas-anafaas üleminekuni, kui toimub käävi elongatsioon (Joonis 16.A)

Käävi polaarkedade visualiseerimiseks kasutati GFP-märgisega SPB-le lokaliseeruvat valku Spc42 ning rakutsükli staadiumi markerina mCherry-märgisega NLS-moodulit (Liku, 2005), mille lokaliseerimine tuuma ja tsütoplasma vahel sõltub Cdk1 aktiivsusest. G1-faasis on mCherry-märgisega NLS-moodul tuumas, Cdk1 aktiivsuse tõustes G1/S üleminekul eksporditakse tuumast ning pärast anafaasi, kui tsükliinid on degradeeritud, NLS-moodul defosforüleeritakse ning koguneb jälle tuuma (Liku *et al.*, 2005).

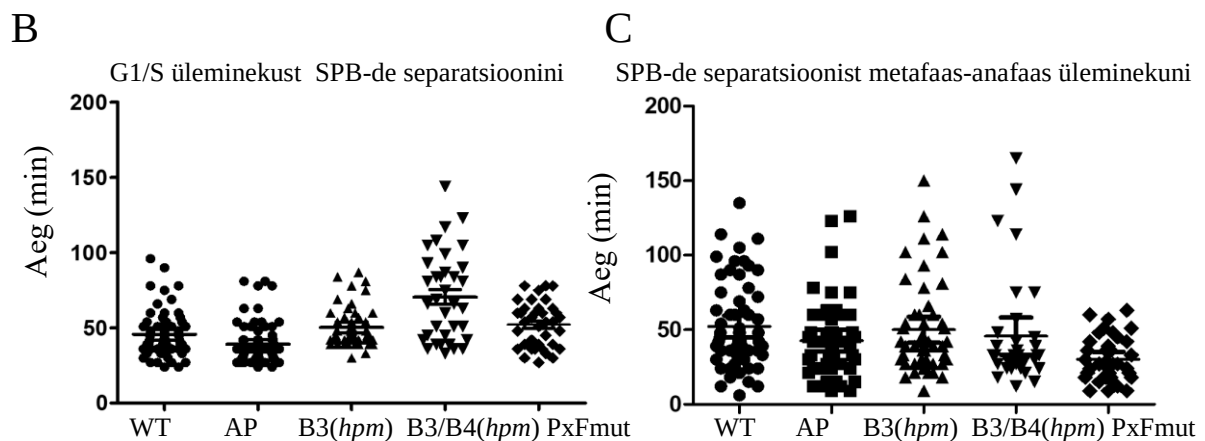
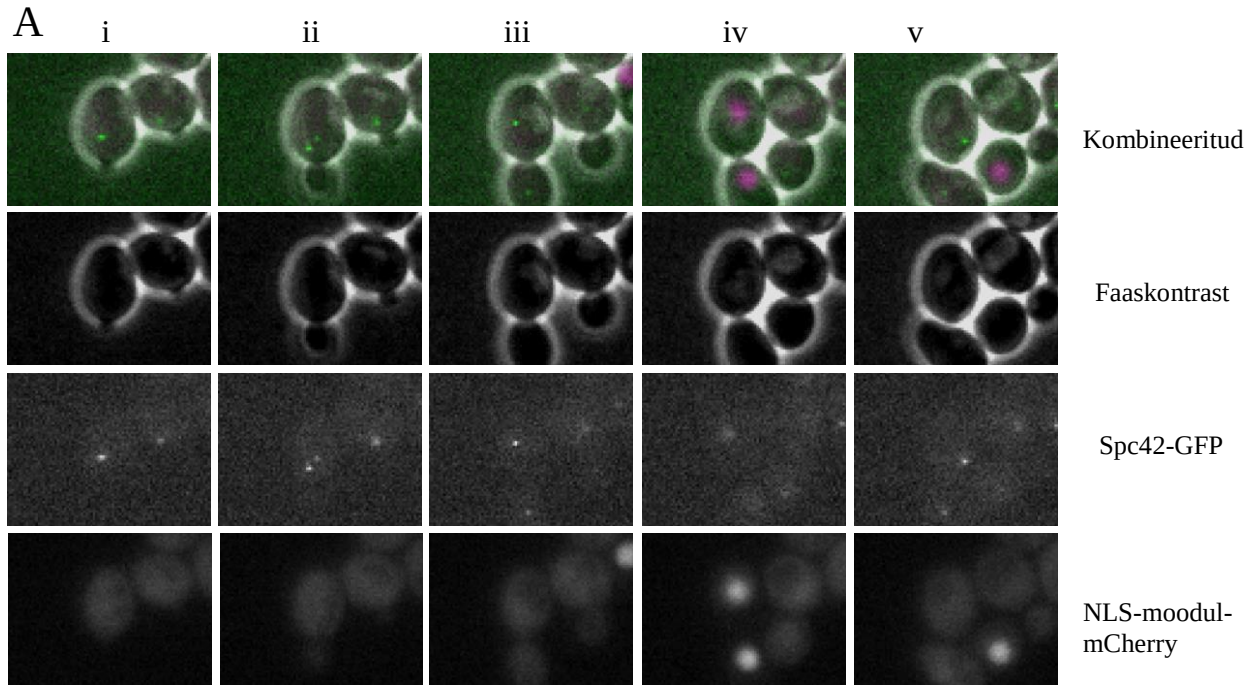
Keskmine aeg, mis kulus metsiktüüpi tüve puhul G1/S üleminekust SPB-de separatsiooni toimumiseks oli umbes 45 minutit (Joonis 16.B) ja järgnevalt metafaas-anafaas üleminekuni kulutatud aeg oli keskmiselt 55 minutit (Joonis 16.C).

clb3(hpm) tüve puhul on väike (umbes 5 minutiline) viivitus SPB-de separatsiooni toimumisel (Joonis 16.B), kuid see kompenseeritakse järgnevas etapis ehk SPB-de separatsioonist käävi elongatsioonini kuluv aeg on võrreldes metsiktüüpi tüvega keskmiselt viis minutit lühem (Joonis 16.C).

clb3/clb4(hpm) tüve puhul oli G1/S üleminekust SPB-de separatsioonile kulunud aeg keskmiselt 15 minutit pikem (Joonis 16.B), kuid sarnaselt *clb3(hpm)* tüvele kompenseeriti viivitus järgnevas etapis ja aeg SPB-de separatsioonist metafaas-anafaasini oli keskmiselt 15 minutit lühem (Joonis 16.C)

ypr174c-AP tüve puhul oli SPB-de separatsioonile kulunud aeg keskmiselt 5 minutit lühem (Joonis 16.B) ning samuti toimus SPB-de lahknemine keskmiselt 10 minutit kiiremini (Joonis 16.C).

ypr174c-Px F_{mut} tüve puhul oli sarnaselt *clb3(hpm)* tüvele SPB-de separatsioonile kulunud aeg keskmiselt umbes 5 minutit pikem (Joonis 16.B), kuid metafaas-anafaas üleminekuni kulunud aeg oli sarnaselt *clb3/clb4(hpm)* tüvele (keskmiselt 20 minutit) lühem (Joonis 16.C).



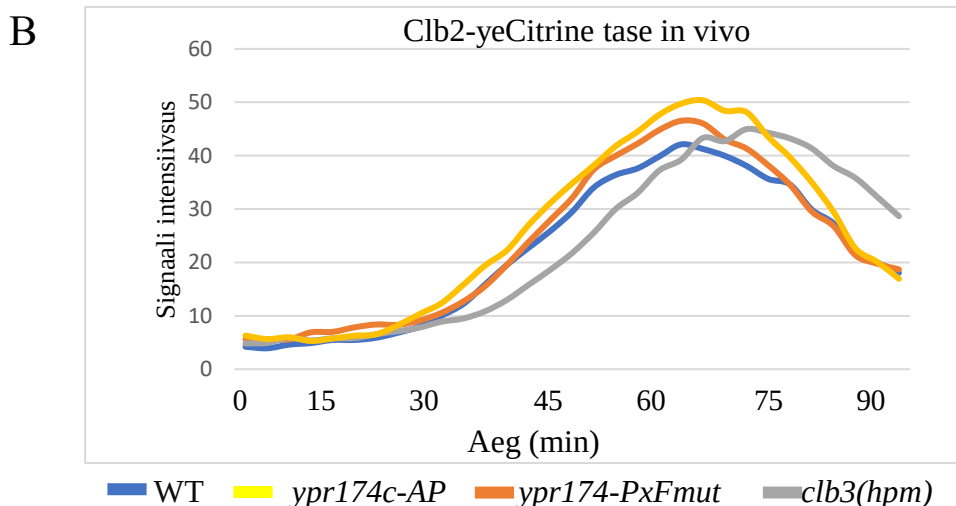
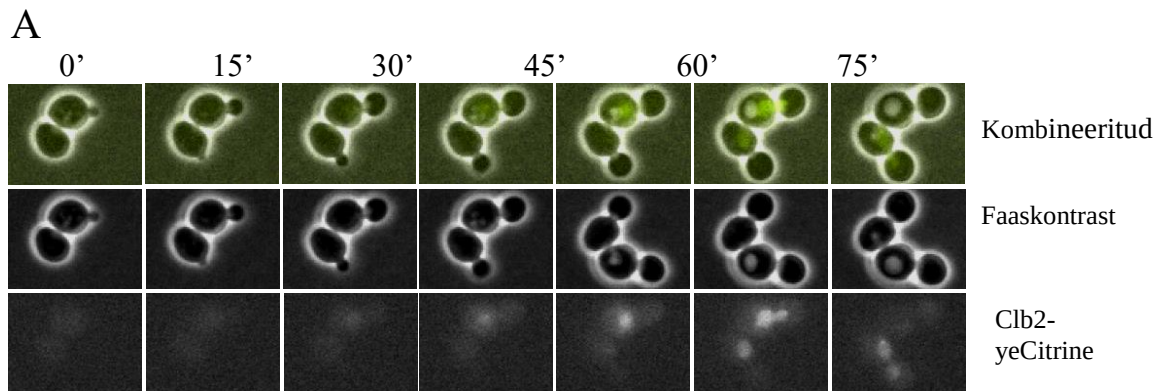
Joonis 16. Ypr174c, CLB3 ja CLB4 mutantide mõju rakutsükli ajastamisele.

A) Fluorestsentsmikroskoopia aegvõtte näidispidid WT tüvest. Piltidelt on näha SPB-de separatsioon (ii), metafaas-anafaas üleminek (iii). NLS-mooduli akumulatsioon tuuma (iv) ja NLS-mooduli eksport (i,v) B, C) Hajuvusdiagrammid, mille x-teljel on analüüsitud tüvi ning y-teljel aeg (minutites), mis kulus NLS-lahkumisest G1/S üleminekul SPB-de separatsioonini (B) või SPB-de separatsioonist metafaas-anafaas üleminekuni (C).

2.3.8 Ypr174c mõju Clb2 tasemele

Kirjanduses kirjeldati Cdc5 osalust Clb2 ekspressiooni reguleerimises. Samuti on teada, et Clb2 mõõdukas üleekspressioon kiirendab mitoosi (Oikonomou ja Cross, 2011). Vaatamaks, kas *ypr174c-AP* või *ypr174c-PxFmut* tüves täheldatud rakutsükli kiirenemine võis tulla Clb2 taseme tõusust Cdc5 vahendusel, ekspresseeriti endogeenselt Clb2-yeCitrine liitvalku ning vaadeldi *in vivo* aegvõtte fluorestsentsmikroskoopia abil Clb2 taseme muutumist ajas (Joonis 17.A) *clb3(hpm)* ning *ypr174c-AP* ja *ypr174c -PxFmut* tüvedes.

ypr174c-AP ja *PxFmut* tüvede puhul oli Cdc5 tase võrreldes metsiktüüpi tüvega kõrgem, sealjuures AP puhul oli taseme erinevus suurem. *clb3(hpm)* tüve puhul oli alguses Clb2 tase võrreldes metsiktüüpi tüvega madalam, kuid viivitusega saavutas lõpuks normaalse taseme. (Joonis 17.B)



Joonis 17. Clb2-yeCitrine fluorestsentsignaali ajas. A) Näidispildid Clb2-yeCitrine fluorestsentsmikroskoopia aegvõtte katsest (WT tüves) illustreerimaks graafikut B. B) Kvantiseeritud Clb2-yeCitrine tase *in vivo*. X-teljel on fluorestsentsignaali intensiivsus, y-teljel on aeg (minutites). Rakkude sünkroniseerimiseks kvantiseeriti fluorestsentsignaaliid 30 ajapunkti ehk 90 minuti jooksul alates punga tekkest.

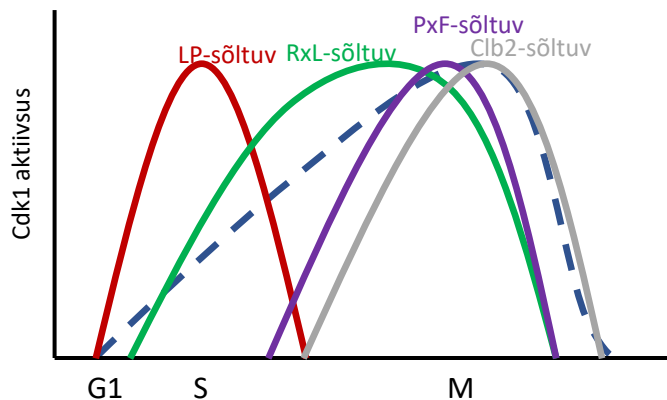
2.4 Arutelu

2.4.1 Tsükliin-substraat seondumismotiivid on olulised ka mitootilistel tsükliinidel

Senised CDK aktiivsust ja rakutsükli regulatsiooni käsitlenud artiklid (Bhaduri ja Pryciak, 2011; Kõivomägi *et al.*, 2011b; Swaffer *et al.*, 2016), on olnud arvamusel, et CDK aktiivsuse muutlikkus, näiteks tsükliinide varieeruva ekspressiooni tulemusena, on piisav rakutsükli normaalseks progressiooniks ning et substraatide spetsiifilised seondumismotiivid on vajalikud, et kompenseerida varajaste ja madala aktiivsusega G1- ja S-faasi CDK-komplekside aktiivsust.

Antud töös näidati, et ka mitootiline tsükliin Clb3 vajab oma funktsioonide täitmiseks hüdrofoobsest taskust sõltuvaid interaktsioone. Teiseks leiti, et tsükliinid Clb3 ja Clb4 suunavad Cdk1 kompleksi fosforüleerima erinevaid substraate, mis võib tähendada, et ka Clb4-Cdk1 kompleksil on rakus spetsiifilised substraatvalgud (Joonis 8). Isegi Clb2, mis on võrreldes teiste tsükliinidega *in vivo* kõrgema aktiivsusega, vajab spetsiifilist tsükliin-substraat seondumist kindlate substraatide fosforüleerimiseks (Mihkel Örd, avaldamata). Seega ei ole seondumismotiivid vajalikud ainult, et kompenseerida varajaste CDK-kompleksi aktiivsust, vaid enamuse (kui mitte kõik) tsükliin-CDK komplekse kasutavad spetsiifilisi seondumismotiive.

Kui rakutsükli kvantitatiivsest mudelist lähtudes toimub rakutsükli jooksul CDK aktiivsuse tõus ja see tagab protsesside kulgemise õige järjekorra, siis tsükliin-spetsiifiline fosforüleerimine võimaldab palju mitmekesisemat Cdk1 aktiivsuse muutumist kindlate substraatvalkude suhtes rakutsükli jooksul (Joonis 18). Näiteks kui hilises G1-faasis on üldine Cdk1 aktiivsus väga madal, siis aktiivsus LLPP-motiiviga substraatide suhtes võib olla väga kõrge, sest G1-faasi Cdk1 kompleksid fosforüleerivad spetsiifiliselt just neid valke. Seega tsükliin-spetsiifiline fosforüleerimine omakorda suurendab Cdk1 aktiivsuse vahemikku erinevate substraatide suhtes rakutsükli jooksul. Suurem aktiivsuste vahemik võimaldab täpsemalt määrata, mis hetkedel Cdk1 mingeid protsesse käivitab, ning vähendab juhuslikkusest ja Cdk1 aktiivsuse kõikumistest tulenevaid kõrvalekaldeid rakutsükliis.



Joonis 18. Cdk1 aktiivsuse muutumine rakutsükli jooksul. Cdk1 seondub rakutsükli jooksul üheksa erineva tsükliiniga, mis mõjutavad Cdk1 aktiivsust spetsiifiliste substraatide suhtes. Rakutsükli jooksul Cdk1 üldine aktiivsus tõuseb, olles madalaim G1-faasis ja kõrgeim M-faasis (sinine katkendlik joon). Erinevad tsükliin-substraat seondumismotiivid suurendavad Cdk1 kompleksi aktiivsust kindlate substraatide suhtes: G1-tsükliinide puhul LLPP motiiv, S-faasi tsükliinidel RxL motiiv, Clb3 puhul PxP motiiv ning on kirjeldatud ka Clb2-spetsiifiline seondumismotiiv.

Antud töös vaadeldi otseselt ainult ühe Clb3-Cdk1 hp-sõltuva fosforüleerimise olulisust *in vivo*, kuid huvitav oleks ka vaadata kas ja kuidas mõjutab Clb3-Cdk1 hüdrofoobsest taskust sõltuv fosforüleerimine transkriptsioonifaktoreid Tos4, Ash1 ning Ndd1 *in vivo*. Ndd1 järjestuses ei ole PxP motiivi, seega on võimalik, et selle substraadi puhul kasutab Clb3 hüdrofoobsest taskuvast sõltuvalt mõnda RxL-sarnast järjestust.

2.4.2 Ypr174c fosforüleerimine on vajalik valgu lokaliseerimiseks

Asendades Ypr174c järjestuses kõik viis Cdk1 konsensusmotiivi kuuluvad seriinid alaniinidega, kadus Ypr174c valgule iseloomulik lokaliseerimine tuuma perifeerias ja käävi polaarkehadel ning rakus oli detekteeritav ainult nõrk tsütoplasmaatiline GFP-signaali (Joonis 14.B). *Western Blot* analüüs näitas, et *in vivo* oli sellise Ypr174c valguga võrreldes metsiktüüpi valguga kõrgem (Joonis 13), seega ei tulene nõrk fluorestsentsignaali valguga ebastabiilsusest, vaid Ypr174c fosforüleerimise puudumine SP motiivides mõjutab Ypr174c valguga lokaliseerumist tuuma membraani ja SPB-dele.

On võimalik, et *ypr174c-AP* on tsütoplasmaatiline ja Ypr174c fosforüleerimine SP motiividel on vajalik Ypr174c püsivaks lokaliseerimiseks tuuma ja seega vastavatele struktuuridele.

Kuigi Cln2-Cdk1 aktiivsus Ypr174c suhtes *in vitro* oli kordades madalam (Joonis 8) võrreldes Clb3-Cdk1 aktiivsusega, on võimalik, et Ypr174c fosforüleeritakse *in vivo* tsütoplasmaatilise Cln2-Cdk1 poolt.

Üksikute fosforüleerimismotiivide mutatsioonid ei mõjutanud Ypr174c lokalisatsiooni, seega ei ole teada, millised SP-motiivid on vajalikud Ypr174c lokalisatsiooniks. Võimalik, et lokalisatsiooniks on olulised hoopis S69 ja S211, või hoopis mitte ükski konkreetne SP-motiiv ja piisab kui ükskõik milline neist on fosforüleeritud.

Samuti ei mõjutanud lokalisatsiooni Clb3 sidumissaidi mutatsioon, seega Clb3 hüdrofoobsest taskust sõltuv Ypr174c fosforüleerimine ei ole hädavajalik Ypr174c lokalisatsiooniks.

Kuigi Clb3-Cdk1 fosforüleerimise aktiivsus Ypr174c suhtes *in vitro* oli kordades kõrgem, võrreldes teiste kasutatud tsükliin-Cdk1 kompleksidega, ei saa välistada nende komplekside võimekust fosforüleerida Ypr174c *in vivo* (Joonis 8). *Western Blot* analüüsides joonisel 12 on näha, et mõningane Ypr174c fosforüleerimine säilib ka tüvedes, milles ei ekspresseeru funktsionaalse hüdrofoobse taskuga tsükliin Clb3.

2.4.3 Ypr174c mõjutab Cdc5 lokalisatsiooni käävi polaarsele

Cdc5 lokaliseerub käävi polaarsele. Ypr174c lokalisatsiooni puudumine SPB-del *ypr174c-AP* tüve puhul vähendas Cdc5-yeVenus fluorestsentssignaali SPB-del, seega Ypr174c mõjutab Cdc5 lokalisatsiooni (Joonis 15.C). Cdc5-Venus signaal SPB-del ei puudunud täielikult (joonis 15.C), järelikult on Ypr174c ainult üks valkudest, mille kaudu toimub Cdc5 lokalisatsioon SPB-dele. Hetkel on teadmata, kas Ypr174c on vajalik Cdc5 esmaseks interaktsiooniks ja lokalisatsiooniks käävi polaarsele või hoopiski Cdc5 valgu lokalisatsiooni stabiliseerimiseks SPB-del.

Clb3 PxP motiivist sõltuv Ypr174c fosforüleerimine ei omanud mõju Cdc5 lokalisatsioonile ega tasemele (Joonis 15.C). Kuna Cdc5 interaktsiooniks vajaliku *Polo Box* domääniga seonduv S170 peab olema fosforüleeritud, viiakse see *in vivo* läbi ilmselt mõne teise tsükliin-Cdk1 kompleksi poolt (näiteks Clb2-Cdk1) või hoopiski mõne teise proliin-suunatud kinaasi poolt. Kuigi ei saa välistada, et Ypr174c S170 fosforüleerimine Cdc5 interaktsiooniks ei ole tavapäraselt Clb3-Cdk1 funktsioon.

Kinnitamaks, et Ypr174c interaktsioon valguga Cdc5 on otsene ning S170 fosforüleerimine mõjutab interaktsiooni, oleks vaja näidata puhastatud valkudega interaktsiooni *in vitro*.

Metsiktüüpi tüve puhul hakkas Cdc5 signaal tõusma rakus 30 minutit pärast punga teket ning langema umbes 60 minutit pärast punga teket. *ypr174c-PxFmut* tüves tõusis Cdc5 signaal sarnaselt metsiktüüpi tüvele, kuid Cdc5 taseme langus toimus aeglasemalt ja G1-faasi omase taseme saavutamine toimus viivitusega (Joonis 15.C).

Cdc5 degradeeritakse anafaasis APC/C-Cdh1 kompleksi poolt (Simpson-Lavy ja Brandeis, 2011). Cdh1 on varajases mitoosis ja anafaasis inhibeeritud Cdc5 ja B-tüüpi tsükliin-Cdk aktiivsuse poolt ja Cdh1 aktiveerimiseks on vaja see defosforüleerida, mis viiakse läbi fosfataasi Cdc14 poolt (Simpson-Lavy, Zenvirth ja Brandeis 2015). Enne anafaasi on Cdc14 kompleksis inhibiitorvalguga Net1, mis limiteerib Cdc14 lokalisatsiooni tuumakesse. Varajases anafaasis vabastatakse osa Cdc14 tuuma ja tsütoplasmasse FEAR (i.k Cdc14 early anaphase release) signaaliraja abil, hilises anafaasis vabastab Cdc14 tuuma MEN (i.k mitotic exit network) signaalirada (Dumitrescu ja Saunders, 2002). Cdc5 on nii FEAR kui ka MEN radade komponent. Arvatakse, et Cdc5 fosforüleerib valgu Net1, mis alandab Net1 afiinsust Cdc14 suhtes ja seega osaleb Cdc5 Cdc14 vabastamises (Yoshida ja Toh-e, 2002). FEAR võrgustiku mutantide puhul on mitoosist väljumine 10-20 minutit viivitatud (Tomson *et al.*, 2009). Kas *ypr174c-PxFmut* tüve puhul täheldatud Cdc5 viivitatud degradatsioon on seotud FEAR võrgustiku hilise aktiveerimisega või puudumisega, vajab uurimist.

Huvitav on see, et *ypr174c-AP* tüves sarnast viivitust ei täheldatud (Joonis 15.C) ehk Ypr174c fosforüleerimine ei mõjuta Cdc5 potentsiaalset funktsiooni FEAR võrgustikus. Alternatiivselt on võimalik, et Ypr174c PxF motiiv on vajalik Clb3-Cdk1 sidumiseks, kuid mitte Ypr174c fosforüleerimiseks, vaid vahendamaks interaktsiooni Clb3-Cdk1 ja kolmanda valgu vahel, milleks võib olla Cdc5 ise. Rodriguez-Rodriguez *et al.*, näitasid 2016. aastal, et Net1 fosforüleerimine Cdc5 poolt toimub tänu Cdc5 fosforüleerimisele Clb2-Cdk1 poolt (Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2016), mis on tõenäoline, kuna Clb2 lokaliseerub SPB-dele (Bailly, 2003) ning on võrreldes teiste B-tüüpi tsükliinidega aktiivsem. Siiski ei saa nende tulemuste põhjal välistada, et Clb3 ei oma olulisust Cdc5 aktivatsioonis ning et Ypr174c võib põhjustada Clb3-Cdk1 ja Cdc5 kolokalisatsiooni, mis võib võimaldada Cdc5 fosforüleerimist Clb3-Cdk1 poolt.

2.4.4 Clb3-Cdk1 ja Ypr174c osalevad *CLB2* transkriptsiooni regulatsioonis

ypr174c-AP tüve puhul oli Cdc5 tase võrreldes metsiktüüpi tüvega madalam ning Cdc5 signaal SPB-del nõrgem (Joonis 15.A, 15.C). Lisaks oli *ypr174c-AP* tüve võrreldes metsiktüüpi tüvega kiirem mitoos, kuna SPB-de lahknemisest metafaas-anafaas üleminekuni kulus vähem aega (Joonis 16.B). *ypr174c-AP* tüves oli Clb2 tase kõrgem ja nagu eelnevalt mainitud, on näidatud, et Clb2 mõõduka üleekspressiooni korral on mitoos normaalsest kiirem,

Cdc5 mõjutab positiivselt *CLB2* transkriptsiooni, fosforüleerides *CLB2* geeniklastrit aktiveerivat valku Ndd1. Ndd1 on tuumas laiali ning ei lokaliseeru kindlatele struktuuridele (Yelamanchi *et al.*, 2014). Lähtudes kõigele eelmainitule, on võimalik, et *ypr174c-AP* puhul ei ole Cdc5 tase tuumas madalam, vaid Cdc5 on tuumas laiali ja mitte piiratud SPB-dele, mistõttu on kvantiseeritav signaal madalam.

Kas Ypr174c osaleb *CLB2* geeniklastri transkriptsiooni regulatsioonis Cdc5 vahendusel, sidudes Cdc5 käävi polaarsele, mis vähendab Cdc5 hajusat lokalisatsiooni tuumas ning seejärel takistab varajast *CLB2* geeniklastri transkriptsiooni või käitub Ypr174c hoopis negatiivse regulaatorina transkriptsiooni ajal, et hoida mingisugust kindlat transkriptsiooni baastaset.

Tüves, mis ekspresseeris Clb3 hüdrofoobse tasku mutanti, toimus Clb2-yeCitrine valgu taseme akumulatsioon hiljem kui metsiktüüpi tüves (Joonis 16). Joonisel 7 esitatud kinaasikatsetest selgus, et transkriptsioonifaktorid Ndd1, Plm2, Tos4 on Clb3-spetsiifilised Cdk1 substraadid, mille kiireks fosforüleerimiseks oli vajalik tsükliini funktsionaalne hüdrofoobne tasku. Sellest lähtudes võib oletada, et *CLB2* geeniklastri transkriptsiooni aktivatsioon toimub osaliselt ka läbi nende valkude Clb3-sõltuva fosforüleerimise.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärkideks oli analüüsida Clb3-Cdk1 ja Clb4-Cdk1 substraatide fosforüleerimise tsükliin-spetsiifilisust ning kirjeldada Clb3-spetsiifilist fosforüleerimist vahendav seondumismotiiv valgus Ypr174c. Lisaks uuriti, kas Ypr174c on fosforüleeritud Cdk1 poolt *in vivo* ning analüüsiti Ypr174c fosforüleerimise olulisust *S. cerevisiae* rakkudes.

In vitro kinaasikatsetega näidati, et lisaks eelnevalt kirjeldatud Clb3-spetsiifilistele substraatidele on ka valkude Ndd1, Plm2 ja Sic1ΔC fosforüleerimine sõltuv tsükliini hüdrofoobsest taskust. Lisaks näidati, et Clb3 ja Clb4 suunavad tsükliin-Cdk1 kompleksi fosforüleerima erinevaid substraate ja Clb3-spetsiifilised substraadid fosforüleeritakse Clb4-Cdk1 kompleksi poolt suhteliselt aeglaselt.

Lisaks kirjeldati Clb3-spetsiifiline seondumismotiiv konsensusliku järjestusega PxxPxP käävi polaarkedaga kolokaliseeruva valgus Ypr174c ning näidati, et Ypr174c on fosforüleeritud Clb3-Cdk1 poolt *in vivo*. Ypr174c fosforüleerimine *in vivo* on sõltuv leitud seondumismotiivist ning Clb3 hüdrofoobsest taskust, millest võib järeldada, et leitud motiiv seondub tsükliini hüdrofoobsesse taskusse. See näitab, et ka hilised tsükliinid vajavad spetsiifilised seondumismotiivid.

Fluorestsentsmikroskoopia abil näidati, et Ypr174c fosforüleerimine SP-saitidel on oluline Ypr174c lokaliseerimiseks tuuma perifeeriasse ja käävi polaarkedadele. Üksikute fosforüleerimissaitide fosforüleerimine positsioonides S158, S170, S175 ei ole kriitiliselt vajalik Ypr174c lokaliseerimiseks ning lisaks ei mõjuta Clb3-hpm sõltuva fosforüleerimise puudumine oluliselt Ypr174c lokaliseerimist, seega vajavad Ypr174c lokaliseerimiseks vajalikud mehhanismid veel selgitamist.

Fluorestsentsmikroskoopia abil näidati ka, et Ypr174c fosforüleerimine mõjutab Polo kinaasi Cdc5 lokaliseerimist ja taset rakus, olles Cdc5 potentsiaalne interaktsioonipartner käävi polaarkedadel varajases mitoosis. Lisaks oli erinevate Ypr174c mutantsete tüvede puhul mitoos kiirem ning Clb2 tase kõrgem. On näidatud, et Cdc5 aktiveerib *CLB2* geeniklastrit ning Clb2 kõrgem ekspressioon kiirendab mitootilisi protsesse, mistõttu on võimalik, et Ypr174c osaleb kaudselt *CLB2* geeniklastri transkriptsiooni regulatsioonis Cdc5 vahendusel.

Mapping of Clb3-Cdk1 specific docking motif on substrate protein Ypr174c and analysis of Ypr174c phosphorylation

Tuuliki Ojala

Summary

Cell cycle regulation is driven by cyclin-dependent kinases (CDKs). CDK activation itself is regulated by cyclins and together they promote distinct cell cycle events. It is suggested that cyclins are redundant and periodic activation of the cell cycle is dependent on quantitative changes in CDK activity and not on specific interactions between substrates and cyclin-CDK complexes. However, multiple papers have defined specific docking motifs that enhance the substrate phosphorylation of individual cyclin-CDK complexes, suggesting that early cyclin-CDK complexes compensate for their low activity by using specific docking motifs on substrates. In addition, multiple cyclin specific substrates have been discovered and even though there's an overlap in the ability of different cyclin-CDK to phosphorylate certain substrates, clear functional differences have been found.

The aim of this thesis was to show that cyclin paralogues Clb3 and Clb4 are functionally different and that reliance on using docking motifs is not confined to only early (G1-phase) cyclin-CDK complexes. In addition, this paper describes a novel docking motif used by Clb3, to facilitate Clb3-Cdk1 phosphorylation of a spindle pole body localized protein Ypr174c, both *in vitro* and *in vivo*. Importance of Ypr174c in *Saccharomyces cerevisiae* is unknown, but current data proposes that Ypr174c might be involved in tethering Polo kinase Cdc5 to spindle pole bodies and that binding is dependent on Ypr174c phosphorylation by cyclin-CDK. More research is needed to uncover specific mechanisms and importance regarding this interaction.

Kirjanduse loetelu

Adams, P.D., Sellers, W.R., Sharma, S.K., Wu, A.D., Nalin, C.M., ja Kaelin, W.G. (1996). Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol. Cell. Biol.* 16: 6623–6633.

Albuquerque, C.P., Smolka, M.B., Payne, S.H., Bafna, V., Eng, J., ja Zhou, H. (2008). A Multidimensional Chromatography Technology for In-depth Phosphoproteome Analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 7: 1389–1396.

Amon, A., Tyers, M., Futcher, B., ja Nasmyth, K. (1993). Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell* 74: 993–1007.

Araki, Y., Lau, C.K., Maekawa, H., Jaspersen, S.L., Giddings, T.H., Schiebel, E., ja Winey, M. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* Spindle Pole Body (SPB) Component Nbp1p Is Required for SPB Membrane Insertion and Interacts with the Integral Membrane Proteins Ndc1p and Mps2p. *Mol. Biol. Cell* 17: 1959–1970.

Archambault, V., Chang, E.J., Drapkin, B.J., Cross, F.R., Chait, B.T., ja Rout, M.P. (2004). Targeted proteomic study of the cyclin-Cdk module. *Mol. Cell* 14: 699–711.

Baetz, K., ja Andrews, B. (1999). Regulation of cell cycle transcription factor Swi4 through auto-inhibition of DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 19: 6729–6741.

Bailly, E. (2003). Differential cellular localization among mitotic cyclins from *Saccharomyces cerevisiae*: a new role for the axial budding protein Bud3 in targeting Clb2 to the mother-bud neck. *J. Cell Sci.* 116: 4119–4130.

Basco, R.D., Segal, M.D., ja Reed, S.I. (1995). Negative regulation of G1 and G2 by S-phase cyclins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15: 5030–5042.

Bhaduri, S., ja Pryciak, P.M. (2011). Cyclin-specific docking motifs promote phosphorylation of yeast signaling proteins by G1/S Cdk complexes. *Curr. Biol.* 21: 1615–1623.

Bhaduri, S., Valk, E., Winters, M.J., Gruessner, B., Loog, M., ja Pryciak, P.M. (2015). A docking interface in the cyclin Cln2 promotes multi-site phosphorylation of substrates and timely cell-cycle entry. *Curr. Biol.* 25: 316–325.

- Bloom, J., ja Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 149–160.
- De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgant, D.O., ja Kim, S.-H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363: 595–602.
- Botchkarev, V. V, Garabedian, M. V, Lemos, B., Paulissen, E., ja Haber, J.E. (2017). The budding yeast Polo-like kinase localizes to distinct populations at centrosomes during mitosis. *Mol. Biol. Cell* 28: 1011–1020.
- Brown, N.R., Korolchuk, S., Martin, M.P., Stanley, W.A., Moukhametzianov, R., Noble, M.E.M., ja Endicott, J.A. (2015). CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK. *Nat. Commun.* 6: 6769.
- De Bruin, R.A.M., McDonald, W.H., Kalashnikova, T.I., Yates, J., ja Wittenberg, C. (2004). Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell* 117: 887–898.
- Connell-Crowley, L., Solomon, M.J., Wei, N., ja Harper, J.W. (1993). Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A in vitro. *Mol. Biol. Cell* 4: 79–92.
- Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach* (Sinauer Associates).
- Cross, F.R., ja Jacobson, M.D. (2000). Conservation and function of a potential substrate-binding domain in the yeast Clb5 B-type cyclin. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4782–4790.
- Cross, F.R., Yuste-Rojas, M., Gray, S., ja Jacobson, M.D. (1999). Specialization and targeting of B-type cyclins. *Mol. Cell* 4: 11–19.
- Cvrvkovci, F., ja Nasmyth, K. (1993). Yeast G1 cyclins CLN1 and CLN2 and a GAP-like protein have a role in bud formation. *EMBO J.* 1: 5277–5286.
- Dahmann, C., Diffley, J.F.X., ja Nasmyth, K.A. (1995). S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr. Biol.* 5: 1257–1269.
- Darieva, Z., Bulmer, R., Pic-Taylor, A., Doris, K.S., Geymonat, M., Sedgwick, S.G., Morgan, B.A., ja Sharrocks, A.D. (2006). Polo kinase controls cell-cycle-dependent transcription by

targeting a coactivator protein. *Nature* 444: 494–498.

Darieva, Z., Bulmer, R., Pic-Taylor, A., Doris, K.S., Sedgwick, S.G., Morgan, B.A., ja Sharrocks, A.D. (2007). Polo Kinase Controls Cell Cycle-Dependent Transcription by Direct Targeting of a Coactivator Protein. *Nature* 444: 494–498.

Dirick, L., Böhm, T., ja Nasmyth, K. (1995a). Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 4803–4813.

Dirick, L., Böhm, T., ja Nasmyth, K. (1995b). Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 4803–4813.

Doncic, A., Eser, U., Atay, O., ja Skotheim, J.M. (2013). An Algorithm to Automate Yeast Segmentation and Tracking. *PLoS One* 8: e57970.

Dumitrescu, T.P., ja Saunders, W.S. (2002). The FEAR Before MEN: Networks of Mitotic Exit. *Cell Cycle* 1: 304–307.

Ear, P.H., Booth, M.J., Abd-Rabbo, D., Kowarzyk Moreno, J., Hall, C., Chen, D., Vogel, J., ja Michnick, S.W. (2013). Dissection of Cdk1-cyclin complexes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110: 15716–15721.

Echalier, A., Endicott, J.A., ja Noble, M.E.M. (2010). Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804: 511–519.

Elia, A.E.H., Rellos, P., Haire, L.F., Chao, J.W., Ivins, F.J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., ja Yaffe, M.B. (2003). The Molecular Basis for Phosphodependent Substrate Targeting and Regulation of Plks by the Polo-Box Domain. *Cell* 115: 83–95.

Epstein, C.B., ja Cross, F.R. (1992). CLB5: A novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev.* 6: 1695–1706.

Fitch, I., Dahmann, C., Surana, U., Amon, A., Nasmyth, K., Goetsch, L., Byers, B., ja Futcher, B. (1992). Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 3: 805–818.

Geymonat, M., Spanos, A., Wells, G.P., Smerdon, S.J., ja Sedgwick, S.G. (2004). Clb6/Cdc28 and Cdc14 regulate phosphorylation status and cellular localization of Swi6. *Mol. Cell. Biol.* 24:

2277–2285.

Ghiara, J.B., Richardson, H.E., Sugimoto, K., Henze, M., Lew, D.J., Wittenberg, C., ja Reed, S.I. (1991). A cyclin B homolog in *S. cerevisiae*: Chronic activation of the Cdc28 protein kinase by cyclin prevents exit from mitosis. *Cell* 65: 163–174.

Grandin, N., ja Reed, S.I. (1993a). Differential function and expression of *Saccharomyces cerevisiae* B-type cyclins in mitosis and meiosis. *Mol. Cell. Biol.* 13: 2113–2125.

Grandin, N., ja Reed, S.I. (1993b). Differential function and expression of *Saccharomyces cerevisiae* B-type cyclins in mitosis and meiosis. *Mol. Cell. Biol.* 13: 2113–2125.

Haase, S.B., Winey, M., ja Reed, S.I. (2001). Multi-step control of spindle pole body duplication by cyclin-dependent kinase. *Nat. Cell Biol.* 3: 38–42.

Hadwiger, J.A., Wittenberg, C., Richardson, H.E., de Barros Lopes, M., ja Reed, S.I. (1989). A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 6255–6259.

Hodge, A., ja Mendenhall, M. (1999). The cyclin-dependent kinase inhibitory domain of the yeast Sic1 protein is contained within the C-terminal 70 amino acids. *Mol. Gen. Genet.* 262: 55–64.

Holt, L.J., Tuch, B.B., Villen, J., Johnson, A.D., Gygi, S.P., ja Morgan, D.O. (2009). Global analysis of cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science* (80-.). 325: 1682–1686.

Horak, C.E., Luscombe, N.M., Qian, J., Bertone, P., Piccirillo, S., Gerstein, M., ja Snyder, M. (2002). Complex transcriptional circuitry at the G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 16: 3017–3033.

Huang, D., Kaluarachchi, S., Van Dyk, D., Friesen, H., Sopko, R., Ye, W., Bastajian, N., Moffat, J., Sassi, H., Costanzo, M., *et al.* (2009). Dual regulation by pairs of cyclin-dependent protein kinases and histone deacetylases controls G1 transcription in budding yeast. *PLoS Biol.* 7: e1000188.

Jacobson, M.D., Gray, S., Yuste-Rojas, M., ja Cross, F.R. (2000). Testing cyclin specificity in the exit from mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4483–4493.

- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., *et al.* (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21: 947–962.
- Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massagué, J., ja Pavletich, N.P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376: 313–320.
- Kaldis, P., Russo, A.A., Chou, H.S., Pavletich, N.P., ja Solomon, M.J. (1998). Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol. Biol. Cell* 9: 2545–2560.
- King, R.W., Deshaies, R.J., Peters, J.M., ja Kirschner, M.W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* (80-.). 274: 1652–1659.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J.P., Gannon, J., ja Hunt, T. (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol. Biol. Cell* 3: 1279–1294.
- Koch, C., ja Nasmyth, K. (1994). Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 451–459.
- Koch, C., Schleiffer, A., Ammerer, G., ja Nasmyth, K. (1996). Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at Start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. *Genes Dev.* 10: 129–141.
- Kõivomägi, M., Valk, E., Venta, R., Iofik, A., Lepiku, M., Balog, E.R.M., Rubin, S.M., Morgan, D.O., ja Loog, M. (2011a). Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature* 480: 128–131.
- Kõivomägi, M., Valk, E., Venta, R., Iofik, A., Lepiku, M., Morgan, D.O., ja Loog, M. (2011b). Dynamics of Cdk1 Substrate Specificity during the Cell Cycle. *Mol. Cell* 42: 610–623.
- Kõivomägi, M., Örd, M., Iofik, A., Valk, E., Venta, R., ja Faustova, I. (2014). Multisite phosphorylation networks as signal processors for. *Nature* 20: 1–24.

- Koranda, M., Schleiffer, A., Endler, L., ja Ammerer, G. (2000). Forkhead-like transcription factors recruit Ndd1 to the chromatin of G2/M-specific promoters. *Nature* 406: 94–98.
- Kühne, C., ja Linder, P. (1993). A new pair of B-type cyclins from *Saccharomyces cerevisiae* that function early in the cell cycle. *EMBO J.* 12: 3437–3447.
- Kumar, R., Reynolds, D.M., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Goldstone, S.D., ja Dalton, S. (2000). Forkhead transcription factors, Fkh1p and Fkh2p, collaborate with Mcm1p to control transcription required for M-phase. *Curr. Biol.* 10: 896–906.
- Kung, C., Kenski, D.M., Dickerson, S.H., Howson, R.W., Kuyper, L.F., Madhani, H.D., ja Shokat, K.M. (2005). Chemical genomic profiling to identify intracellular targets of a multiplex kinase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 3587–3592.
- Lee, K.S., Park, J.E., Kang, Y.H., Kim, T.S., ja Bang, J.K. (2014). Mechanisms underlying Plk1 polo-box domain-mediated biological processes and their physiological significance. *Mol. Cells* 37: 286–294.
- Levine, K., Huang, K., ja Cross, F.R. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins differ in their intrinsic functional specificities. *Mol. Cell. Biol.* 16: 6794–6803.
- Lew, D.J., ja Reed, S.I. (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: Regulation by Cdc28 and cyclins. *J. Cell Biol.* 120: 1305–1320.
- Liakopoulos, D., Kusch, J., Grava, S., Vogel, J., ja Barral, Y. (2003). Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. *Cell* 112: 561–574.
- Liku, M.E. (2005). CDK Phosphorylation of a Novel NLS-NES Module Distributed between Two Subunits of the Mcm2-7 Complex Prevents Chromosomal Rereplication. *Mol. Biol. Cell* 16: 5026–5039.
- Lim, S., ja Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140: 3079–3093.
- Linke, C., Chasapi, A., González-Novo, A., Al Sawad, I., Tognetti, S., Klipp, E., Loog, M., Krobitsch, S., Posas, F., Xenarios, I., *et al.* (2017a). A Clb/Cdk1-mediated regulation of Fkh2 synchronizes CLB expression in the budding yeast cell cycle. *Syst. Biol. Appl.* 3: 7.
- Linke, C., Chasapi, A., González-Novo, A., Al Sawad, I., Tognetti, S., Klipp, E., Loog, M.,

- Krobitsch, S., Posas, F., Xenarios, I., *et al.* (2017b). A Clb/Cdk1-mediated regulation of Fkh2 synchronizes CLB expression in the budding yeast cell cycle. *Syst. Biol. Appl.* 3: 7.
- Liu, J., ja Kipreos, E.T. (2000). Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): Differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1061–1074.
- Locke, K.D., ja Nekich, J.C. (2000). Agency and communion in naturalistic social comparison. *Personal. Soc. Psychol. Bull.* 26: 864–874.
- Loog, M., ja Morgan, D.O. (2005). Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature* 434: 104–108.
- Maekawa, H., Usui, T., Knop, M., ja Schiebel, E. (2003). Yeast Cdk1 translocates to the plus end of cytoplasmic microtubules to regulate bud cortex interactions. *EMBO J.* 22: 438–449.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 15: 1–10.
- McGrath, D.A., Balog, E.R.M., Kõivomägi, M., Lucena, R., Mai, M. V, Hirschi, A., Kellogg, D.R., Loog, M., ja Rubin, S.M. (2013). Cks confers specificity to phosphorylation-dependent CDK signaling pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20: 1407–1414.
- McInerny, C.J., Partridge, J.F., Mikesell, G.E., Creemer, D.P., ja Breeden, L.L. (1997). A novel Mcm1-dependent element in the SWI4, CLN3, CDC6, and CDC47 promoters activates M/G1-specific transcription. *Genes Dev.* 11: 1277–1288.
- Mendenhall, M.D., ja Hodge, A.E. (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1191–1243.
- Miller, M.E., ja Cross, F.R. (2000). Distinct subcellular localization patterns contribute to functional specificity of the Cln2 and Cln3 cyclins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20: 542–555.
- Moreno, S., ja Nurse, P. (1990). Substrates for p34cdc2: In vivo veritas? *Cell* 61: 549–551.
- Noble, M.E.M., Endicott, J.A., Brown, N.R., ja Johnson, L.N. (1997). The cyclin box fold: Protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends Biochem. Sci.* 22: 482–487.
- Ogas, J., Andrews, B.J., ja Herskowitz, I. (1991). Transcriptional activation of CLN1, CLN2, and

a putative new G1 cyclin (HCS26) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell* 66: 1015–1026.

Oikonomou, C., ja Cross, F.R. (2011). Rising cyclin-CDK levels order cell cycle events. *PLoS One* 6: e20788.

Park, J.-E., Park, C.J., Sakchaisri, K., Karpova, T., Asano, S., McNally, J., Sunwoo, Y., Leem, S.-H., ja Lee, K.S. (2004). Novel functional dissection of the localization-specific roles of budding yeast polo kinase Cdc5p. *Mol. Cell. Biol.* 24: 9873–9886.

Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: Structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* 287: 821–828.

Pic-Taylor, A., ja Sharrocks, A.D. (2004). Regulation of Cell Cycle-Specific Gene Expression through Cyclin-Dependent Kinase-Mediated Phosphorylation of the Forkhead Transcription Factor Fkh2p. *Society* 24: 10036–10046.

Reynard, G.J., Reynolds, W., Verma, R., ja Deshaies, R.J. (2000). Cks1 is required for G(1) cyclin-cyclin-dependent kinase activity in budding yeast. *Mol. Cell. Biol.* 20: 5858–5864.

Reynolds, D., Shi, B.J., McLean, C., Katsis, F., Kemp, B., ja Dalton, S. (2003). Recruitment of Thr 319-phosphorylated Ndd1p to the FHA domain of Fkh2p requires C1b kinase activity: A mechanism for CLB cluster gene activation. *Genes Dev.* 17: 1789–1802.

Richardson, H., Lew, D.J., Henze, M., Sugimoto, K., ja Reed, S.I. (1992). Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes Dev.* 6: 2021–2034.

Richardson, H.E., Wittenberg, C., Cross, F., ja Reed, S.I. (1989). An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell* 59: 1127–1133.

Rodriguez-Rodriguez, J.A., Moyano, Y., Játiva, S., ja Queralt, E. (2016). Mitotic Exit Function of Polo-like Kinase Cdc5 Is Dependent on Sequential Activation by Cdk1. *Cell Rep.* 15: 2050–2062.

Santamaría, D., Barrière, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Cáceres, J.F., Dubus, P., Malumbres, M., ja Barbacid, M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448: 811–815.

Schulman, B. a, Lindstrom, D.L., ja Harlow, E. (1998). Substrate recruitment to cyclin-dependent

- kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 10453–10458.
- Schwob, E., ja Nasmyth, K. (1993). CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 7: 1160–1175.
- Segal, M., Clarke, D.J., ja Reed, S.I. (1998). Clb5-associated kinase activity is required early in the spindle pathway for correct preanaphase nuclear positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 143: 135–145.
- Segal, M., Clarke, D.J., Maddox, P., Salmon, E.D., Bloom, K., ja Reed, S.I. (2000). Coordinated spindle assembly and orientation requires Clb5p-dependent kinase in budding yeast. *J. Cell Biol.* 148: 441–451.
- Sherr, C.J. (1994). G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell* 79: 551–555.
- Simpson-Lavy, K.J., ja Brandeis, M. (2011). Phosphorylation of Cdc5 regulates its accumulation. *Cell Div.* 6: 23.
- Simpson-Lavy, K.J., Zenvirth, D., ja Brandeis, M. (2015). Phosphorylation and dephosphorylation regulate APC/C(Cdh1) substrate degradation. *Cell Cycle* 14: 3138–3145.
- Skotheim, J.M., Di Talia, S., Siggia, E.D., ja Cross, F.R. (2008). Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature* 454: 291–296.
- Snead, J.L., Sullivan, M., Lowery, D.M., Cohen, M.S., Zhang, C., Randle, D.H., Taunton, J., Yaffe, M.B., Morgan, D.O., ja Shokat, K.M. (2007). A Coupled Chemical-Genetic and Bioinformatic Approach to Polo-like Kinase Pathway Exploration. *Chem. Biol.* 14: 1261–1272.
- Song, S., Grenfell, T.Z., Garfield, S., Erikson, R.L., ja Lee, K.S. (2000). Essential function of the polo box of Cdc5 in subcellular localization and induction of cytokinetic structures. *Mol. Cell. Biol.* 20: 286–298.
- Stern, B., ja Nurse, P. (1996). A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.* 12: 345–350.
- Stuart, D., ja Wittenberg, C. (1995). CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Genes Dev.* 9: 2780–2794.
- Sundin, B.A., Chiu, C.H., Riffle, M., Davis, T.N., ja Muller, E.G.D. (2004). Localization of

proteins that are coordinately expressed with Cln2 during the cell cycle. *Yeast* 21: 793–800.

Surana, U., Robitsch, H., Price, C., Schuster, T., Fitch, I., Futcher, A.B., ja Nasmyth, K. (1991). The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* 65: 145–161.

Suzuki, K., Sako, K., Akiyama, K., Isoda, M., Senoo, C., Nakajo, N., ja Sagata, N. (2015). Identification of non-Ser/Thr-Pro consensus motifs for Cdk1 and their roles in mitotic regulation of C2H2 zinc finger proteins and Ect2. *Sci. Rep.* 5: 7929.

Swaffer, M.P., Jones, A.W., Flynn, H.R., Snijders, A.P., ja Nurse, P. (2016). CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle. *Cell* 167: 1750–1761.e16.

Talia, S. Di, Skotheim, J.M., Bean, J.M., Siggia, E.D., ja Cross, F.R. (2007). The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle. *Nature* 448: 947–951.

Tomson, B.N., Rahal, R., Reiser, V., Monje-Casas, F., Mekhail, K., Moazed, D., ja Amon, A. (2009). Regulation of Spo12 phosphorylation and its essential role in the FEAR network. *Curr. Biol.* 19: 449–460.

Tyers, M., Tokiwa, G., Nash, R., ja Futcher, B. (1992). The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J.* 11: 1773–1784.

Tyers, M., Tokiwa, G., ja Futcher, B. (1993). Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J.* 12: 1955–1968.

Ubersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., Shokat, K.M., ja Morgan, D.O. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425: 859–864.

Uhlmann, F., Bouchoux, C., ja Lopez-Aviles, S. (2011). A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited. *Biol. Sci.* 366: 3572–3583.

Wijnen, H., Landman, A., ja Futcher, B. (2002). The G(1) cyclin Cln3 promotes cell cycle entry via the transcription factor Swi6. *Mol. Cell. Biol.* 22: 4402–4418.

Yelamanchi, S.K., Veis, J., Anrather, D., Klug, H., ja Ammerer, G. (2014). Genotoxic Stress Prevents Ndd1-Dependent Transcriptional Activation of G2/M-Specific Genes in *Saccharomyces*

cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 34: 711–724.

Yeong, F.M., Lim, H.H., Wang, Y., ja Surana, U. (2001). Early expressed Clb proteins allow accumulation of mitotic cyclin by inactivating proteolytic machinery during S phase. Mol. Cell. Biol. 21: 5071–5081.

Yoshida, S., ja Toh-e, A. (2002). Budding yeast Cdc5 phosphorylates Net1 and assists Cdc14 release from the nucleolus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 294: 687–691.

Yu, H., Braun, P., Yildirim, M.A., Lemmens, I., Venkatesan, K., Sahalie, J., Hirozane-Kishikawa, T., Gebreab, F., Li, N., Simonis, N., *et al.* (2008). High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. Science (80-.). 322: 104–110.

Lihtlitsents

Mina Tuuliki Ojala

(sünnikuupäev: 12.01.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**Clb3-Cdk1 spetsiifilise seondumismotiivi kirjeldamine ja olulisus substraatvalgul Ypr174c**”,

mille juhendajad on Mihkel Örd ja Mart Loog

- 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 **28.05.2021** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018