

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

**Sic1 ja CDK kompleksi vaheliste inhibitoorsete seondumismotiivide
kaardistamine**

Magistritöö (30 EAP)

Reelika Schilf

Juhendajad:
MSc Mihkel Örd
Prof. Mart Loog

TARTU 2018

INFOLEHT

Sic1 ja CDK kompleksi vaheliste inhibitoorsete seondumismotiivide kaardistamine

Reelika Schilf

Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* rakutsükliit reguleeritakse läbi erinevate substraatvalkude fosforüleerimise. Erinevates rakutsükli faasides seondub Cdk1 erinevate tsükliinidega, mis suunavad tsükliin-Cdk1 komplekse fosforüleerima erinevaid substraate. Käesolevas töös uuriti Sic1 C-terminaalses domeenis olevaid interaktsioone ning nende võimalikku kasutamist substraatide fosforüleerimisel. Leiti lühike lineaarne motiiv NPF inhibitoorsest domeenist, mis stimuleerib substraadi fosforüleerimist Clb5-Cdk1 kompleksi poolt. Leitud motiivi abil on võimalik fosforüleerimise kaudu spetsiifiliselt kontrollida valgu taset *in vivo*.

Märksõnad: Seondumismotiivid, rakutsükkel, fosforüleerimine, CERCS: P310 (Proteiinid, ensümoloogia)

Mapping of CDK inhibitory docking motifs on Sic1

Reelika Schilf

Saccharomyces cerevisiae cell cycle is regulated by Cdk1, which phosphorylates different substrates. At different stages in the cell cycle, Cdk1 binds to cyclins, that are specific for that phase and which recognize many different substrates. In this thesis the aim was to study interactions in Sic1 C-terminal domain and to potentially use them for substrate phosphorylation. A short linear motif was found from the inhibitory domain of Sic1, that stimulates its phosphorylation by Clb5-Cdk1 complex. With this NPF motif it is possible to control protein levels *in vivo*.

Keywords: Docking motifs, cell cycle, phosphorylation, CERCS: P310 (Proteins, enzymology)

SISUKORD

| | |
|---|----|
| KASUTATUD LÜHENDID | 5 |
| SISSEJUHATUS | 6 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 7 |
| 1.1. Rakutsükli lühiülevaade..... | 7 |
| 1.2. Tsükliin-Cdk1 kompleksi substraadispetsiifilisus | 8 |
| 1.3. Rakutsükli lülitide regulatsioon..... | 10 |
| 1.4. S-faasi tsükliin-Cdk1 inhibiitor Sic1 | 13 |
| 1.2.1. Tsükliinide Cln2 ja Clb5 vahendatud Sic1 fosforüleerimine | 14 |
| 1.5. Sünteetiliste võrgustike väljatöötamine mikroorganismides | 16 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA | 18 |
| 2.1. Töö eesmärgid..... | 18 |
| 2.2. Materjal ja meetodika | 18 |
| 2.2.1. Tüved ja söötmed | 18 |
| 2.2.2 Sic1-l baseeruvate konstruktide loomine PCR-iga..... | 19 |
| 2.2.3. Oligonukleotiid-suunatud mutagenees | 21 |
| 2.2.4. <i>E.coli</i> tüvede BL21 ning DH5 α transformatsioon..... | 22 |
| 2.2.5. <i>S. cerevisiae</i> transformatsioon..... | 23 |
| 2.2.6. 6xHis-märgisega Sic1 mutantide puhastamine | 23 |
| 2.2.7. <i>In vitro</i> kinaasikatsed..... | 24 |
| 2.2.8. <i>In vivo</i> katsed | 25 |
| 3. Tulemused ja arutelu | 26 |
| 3.1. Sic1 inhibitoorse domeeni interaktsioonide positiivne mõju Sic1 fosforüleerimisele | 26 |
| 3.2. Sic1 inhibitoorse domeeni analüüs | 27 |
| 3.3. Sic1 positsioonides 215-224 paikneva seondumismotiivi kaardistamine..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 3.4. NPF motiivi mõju minimaalse Sic1 variandi fosforüleerimisele erinevate Clb5-Cdk1 mutantide poolt..... | 31 |
| 3.5. Sic1(min) valgu multifosforüleerimise dünaamika | 34 |
| 3.6. Sic1(min) mutantide lagundamine <i>in vivo</i> | 36 |
| 3.8. T33S mutatsioon muudab Sic1(min) degradatsiooni NPF motiivist sõltuvaks..... | 38 |
| KOKKUVÕTE..... | 40 |
| Mapping of CDK inhibitory docking motifs on Sic1 | 42 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 43 |
| LISAD | 48 |
| Lisa 1. | 48 |
| Lisa 2 | 49 |
| Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks..... | 50 |

KASUTATUD LÜHENDID

APC/C – i.k *Anaphase-promoting complex* (Anafaasi viiv kompleks)

BSA – i.k Bovine Serum Albumine (Veise seerumalbumiin)

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

CKI – i.k *Cyclin-dependent kinase inhibitor* (Tsükliin-sõltuva kinaasi inhibiitor)

DMSO – i.k *Dimethyl sulfoxide* (Dimetüül sulfoksiid)

GFP - i.k *green fluorescent protein* (Roheliselt fluorestseeruv valk)

hpm – i.k *hydrophobic patch mutant* (hüdrofoobse tasku mutant)

MBF – i.k *MluI binding factor* (MluI-d siduv faktor)

SBF – i.k *SCB binding factor* (SCB-d siduv faktor)

SCF – i.k *Skp1-Cul-F box*

SC-Ura – i.k *synthetic complete media lacking uracil* (Sünteeiline miinimumsööde ilma uratsiilita)

ssDNA – i.k *single stranded DNA* (üheahelaline DNA)

YPD – i.k *Yeast extract, Peptone, Dextrose* (Pärmi ekstrakt, Pepton, Dekstroos)

SISSEJUHATUS

Rakutsükli peamised regulaatorid on tsükliinist sõltuvad kinaasid (CDK-d), mis sõltuvad oma aktiveerivast subühikust tsükliinist. Igas rakutsükli faasis aktiveeritakse erinevad tsükliin-CDK kompleksid, mis viivad rakku edasi läbi faaside, mille tulemusena tekib kaks identset rakku. Pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* rakutsükliks osaleb üks peamine CDK - Cdk1. Pagaripärmis seob Cdk1 kolme G1-faasi tsükliini ning kuut B-tüüpi tsükliini. Rakutsükli edenedes ning erinevate tsükliinidega seondues, tõuseb järk-järgult Cdk1 aktiivsus. Kusjuures kõige madalama aktiivsusega on G1-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid ning kõige kõrgema aktiivsusega M-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid. Selleks, et rakutsükli faasid ning nendes faasides toimuvad protsessid toimuksid õigeaegselt, peab CDK täpselt fosforüleerima kindlaid substraatvalke. Substraatvalkude äratundmine toimub läbi CDK-ga seotud tsükliinide. Substraatvalgud sisaldavad erinevate tsükliinide jaoks erinevaid seondumismotiive, mille kaudu toimub interaktsioon substraadi ning tsükliin-Cdk1 kompleksi vahel.

Tänapäeval liigub teadus selle suunas, et töötada välja erinevaid sünteetilisi võrgustikke elusrakkudes, mille abil oleks võimalik efektiivsemalt toota erinevaid komponente. Pagaripärm on selleks sobilik mudel, kuna on küllaltki lihtne organism mis on väga põhjalikult uuritud ning millega töötamiseks on välja töötatud palju erinevaid meetodikaid. Luues erinevaid sünteetilisi radasid, tekib vajadus reguleerida selles olevate ensüümide tasemeid, lokaliseerimist ja aktiivsust. Üheks selliseks võimaluseks on fosforüleerimine, mille jaoks tuleks välja töötada vastavad regulatsioonimoodulid ning kinaasid, mis neid spetsiifiliselt fosforüleeriks.

Käesoleva töö kirjanduse osa annab ülevaate pagaripärmi rakutsüklist ning selle regulatsioonist. Eksperimentaalse eesmärgiks oli uurida, kas rakutsükli S-faasi inhibiitor Sic1 sisaldab C-terminaalses inhibitoorses domeenis ka motiivi, mis võiks fosforüleerimisele hoopis positiivselt mõjuda. Samuti disainida Sic1 minimaalne variant, mille lagundamine oleks Cdk1-sõltuv, kuid mida teised rakutsükliks osalevad kinaasid fosforüleeriks minimaalselt. Lisaks uuriti võimalusi teha Clb5 variant, mis oleks rakutsüklist sõltumatu ning mõjutaks rakutsükli minimaalselt, samas aga fosforüleeriks spetsiifiliselt leitud seondumismotiiviga substraate. Käesolev töö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

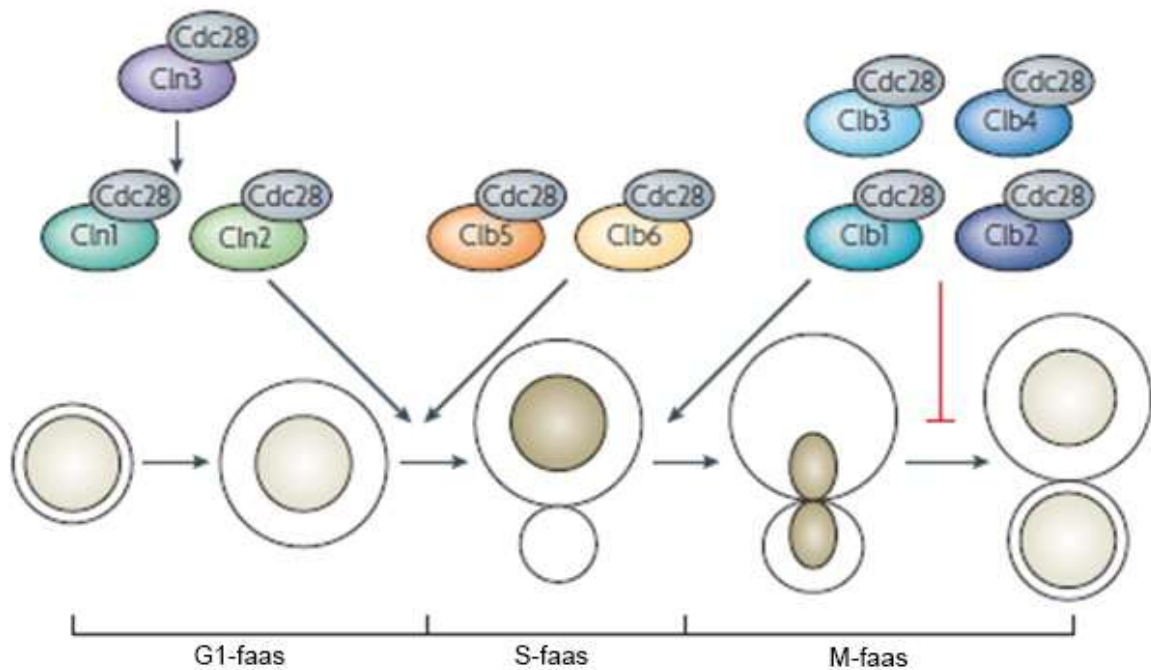
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Rakutsükli lühiülevaade

Elu aluseks on rakkude jagunemine, mille käigus toimub olemasoleva DNA ja rakuorganellide kahekordistumine ning nende võrdne jaotamine kahe tekkiva tütarraaku vahel. Genoom peab olema täpselt replitseeritud ja jagatud tekkivate tütarakkude vahel. Eukarüootses rakutsükliis eristatakse üldiselt nelja faasi – G1-faasis rakk kasvab ja valmistub replikatsiooniks, S-faasis toimub DNA replikatsioon, G2-faasis rakk valmistub mitoosiks ning M-faasis toimub replitseeritud DNA võrdne jaotamine tütarakkude vahel (Morgan, 2007). Terviklikult ja vigadeta replitseerunud genoomi aluseks on normaalselt kulgenud rakutsükkel. Rakutsükli toimimiseks on vajalikud tsükliinist sõltuvad proteiini kinaasid (i.k. *cyclin-dependent protein kinase* – ehk CDK). CDK-d on ensümaatilistelt aktiivsed vaid siis, kui nad on moodustanud kompleksi oma aktiveeriva subühiku tsükliiniga (Morgan, 2007). Erinevate tsükliinide tase tõuseb ja langeb vaheldumisi läbi rakutsükli ning nad moodustavad CDK-ga aktiivse kompleksi, mis viib rakutsükli järgnevasse faasisse (Bloom ja Cross, 2007). Pärast M-faasi kõik alles olevad tsükliinid lagundatakse, et saaks alata uus rakutsükkel (Hopkins *et al.*, 2017). Selles töös käsitletakse rakutsükli pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* näitel.

S. cerevisiae rakutsükkel jaotub peamiselt kolme faasi vahel – G1, S ja M, kuna G2-faas ei ole kindlalt piiritletud. Igasse faasi üleminekut kontrollib erinevate tsükliinide aktiivsuse tõus ja langus (Morgan, 2007). *S. cerevisiae* rakutsükli läbiviimiseks on hädavajalik ainult üks CDK - (Cdk1 (Cdc28)).

Pagaripärmis on 9 tsükliini, mis erinevates rakutsükli etappides aktiveerivad kinaasi Cdk1. Neist kuus on B-tüüpi tsükliinid, mida saab jagada kolme paari – S-faasi tsükliinid Clb5 ja Clb6, G2/M-faasi tsükliinid Clb3 ja Clb4 ning M-faasi tsükliinid Clb1 ja Clb2. Lisaks nendele on veel G1-faasi tsükliinid Cln1, Cln2 ja Cln3 (Joonis 1) (Bloom ja Cross, 2007).



Joonis 1. *S. cerevisiae* rakutsükli osalevad tsükliinid. Pagaripärmi rakutsükli keskne regulaator Cdk1 ehk Cdc28 on erinevates rakutsükli etappides aktiveeritud erinevate tsükliinide poolt (Bloom ja Cross, 2007 baasil).

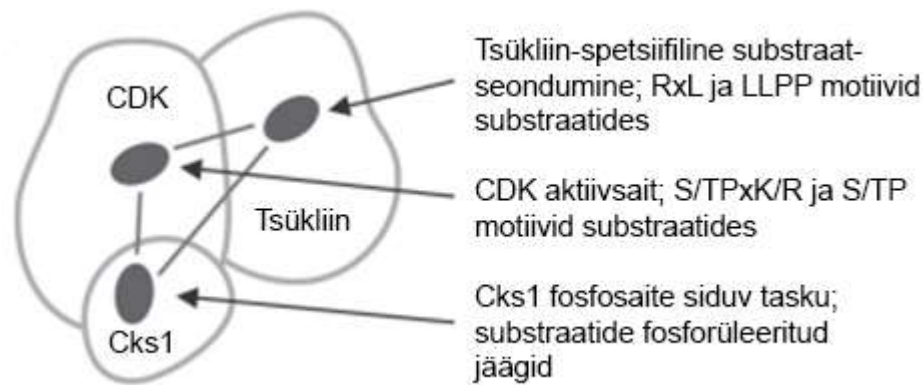
1.2. Tsükliin-Cdk1 kompleksi substraadispetsiifilisus

Cdk1 on seriini/treoniini proteiini kinaas, mis sõltub oma aktiveerivast subühikust tsükliinist (Bloom ja Cross, 2007) ja fosfoadaptervalgust Cks1 (Joonis 2). Lisaks kinaasi aktiivsenti spetsiifikale, mõjutavad ka tsükliin ja Cks1 substraatide fosforüleerimist. Cks1 seob fosfaatrühmi ning on oluline CDK funktsioneerimiseks nii G1-S kui ka G2-M-faasi üleminekul (Reynard *et al.*, 2000; Tang ja Reed, 1993). CDK-d fosforüleerivad sadu substraate, mis lülitavad rakutsükli protsessid õigeaegselt ning õiges järjekorras tööle. CDK käivitab rakutsükli protsesse katalüüsides fosfaatrühma ülekannet ATP-lt spetsiifilistele valkudele (Nigg, 2001). CDK sihtmärgid sisaldavad optimaalseid konsensuslikke fosforüleerimise motiive (S/T-P-x-K/R), kus S/T on fosforüleeritav seriin või treoniin ning x on suvaline aminohape ja suboptimaalseid motiive (S/T-P), mida fosforüleeritakse väiksema efektiivsusega (Holmes ja Solomon, 1996).

Aktiivne tsükliin-CDK kompleks sisaldab kolme taskut, millega toimub seondumine substraatvalkudega (Joonis 2). B-tüüpi tsükliinide pinnal on spetsiifiline hüdrofoobne tasku (i.k. *hydrophobic patch*), mis sisaldab konserveerunud Met-Arg-Ala-Ile-Leu (MRAIL) järjestust (Schulman *et al.*, 1998). S-faasi tsükliinide hüdrofoobse taskuga seonduvad substraadi motiivid

järjestusega Lys/Arg-x-Leu (K/RxL), kus x on suvaline aminohape (Schulman *et al.*, 1998). Tsükliini hüdrofoobsesse taskusse seondunud RxL motiiviga substraat ei muuda tsükliini konformatsiooni (Brown *et al.*, 1999). Kui muteerida MRAIL järjestuses tsükliini pinnal olevad aminohappedalaniinideks, kaob tsükliin-CDK kompleksi võime efektiivselt RxL motiiviga substraate fosforüleerida. Selliseid mutante nimetatakse hüdrofoobse taskuga mutantideks (i.k. *hydrophobic patch mutants*) (Schulman *et al.*, 1998). Asendades Clb5 hüdrofoobses alasalaniinidega aminohapped M197, L201 ja W204, tekib Clb5 hüdrofoobse tasku mutant (hpm). Asendades pagaripärmis *CLB5* metsiktüüpi variant hpm mutandiga, suureneb S-faasis olevate rakkude hulk. Tsükliin-Cdk1 kompleks ei suuda fosforüleerida ja lagundamisele viia S-faasi inhibiitoreid, näidates tsükliini hüdrofoobse ala interaktsioonide olulisust S-faasi spetsiifiliste sihtmärkide fosforüleerimisel *in vivo* (Cross *et al.*, 1999). G1-faasi tsükliinid tunnevad substraadi pinnal ära motiive järjestusega Leu-Leu-Pro-Pro (LLPP) (Bhaduri ja Pryciak, 2011; Kõivomägi *et al.*, 2011a). Selliste motiivide olemasolu tõstab substraadi fosforüleerimise efektiivsust G1-Cdk1 poolt (Kõivomägi *et al.*, 2011a).

Cks1 pinnal on positiivselt laetud aminohapetest konserveerunud katioonne tasku (Arg33, Arg42, Arg102 koos Trp85 ja Ser82), mis seob fosfaate (Bourne *et al.*, 2000). Cks1 on võimeline siduma vaid fosfo-treoniine, millele järgneb proliin, kuid mitte fosfo-seriine (Kõivomägi *et al.*, 2013; Mcgrath *et al.*, 2013). Cks1-vahendatud fosforüleerimisel seondub fosforüleeritud TP motiiv Cks1 katioonsesse taskusse ning suurendades afiinsust kinaaskompleksi ja substraatvalgu vahel stimuleerib järgmiste fosforüleerimismotiivide fosforüleerimist (Kõivomägi *et al.*, 2011b). Kuna Cks1 valk seondub juba fosforüleeritud valkudega, aitab Cks1 Cdk1 substraatide multifosforüleerimist. Cks1-vahendatud fosforüleerimise efektiivsus sõltub fosforüleerimissaitide omavahelisest paiknemisest (Kõivomägi *et al.*, 2013). Fosforüleeritud saiti, mis seondub Cks1-ga, nimetatakse praimersaidiks, ning see stimuleerib praimersaidi suhtes C-terminaalselt paiknevate akseptorsaitide fosforüleerimist, kusjuures optimaalseks kauguseks praimer-ja akseptorsaidi vahel on 12-20 aminohappejääki (Kõivomägi *et al.*, 2013).



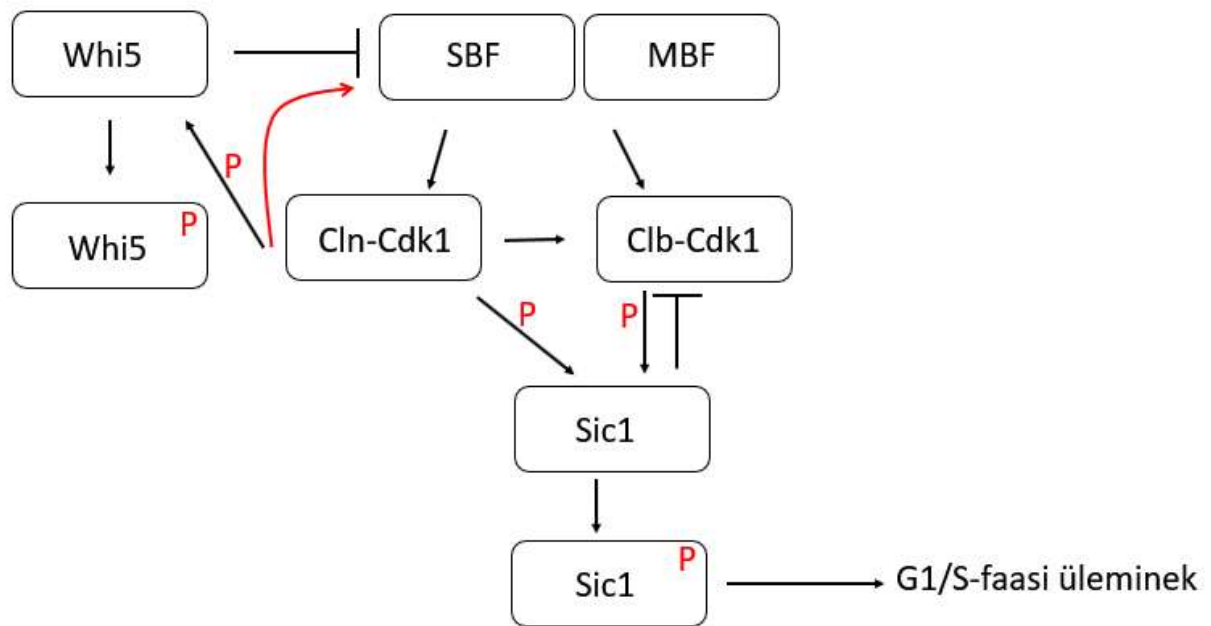
Joonis 2. Skeem tsükliin-CDK kompleksi spetsiifilisuse tagavatest taskutest. Tsükliini-spetsiifiline substraati siduv tasku, mis seob RxL ja LLPP motiive substraatidel. CDK aktiivtsenter mis tunneb ära S/TPxR ja S/TP motiive substraatidel ning Cks1 tasku, mis seob fosforüleeritud treoniinjääke substraatidel (Kõivomägi *et al.*, 2013).

Tsükliinid suunavad Cdk1 kompleksi fosforüleerima erinevaid substraatvalke. Tsükliin-CDK kompleksi üldine aktiivsus suureneb rakutsükli jooksul, kuid varajaste tsükliin-Cdk1 komplekside madalat aktiivsust kompenseeritakse tsükliin-sõltuvate seondumismotiividega, mis suurendavad rakutsükli varajaste sihtmärkide fosforüleerimist, ilma et hilisemad sihtmärgid neid takistaksid (Kõivomägi *et al.*, 2011; Loog ja Morgan, 2005). Tänu sellisele spetsiifilisusele saavad varajase rakutsükli tsükliinid fosforüleerida oma sihtmärke küll efektiivselt, kuid ei suuda edasi viia hiliseid rakutsükli faase (Loog ja Morgan, 2005; Mendenhall, 1998). Niisuguselt muutuv Cdk1 spetsiifika tagab, et ei toimu enneaegset hiliste sihtmärkvalkude fosforüleerimist (Kõivomägi ja Skotheim, 2014).

1.3. Rakutsükli lülitide regulatsioon

Selleks, et tagada rakutsükli vigadeta toimumine, on rakutsükli kontrollpunktid, mis kontrollivad erinevaid kriitilisi protsesse rakutsükli, näiteks DNA replikatsiooni (Enserink ja Kolodner, 2010).

G1-faasis rakk otsustab toitainete kättesaadavuse, raku suuruse ja inhibitoorsete signaalide järgi, kas tingimused raku jagunemiseks on sobivad. G1-faasi tsükliin Cln3 koordineerib rakkude kasvu, suunab nad uude rakutsükli, algatades Cln1 ja 2 ekspressiooni, mis omakorda suurendavad iseenda ekspressiooni läbi positiivse tagasiside tsükli (Joonis 3). See tagab tsükliinide Cln1 ja Cln2 aktiivsuse järsu tõusu, suunates raku otsustavalt uude rakutsükli (Hartwell *et al.*, 1973).



Joonis 3. G1/S-faasi üleminek läbi positiivse tagasiside tsükli. Joonisel toodud Whi5, mis repressseerib SBF ning MBF komplekse. Cln3-Cdk1 kompleks fosforüleerib Whi5, mis viib Whi5 tuumast väljumiseni, misjärel saavad SBF ja MBF aktiveerida Cln1/2-Cdk1 ning Clb5/6-Cdk1 kompleksiks vajalike geenide transkriptsiooni. Cln1/2-Cdk1 kompleksi ekspressiooni järel suunavad need iseenda ekspressiooni, läbi positiivse tagasiside tsükli (punane nool). Cln1/2-Cdk1 taseme tõustes fosforüleerib see S-faasi inhibiitori Sic1, mis viib Sic1 lagundamiseni ning vabastab inhibitsioonist Clb5/6-Cdk1 kompleksid, mis läbi topelt-negatiivse tagasiside tsükli suurendavad iseenda transkriptsiooni ning fosforüleerivad Sic1, mis viib selle täieliku lagundamiseni ning G1/S-faasi üleminekuni.

G1-faasis on haploidsel pärmirakul mitu valikut: jääda G1-faasi, paarduda teise pärmiga, moodustades diploidi või jaguneda rakutsükli kaudu. Hetke G1-faasis, kui rakk on pöördumatult läinud rakutsükklisse, nimetatakse START punktiks. START punkti, mis on ühtlasi ka üheks rakutsükli kontrollpunktiks, ajastus sõltub G1-spetsiifilistest tsükliinidest Cln1, Cln2 ja Cln3. Rakutsükli transkriptsiooniprogrammi alustamiseks on vajalikud kaks transkriptsioonifaktorite kompleksi - SBF (i.k *SCB binding factor*) ja MBF (i.k *Mlu1 binding factor*). Whi5 on G1-faasi spetsiifiline transkriptsiooni repressor, mis takistab rakutsükli kuni on inaktiveeritud G1-CDK poolt (De Bruin *et al.*, 2004). Whi5 seondub SBF kompleksiga G1-faasi spetsiifilistele promooteritele repressseerides transkriptsiooni. Hilises G1-faasis Cln3-Cdk1 kompleks fosforüleerib Whi5 valku, mis viib Whi5 eemaldumiseni promooteritelt ning Whi5 transporditakse tuumast välja. Selle tulemusena SBF ja MBF transkriptsioonifaktorite kompleksid vabanevad ning alustavad G1/S-faasi geenide transkribeerimist (De Bruin *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 1993). On näidatud, et kui umbes 50% Whi5 valgust on tuumast eksporditud, siis läheb rakk kindlasti rakutsükklisse ehk rakk on läbinud START punkti (Doncic *et al.*, 2011). SBF ja MBF kompleksid on vajalikud umbes 200 geeni transkribeerimiseks, kusjuures MBF

sihtmärgid (näiteks *CLB5*, *CLB6*) on DNA replikatsiooni ning sellest tekkivate vigade parandusega seotud, samas SBF kompleksi sihtmärgid (*CLN1*, *CLN2*) vastutavad käävi polaarkeha duplikatsiooni ja raku morfoloogia eest (Ferrezuelo *et al.*, 2010). *Whi5* deletsioon viib väikeste rakkude tekkeni ja kiire transkriptsiooni aktivatsioonini, samas aga *Whi5* üleekspressioonil on G1-faas pikem ja rakud on suuremad (De Bruin *et al.*, 2004; Wittenberg ja Reed, 2005).

G1/S-faasi üleminekut kontrollivad tsükliinid *Cln1* ja *Cln2*, mille tase tõuseb hilises G1-faasis ning langeb S-faasi jooksul (Morgan, 2007). S-faasi signaal tekib tänu S-faasi CDK inhibiitorite (CKI, i.k. *cyclin-dependent kinase inhibitor*) allasurumisele (Hao *et al.*, 2007). *Cln2* taseme tõustes hakkab *Cln2-Cdk1* fosforüleerima S-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksi (*Clb5* ja *Clb6*) inhibiitorvalku *Sic1*, algatades *Sic1* valgu lagundamise (Verma *et al.*, 1997). See põhjustab S-faasi tsükliin-Cdk1 komplekside vabanemise inhibitsioonist, võimaldades ka neil *Sic1* valku fosforüleerida, mistõttu toimub järsk S-faasi CDK aktiivsuse tõus positiivse tagasiside kaudu (Kõivomägi *et al.*, 2011b).

M-faasi tsükliin-Cdk1 komplekside aktivatsiooni ja mitoosi sisenemist inhibeerib kinaas *Swe1*, mis viib läbi *Cdk1* inhibitoorset fosforüleerimist. M-Cdk1 aktivatsioon viibib ka juhul, kui esineb kõrvalekaldeid rakupunga morfoloogias, sel juhul jääb *Swe1* aktiivseks ning mitoosi sisenemist ei toimu. Seega on kinaasil *Swe1* oluline roll ka raku morfoloogia kontrollis ning tuuma jagunemisel (Lew, 2003). M-faasi tsükliinide *Clb1*, 2, 3 ja 4 tase tõuseb mitoosi alustades ning see viib mitootilise käävi moodustumiseni ja tütarchromatiidide joondumiseni käävile. Nende tsükliinide lagundamisega anafaasis viiakse mitoos ja tsütokinees lõpule (Raspelli *et al.*, 2015).

Mitoosist väljumiseks on vajalik ubikvitiinligaaskompleksi APC (i.k. *Anaphase-promoting complex*) aktivatsioon kahe kofaktori poolt - *Cdc20* ja *Cdh1*, mõlemad annavad APC-le substraadispetsiifilisuse (Visintin *et al.*, 1998). APC suunab kromosoomide eraldumist üksteisest, ubikvitineerides sekuriini *Pds1* (Yamamoto *et al.*, 1996a, 1996b) ning S- ja M-faasi tsükliinid, vähendades nii *Cdk1* aktiivsust (Shirayama *et al.*, 1999). *Pds1* lagundamine vabastab temaga seotud separaasi *Esp1*, mis lõikab kohesiini subühikut *Sec1*, lastes nii tütarchromatiididel eralduda (Michaelis *et al.*, 1997; Uhlmann *et al.*, 1999). APC^{*Cdc20*} aktiveerib fosfataasi *Cdc14*, mis defosforüleerib mitmeid *Cdk1* substraate, üheks neist on alternatiivne APC aktivaator *Cdh1*, mis kompleksis APC-ga viib degradeerimisele mitootilised substraadid (üheks neist *Clb2*) (Glotzer *et al.*, 1991; Holloway *et al.*, 1993). Fosfataas *Cdc14* defosforüleerib ka transkriptsioonifaktori *Swi5*, mis siis liigub tuuma ning aktiveerib *Sic1* transkriptsiooni

(Bähler, 2005). Tsükliinide lagundamine ja CDK substraatide defosforüleerimine on vajalik mitoosi lõpetamiseks ja tsütokineesiks.

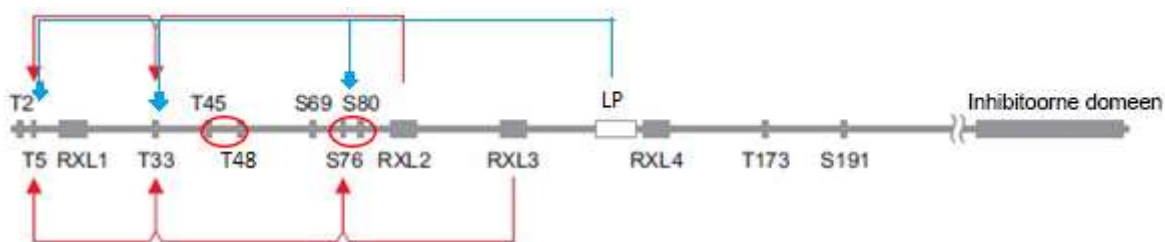
Olulisemad pagaripärmis olevad tsükliini geenid on küll asendatavad, kuid nende deletsioon või asendamine võib viia mitmete rakutsükli vigadeni – S-faasi tsükliini Clb5 asendamine mitootilise tsükliini Clb2-ga viib replikatsiooni vigadeni (Cross *et al.*, 1999). Clb5 ja Clb6 samaaegne deletsioon viib S-faasi viibimiseni, samas aga mitootiliste tsükliinide (Clb2 ja Clb3) deletsioon on rakule letaalne (Mendenhall, 1998).

1.4. S-faasi tsükliin-Cdk1 inhibiitor Sic1

Pagaripärmis G1/S-faasi üleminekut inhibeeriv CKI on Sic1, mis on nii inhibiitor kui substraat kinaasile Cdk1 (Schwob *et al.*, 1994). *SIC1* lugemisraam kodeerib 284 aminohappe pikkust kõrgema struktuurita valku. Esmalt tuvastati Sic1 kui Cdk1 substraat, kuid hiljem näidati teda kui G1/S-faasi üleminekuks vajalike B-tüüpi tsükliin-Cdk1 komplekside inhibiitorina (Mendenhall, 1993). Valgu Sic1 C-terminaalses osas paiknevad aminohapped positsioonides 215-284 on piisavad inhibeerimaks B-tüüpi tsükliin-Cdk1 komplekse (Mendenhall, 1999). Sic1 blokeerib Clb5/6-Cdk1 kompleksi aktiivsust, et ei toimuks enneaegset DNA replikatsiooni ning inhibeerib Clb1/2-Cdk1 komplekside aktiivsuse anafaasijärgselt, kindlustades varajases G1-faasis Cdk1 aktiivsuse puudumise (Barberis *et al.*, 2005).

SIC1 transkriptsioon algab hilises mitoosis ning valgu tase tõuseb kuni G1-faas viiakse lõpule. DNA replikatsiooni käivitamiseks on vajalik B-tüüpi tsükliin-Cdk1 komplekside aktiivsus, mille saavutamiseks on vaja Sic1 lagundada. Verma *et al.*, (1997) on näidanud Sic1 N-terminaalses osas paikneva 159 aminohappe vajalikkust Sic1 lagundamiseks. Sic1 N-terminaalses osas on kaheksa CDK fosforüleerimismotiivi -T2, T5, T33, T45, T48, S69, S76 ja S80 (Joonis 4). Nendest T5, T33 ja T45 moodustavad Cks1-sõltuva seondumismotiivi S69, S76 ja S80 fosforüleerimiseks (Kõivomägi *et al.*, 2011b). Nendest fosforüleerimissaitidest moodustub kaks fosforüleerimisest sõltuvat degradatsioonimotiivi ehk degronit – T45/T48 ja S76/S80 (Joonis 4) (Kõivomägi *et al.*, 2011b). Vaid ühest degroni paarist ei piisa Sic1 lagundamiseks – nii T45/T48 kui ka S76/80 peavad olema fosforüleeritud, et järgneks ubikvitiin-sõltuv degradatsioon. Degradatsioonimotiivide fosforüleerimissaidid on suboptimaalsed, mistõttu Cdk1 neid otse efektiivselt ei fosforüleeri ning nende fosforüleerimiseks on vajalikud primersaidid T5 ja T33. Kaskaadi lõpuks suunavad kaks

fosforüleeritud difosfodegronit Sic1 lagundamisele läbi SCF ubikvitiinligaaskompleksi ning proteasoomi raja (Hao *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 1997).



Joonis 4. Skeemil on toodud seundumissaitide interaktsioonid Sic1 ning tsükliinide Clb5 ja Cln2 vahel. Punaste nooltega on toodud substraadi pinnal olevate tsükliini Clb5 seundumissaitide ja fosfosaitide omavaheline seos. Siniste nooltega näidatud substraadi pinnal olev tsükliini Cln2 seundumissaidi ning fosfosaitide omavaheline seos. Joonisel on toodud punaste ovaalidena kaks fosfodegronit (Kõivomägi *et al.*, 2011a).

Stabiilse Sic1 valgu, millel puuduvad Sic1 degradatsiooniks vajalikud fosforüleerimissaidid, üleekspressioonil jäävad rakud G1-faasis arresti, kuid *SIC1* deletsioon viib enneaegse DNA replikatsioonini ja genoomi ebastabiilsuseni (Lengronne *et al.*, 2002; Nugroho ja Mendenhall, 1994). Sic1 on funktsionaalselt ja struktuurilt sarnane imetaja CDK inhibiitoriga p27^{Kip1}. Imetajate rakutsükliis läbitakse S-faas tänu tsükliin A-Cdk2 kompleksile, mille aktiivsus G1-faasis on inhibeeritud p27^{Kip1} valgu poolt. Barberis *et al.*, 2005 on näidanud Sic1 ja p27^{Kip1} inhibitoorse domeeni konserveeritust, hoolimata nende järjestuse vähesest sarnasusest. Pagaripärmi Sic1 interakteerub inimese tsükliin A-Cdk2 kompleksi seundumissaidi ja aktiivtsentriga, inhibeerides seda sarnaselt Kip/Cip perekonna valkudega (Barberis *et al.*, 2005).

Sic1 fosforüleerimist hilises G1-faasis on uuritud väga põhjalikult, kuid interaktsioonidest, mis toimuvad Sic1-CDK inhibitoorses kompleksis, on väga vähe teada. On vaid teada, et Clb-Cdk1 komplekside inhibeerimiseks piisab Sic1 70 C-terminaalsest aminohappejäägist (positsioonides 215-284) ning et fosforüleeritud T173 seondub CDK kompleksis Cks1 valguga (Moreno-Torres *et al.*, 2017).

1.2.1. Tsükliinide Cln2 ja Clb5 vahendatud Sic1 fosforüleerimine

Sic1 sisaldab nelja Clb5 spetsiifilist RxL seundumissaiti, kus x on suvaline aminohape (RxL) ning ühte Cln2-spetsiifilist seundumismotiivi Leu-Leu-Pro-Pro (LLPP). S-faasi sisenemist

vahendab rakutsükli Clb5-Cdk1 kompleks, mis kompenseerib oma madala aktiivsuse kasutades tsükliinil pinnal olevat hüdrofoobset taskut, mis seondub substraadil oleva RxL motiiviga (Loog ja Morgan, 2005). Cln2-sõltuv Sic1 fosforüleerimine on mõjutatud hüdrofoobsetest jääkidest koosnevast (LLPP) motiivist Sic1 pinnal, mille muteerimiselalaniinideks vähenes Cln2-sõltuv fosforüleerimine (Kõivomägi *et al.*, 2011a). Cln-Cdk1 kompleksid üksinda ei suuda Sic1 *in vivo* degradeerimisele suunata, Clb-Cdk1 kompleksi aktiivsus on vajalik G1/S-faasi üleminekul Sic1 degradatsiooniks (Kõivomägi *et al.*, 2011b). Cln2-Cdk1 kompleks ajastab Sic1 lagundamist (Yang *et al.*, 2013) ning käivitab positiivse tagasiside tsükli vabanevale Clb5-Cdk1 kompleksile.

Sic1 N-terminaalne osa, olles ise inhibitoorses kompleksis, on vabalt kättesaadav fosforüleerimiseks ning tänu Sic1 lagunemisele vabaneb Clb5-Cdk1, mis kiirendab Sic1 fosforüleerimist ja lagundamist ning tekitab nii positiivse tagasiside kui ka topelt-negatiivse tagasiside tsükli (Venta *et al.*, 2012). Hilises G1-faasis inhibeerib Sic1 Clb5-Cdk1 kompleksi ning Sic1 fosforüleerimise jada algab T5 saidi fosforüleerimisest Cln2-Cdk1 poolt. Sellele järgneb saitide T5/T33/T45/S76 järjestikune fosforüleerimine. Siiski ei vii see ühegi degronipaa ri täielikule fosforüleerimisele, kuna Cln2-Cdk1 fosforüleerib suboptimaalseid saite degronites (T48, S69 või S80) aeglasemalt. Cks1-sõltuva multifosforüleerimise tõttu on Cln2-Cdk1 poolt osaliselt fosforüleeritud Sic1 väga heaks substraadiks Clb5-Cdk1 kompleksidele (Kõivomägi *et al.*, 2011b). Muteerides ühte Sic1 seondumismotiividest (VLLPP või RXL), viibib Sic1 degradatsioon, näidates sellega nii Cln2 kui ka Clb5 vajalikkust Sic1 lagundamise ajastamisse. Oluliseim osa Sic1 lagundamisse suunamisel ning G1/S-faasi üleminekul on siiski vabaneval Clb5-Cdk1 kompleksil ning see toimub, kui tema tase ületab Sic1 valgus taseme (Kõivomägi *et al.*, 2011b).

Selline inhibitoorses kompleksis Sic1 fosforüleerimine võib olla võimalik, kuna Cdk1 aktiivsa it võib inhibitoorses kompleksis olla osaliselt ligipääsetav (Barberis *et al.*, 2012). CKI/CDK süsteemi negatiivse tagasiside tsükkel võib olla konserveerunud läbi liikide ning Sic1 põhjal tehtud uurimustega saaks paremini aimu G1/S-faasi kontrollpunktist teistes organismides, näiteks inimeses, kus oluline CKI G1/S-faasi üleminekul on p27^{Kip1} (Barberis *et al.*, 2005).

Muteerides hüdrofoobse tasku B-tüüpi tsükliinidel või ilma C-terminaalse inhibitoorse alata oleval Sic1 valgul (Sic1 Δ C) neli RxL motiivi (positsioonides 13-15, 89-91, 114-116 ja 147-149), langes märkimisväärselt Clb5-vahendatud fosforüleerimine. Erinevate fosforüleerimissaitide fosforüleerimist toetavad erinevad RxL motiivid – RxL2 (positsioonides 89-97) ja RxL3 (positsioonides 114-116) tõstavad T5 ja T33 fosforüleerimist samas kui S76 fosforüleerimine on seotud vaid RxL3 motiiviga (Joonis 4). RxL motiiv peab paiknema

fosfosaidist C-terminaalses suunas vähemalt 16 aminohappe kaugusel, kusjuures seondumise mõju fosforüleerimisele sõltub kaugusest (Kõivomägi *et al.*, 2013).

1.5. Sünteetiliste võrgustike väljatöötamine mikroorganismides

Geenide reguleerivate võrgustike ja metaboolsete radade ümberkujundamine on sünteetilise bioloogia alustala. Sünteetilisel bioloogial on küll hetkel lühike ajalugu, kuid juba on sellega saavutatud palju just kemikaalide ning ravimite tootmisel. Sünteetilise bioloogia kaudu töötatakse välja biosünteesi radu, et toota mikroobides molekule, mis siiani on olnud saadaval kas loodusliku produktina, poolsünteetilise loodusliku produkti analoogina või looduslikust produktist pärit ainenä. Bioaktiivsete molekulide süntees läbi mikroorganismide võib olla kõrgema saagikusega, madalamate kuludega ning keskkonnasõbralikum (Yadav ja Stephanopoulos, 2010).

Mikroorganismid on saanud oluliseks osaks taastuvatest ressurssidest kemikaalide, kütuste ja materjalide tootmiseks. Läbi sünteetilise bioloogia on juba välja töötatud rakkudele uusi metaboolseid või füsioloogilisi võrgustikke, kujundades täielikult ümber raku metaboolsed rajad ning töötades välja tüvesid rakkudele mitte omaste produktide sünteesimiseks (Na *et al.*, 2010).

Pagaripärm, olles nii geneetiliselt, füsioloogiliselt kui ka biokeemiliselt põhjalikult kaardistatud, on üks enim uuritud organisme ning on sobilik kandidaat sünteetiliste võrgustike kasutuselevõtuks. Pagaripärmi on kerge geneetiliselt manipuleerida ning on ka loodud mitmeid tööriistu selle saavutamiseks. Valgud sisaldavad funktsionaalseid mooduleid, mis kontrollivad reguleerivaid radasid rakkudes ning kasutades ära selliseid juba teadaolevaid mooduleid, on võimalik luua uusi radu spetsiifiliste komponentide tootmiseks (Krivoruchko *et al.*, 2011).

Fosforüleerimisel on oluline osa raku toimivate protsesside kontrollimisel. Sünteetilistes biosünteesi radades on tekkinud vajadus täpselt reguleerida valkude tasemeid. Hiljuti töötati välja pruulimiseks sobilik pärmitüvi, mis annaks tootele vajaliku humala meki, ilma humalat kasutamata, kuna antud tooraine kasvatamine ja tootmine on kallis. Selleks ühendati omavahel rekombinantne DNA, mis pärines pärmist, piparmündist ja basiilikutaimest. Kui muidu metaboolseid biosünteesiradu kasutatakse produktsiooni suurendamiseks, siis erinevate biosünteesiradades osalevate ensüümide ekspressioonitaseme häälestamine on olulisem, et mitte liialt palju metaboolseid kahjustusi pagaripärmi sisse viia ning õige humala maitse saamiseks ei ole vaja kõike palju, vaid täpselt õiges koguses (Denby *et al.*, 2018).

Üheks võimaluseks sünteetilise võrgustiku loomiseks elusrakkudes oleks välja töötada tsükliin-CDK kompleks, mis töötaks rakutsüklist sõltumatuna, kuid oleks võimeline fosforüleerima oma sihtmärke. CDK-1 on mitmeid erinevaid substraatide äratundmise mehhanisme, mis on hästi uuritud ja kirjeldatud (Valk *et al.*, 2014). See annaks võimaluse luua täiesti uut tüüpi sünteetilise võrgustiku rakkudes, lisades substraatidele spetsiifilisi motiive, mille kaudu saaks mõjutada nende stabiilsust, lokalisatsiooni rakus ning interaktsioone teiste valkudega.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on:

1. analüüsida Sic1 inhibitoorse domeeni ja B-tüüpi tsükliin-Cdk1 kompleksi vahelisi interaktsioone inhibitsiooni seisukohast,
2. leida Sic1 inhibitoorsest domeenist valgulisi järjestusi, mis võivad stimuleerida substraatvalgu fosforüleerimist Cdk1 komplekside poolt
3. disainida Sic1 baasil kompaktne valk, mille degradatsioon oleks Cdk1-vahendatud fosforüleerimisest sõltuv ning töötada välja variant sellest, mida rakulised kinaasid fosforüleeriks võimalikult vähe
4. leida tsükliini Clb5 mutant, mis oleks võimeline seonduma inhibitoorsest domeenist leitud seondumismotiividega, kuid mitte RxL motiiviga.

S-faasi Clb5-Cdk1 kompleks on madala aktiivtsentri aktiivsusega, kuid RxL motiivi abil fosforüleerib kindlaid substraate kõrge spetsiifilisusega (Loog ja Morgan, 2005). Nende omaduste tõttu oleks Clb5-Cdk1 sobilik kasutamiseks sünteetilistes radades, kus saaks kasutada Clb5 suunamiseks kindlate substraatide juurde mingit muud motiivi, mida Clb5 substraadid rakutsüklis ei oma. Selleks tuleb uurida, millised interaktsioonid võivad toimuda tsükliiniga Clb5 ning üks potentsiaalne allikas selleks on Clb5-Cdk1 inhibiitor Sic1.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Tüved ja söötmed

Sic1 põhjal loodud konstruktide kloonimisel kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α [supE44, Δ lacU169 (Φ lacZ Δ M15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1] (Invitrogen). Erinevate valkude ekspresseerimiseks kasutati *E. coli* tüve BL21-CodonPlus(De3)-RP [*E. coli* B, F-, ompT, hsdS(rB-, mB-), dcm+, Tetr, gal, λ (DE3),endA, Hte, (argU proLCamr)] (Stratagene). Kõik kasutatud pärmitüved baseerusid w303 [*MATa/MATa* {*leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*} [*phi*⁺] tüvel ning olid MATa paardumistüübiga haploidid.

Δ B6 Δ B5 pärmitüve tegemiseks koos bar1::HISG deletsiooniga kasutati PCR-il ja homoloogilisel rekombinatsioonil põhinevat meetodikat. Homoloogiliste alade pikkus oli 150 aluspaari, markerid võeti pRS304 vektorist.

Nii *E. coli* DH5 α kui ka BL-21 bakterirakke kasvatati Luria Bertani (LB) söötmes (5 g/l pärmiekstrakti (BD Biosciences), 10 g/l NaCl, 10 g/l baktotrüptooni (BD Biosciences), kuhu lisati selektsiooniks vastavalt resistentsusgeenile DH5 α puhul 100 μ g/ml ampitsilliini (AppliChem) või 100 μ g/ml kanamütsiini (AppliChem) ning BL-21 puhul 100 μ g/ml kanamütsiini (AppliChem) ja 50 μ g/ml klooramfenikooli (AppliChem).

Pärmirakke kasvatati mikroskoopia jaoks SC-Ura (i. k *synthetic complete media lacking uracil*) [7 g/l pärmi lämmastiku alust ilma aminohapeteta (BD Biosciences), 0,77 g/l CSM-URA (i. k *complete supplement mixture*) (Formedium), 0,005% ADE/TRP] söötmes koos 2% glükoosiga ja plaaditi SC-Ura plaatidele, milles oli 2% glükoosi ja pärmi transformatsiooniks kasvatati rakke YPD (i. k *Yeast extract, Peptone, Dextrose*) söötmes [10 g/l pärmiekstrakti (Formedium), 20 g/l pepton (Formedium), 20 g/l glükoos (Oriola)].

2.2.2 Sic1-l baseeruvate konstruktid loomine PCR-iga

Sic1 C-terminuse inhibeeriva domääni uurimiseks valmistati Sic1 mutandid, kus Sic1 viidi sisse 10 aminohappe kaupa asendusialaniin-seriin linkeriga või deleteeriti 10 aminohapet (Tabel 1) (Valmistanud Angela Pärn).

Tabel 1. Erinevad Sic1 mutant variandid

| | |
|----|-----------------------------|
| M1 | 274-284 deleteeritud |
| M2 | 264-275 asendatud linkeriga |
| M3 | 255-264 asendatud linkeriga |
| M4 | 245-254 asendatud linkeriga |
| M5 | 234-245 asendatud linkeriga |
| M6 | 224-234 asendatud linkeriga |
| M7 | 214-225 asendatud linkeriga |

Samuti kasutati Sic1 Δ C konstrukti PCR matriitsina, mille CDK fosfosaidid olid muteeritudalaniinideks (va T173 ja S191), et vältida N-terminaalsete fosfosaitide fosforüleerimist ning kindlustada eeldatava tsükli seondumismotiivi kasutamist. Valmistati sellest konstruktid, millele lisati C-terminusele 10, 20 ja 30 aminohapet otsa (Valmistanud Angela Pärn) või lisati C-terminusele juurde Sic1 aminohapped positsioonides 264-284 (Tabel 2).

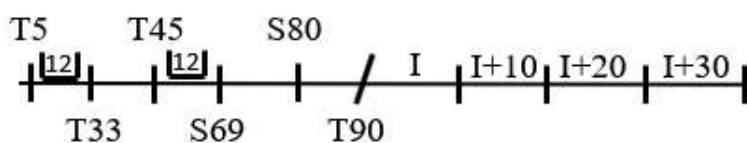
Tabel 2. Sic1 Δ C variandid ning selle pikendused 10 aminohappe kaupa C-terminuse suunas.

| | |
|--------------------------------------|---|
| Sic1 Δ C AP 173 191 | Ilma inhibitoorse domeenita Sic1 |
| Sic1 -224 AP 173 191 | Δ C-le lisati C-terminusest 10 aminohapet |
| Sic1 -234 AP 173 191 | Δ C-le lisati C-terminusest 20 aminohapet |
| Sic1 -244 AP 173 191 | Δ C-le lisati C-terminusest 30 aminohapet |
| Sic1 Δ C + 264-284 AP 173 191 | Δ C-le lisati C-terminusest aminohapped positsioonides 264-284 |

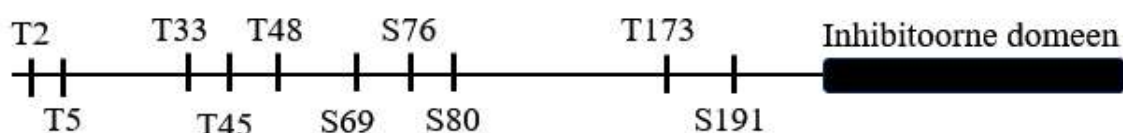
Sic1 Δ C + 264-284 konstrukt loodi kaheetapilise PCR meetodil. Esmalt pikendati esimese PCR reaktsioonikäigus Sic1 Δ C praimeril abil ning saadi Sic1 Δ C + 264-274. Seejärel teise PCR reaktsioonikäigus saadud konstrukti pikendati teise praimeril abil ning saadi lõplik konstrukt Sic1 Δ C + 264-284.

Sic1 põhjal loodi Sic1(min) mutandid (Joonis 5), kus fosfosaitide T5 ja T33 ning T45 ja S69 omavahelised kaugused vähendati 12 aminohappeni ja RxL motiivid on muteeritudalaniinideks (Valmistanud Mihkel Örd). Vähendatud kaugustega toimib CDK fosfosaitide fosforüleerimine efektiivsemalt (Kõivomägi *et al.*, 2013).

A



B



Joonis 5. Sic1(min) mutandid võrdluses metsiktüüpi Sic1 variandiga. A) Sic1 põhjal loodud neli erineva pikkusega Sic1(min) varianti. Fosfosaitide T5 ja T33 ning T45 ja S69 omavahelisi kaugusi on vähendatud 12 aminohappeni. Aminohappele positsioonis 90 on otsa lisatud Sic1 aminohapped positsioonides 200-215 (I), 200-224 (I+10), 200-234 (I+20) ning 200-244 (I+30). B) Võrdluseks on toodud Sic1 metsiktüüpi variandi fosfosaitide paiknemised.

Sic1(min) mutantidele lisati PCR reaktsiooni käigus N-terminaalse praimeriga tuuma lokaliseerimise signaal SV40. Lisaks loodi Sic1 lühikesed (min) mutandid, mille T33 fosfosait oli PCR meetodil muteeritud S33-ks.

PCR meetodit kasutati kõikide Sic1 mutantide valmistamiseks ning PCR-i jaoks kasutati *Phusion*TM (Finnzymes) polümeraasi ja primereid, mis telliti Microsynth-ist. PCR reaktsioonid viidi läbi AerisTM Esco PCR masinas, kasutades primeritele vastavat sulamistemperatuuri ning elongatsiooniga vastavalt iga erineva saadud fragmendi pikkusele, seda kõike 30 tsükliks.

PCR produktid lahutati geelelektroforeesil. PCR reaktsioonisegudele lisati 6x *Orange Loading DNA Dye* (Thermo Scientific) ning laeti 1% TAE-agarosgeelile, kuhu oli lisatud 0,3 µg/ml etiidumbromiidi. Elektroforees viidi läbi Amersham Bioservices foreesiaparaadiga. Produktid puhastati geelist, kasutades *Gel/PCR Purification Kit*-i (Favorgen) vastavalt tootja poolsele juhendile.

Sic1 mutantide puhastamiseks ligeeriti mutandid pET28a vektorisse, saades lugemisraamid, milles N-terminaalsele 6x His-märgisele järgnes mutantne Sic1 lugemisraam. Sic1 mutantide vaatlemiseks *in vivo* viidi konstruktid pRS306 vektorisse, kuhu oli eelnevalt sisestatud Sic1 promootor ja C-terminaalne GFP (i.k. *green fluorescent protein*).

PCR produktide sisestamiseks pRS306 või pET28a vektorisse lõigati produkte BamHI ning SmaI või BamHI ja NheI *FastDigest* restriктаasidega (Thermo Scientific). Restriksiooniks segati kokku 5 µl geelist puhastatud PCR produkti, 2 µl *FastDigest* puhvrit ning 1 µl kumbagi ensüümi ja vett lõppmahuni 20 µl. Proove inkubeeriti 30 minutit 37°C juures ning inaktiveeriti 5 minutit 80°C termostaadis.

pRS306 või pET28a vektorisse produktide ligeerimiseks valmistati segu, mis sisaldas 3 µl restrikteeritud PCR produkti, 50 ng eelnevalt vastavate restriктаasidega lõigatud vektorit, 1 µl T4 ligaasi puhvrit, pRS306 puhul 1 µl PEG4000 (Thermo Scientific) ning 1 µl T4 ligaasi (Thermo Scientific) ning vett lõppmahuni 10 µl. Segusid inkubeeriti 16 °C juures üleöö ning seejärel transformeeriti DH5α rakkudesse.

2.2.3. Oligonukleotiid-suunatud mutagenees

Erinevate Sic1 konstruktide loomiseks kasutati oligonukleotiide, mis sisaldasid keskel muudetavat järjestust komplementaarsel ahelal ja otstes 15 nukleotiidi pikkust komplementaarset ala vastava ssDNA-ga (i. k. *single stranded DNA*). Sic1 rakutsüklist sõltumatu seondumismotiivi uurimiseks asendati kandidaatsaidis ükshaaval üksikud konserveerunud aminohapped (²¹⁶KNPFAS²²¹)alaniinidega (Lisa 1). Matriitsina kasutati 234 aminohappe pikkust Sic1, mille fosfosaidid olid muteeritudalaniinideks (AP), välja arvatud T173 ning S191. Saadud mutandid on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Sic1 üksikmutantide konstruktid. Matriitsina kasutati üksikmutantide tegemisel 234 aminohappe pikkust Sic1, kuhu vahemikku peaks jääma võimalik seondumismotiiv ning mille fosfosaidid olid muteeritud alaniinideks, et kindlustada seondumismotiivi kasutamine (va T173 ja S191).

| | |
|-----------------------------|--|
| Sic1 – 234 K216A AP 173 191 | 216 Lüsiin asendatud alaniiniga |
| Sic1 - 234 N217A AP 173 191 | 217 Asparagiin asendatud alaniiniga |
| Sic1 – 234 P218A AP 173 191 | 218 Proliin asendatud alaniiniga |
| Sic1 – 234 F219A AP 173 191 | 219 Fenüülalaniin asendatud alaniiniga |
| Sic1 - 234 S221A AP 173 191 | 221 Seriin asendatud alaniiniga |

Oligonukleotiidide kineerimisreaktsioon viidi läbi 37 °C juures 45 minutit segus, mis sisaldas 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 425 µM ATP, 6,5 µM oligonukleotiid ning 0,15 U/ µl T4 polünukleotiidi kinaasi (Thermo Scientific). Ensüümi inaktiveerimiseks kuumutati segu 65 °C juures 10 minutit. Oligonukleotiidi seondumiseks ssDNA-le segati kokku 0,5 µl 6,5 µM kineeritud oligonukleotiidi, 50 ng ssDNA-d, 1 µl 10x seondumispuhvrit (200 mM Tris-HCl pH 7,4, 20mM MgCl₂, 500mM NaCl) ning lõppmahuni 10 µl vett. Segusid kuumutati 70 °C termostaadis 10 minutit, pärast mida tõsteti blokk masinast välja ning lasti oligonukleotiidi seondumiseks ssDNA-le jahtuda toatemperatuurile. Komplementaarse ahela sünteesiks ja otste ligeerimiseks lisati 10 µl seondumissegule 1,35 µl sünteesipuhvrit (50 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM ATP, 5 mM dNTP), 0,83 µl 5 U/µl T4 DNA polümeraasi (Thermo Scientific) ning 1,5 µl T4 DNA ligaasi, aktiivsusega 5 Weiss U/µl (Thermo Scientific). Segu hoiti 5 minutit jääl, misjärel hoiti segu 5 minutit toatemperatuuril ning viimasena 37°C juures 90 minutit. Ensüümide inaktivatsiooniks lisati segule 5 µl 1x TE puhvrit (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8). Segust 2 µl transformeeriti DH5α bakterirakkudesse.

2.2.4. *E.coli* tüvede BL21 ning DH5α transformatsioon

E.coli tüve DH5α või BL21-CodonPlus(DE3)-RP kompetentsed rakud (Valmistanud Rait Kivi) sulatati jääl. 2 µl ligatsioonisegule lisati 50 µl DH5α rakke ning BL21 rakkudele lisati 200-300 ng DNA-d. Transformatsioonisegu hoiti jääl 30 minutit, seejärel tekitati rakkudele 42°C juures 2 minuti jooksul kuumašokk, pärast mida tõsteti rakud 1 minutiks jääle. Lisati 500 µl LB söödet ning inkubeeriti rakke 60 minutit 37°C loksutil. Rakud tsentrifugeeriti lauatsentrifuugis 6000 rpm-i 1 minut ning supernatant valati pealt ära nii, et jääks alles umbes 100 µl söödet. Rakud suspendeeriti ning plaaditi LB plaatidele, millesse oli lisatud antibiootikume vastavalt vektori ja bakteri tüve resistentsusgeenidele.

2.2.5. *S. cerevisiae* transformatsioon

pRS306 vektoris olevad Sic1 lühikesed variandid transformeeriti pärmis NcoI *FastDigest* (Thermo Scientific) restriiktaasiga lineariseeritud kujul. Homoloogilise rekombinatsiooniga integreeriti vektor pärmitüvesse *ura3* lookusesse.

Pärmirakke kasvatati 50 ml YPD söötmes loksutil 30°C juures üleöö. Kui kultuur oli saavutanud optilise tiheduse lainepikkusel 600 nm (OD₆₀₀) 0,6-0,8, tsentrifugiti rakud 1 minut 2500 g ning eemaldati vedelik sademe pealt. Sade suspendeeriti 1 ml PL1 lahusega (5 mM Tris-HCl (pH 8), 0,5 mM EDTA, 100 mM LiOAc) ning tsentrifugiti lauatsentrifuugis 1 minut 2000 g. Sademelt eemaldati vedelik ning sade suspendeeriti rakkude ruumalast kahekordse ruumala PL1 lahusega üles ning inkubeeriti toatemperatuuril 10 minutit. Segati kokku transformatsioonisegu, mis sisaldas 600 ng transformeeritavat lineariseeritud vektorit, 10 µl *Salmon sperm* DNA-d (Sigma) (kontsentratsiooniga 10 mg/ml, eelnevalt hoitud 10 minutit 100°C termoblokis), 100 µl toatemperatuuril inkubeerinud pärmirakke, 48 µl DMSO (i.k. *Dimethyl sulfoxide*) ning 700 µl PL2 lahust (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 40% polüetüleenglükool (PEG 3350), 100 mM LiOAc) ja inkubeeriti 42°C termostaadis 40 minutit, pärast mida veel 2 minutit jääl. Seejärel rakud tsentrifugiti 30 sekundit 3000 g ning sademelt eemaldati vedelik ning pesti 1 ml 1x TE lahusega (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8) ning tsentrifugiti 1 minut 2000 g. Taaskord eemaldati sademelt supernatant ning sade suspendeeriti 200 µl 1x TE lahuses ning plaaditi selektiivsetele SC-URA plaatidele.

2.2.6. 6xHis-märgisega Sic1 mutantide puhastamine

His märgistusega Sic1 konstrukte, mis eelnevalt olid transformeeritud BL21 rakkudesse, kasvatati üleöö 37°C 5 ml LB söötmes, kuhu lisati 100 µg/ml kanamütsiini ning 50 µg/ml klooramfenikooli. Kultuuri lahjendati 250 korda 50 ml LB söötmesse. Kultuuri indutseeriti 1mM IPTG-ga OD₆₀₀=0,6 juures 37°C juures. 3 tundi pärast indutseerimist tsentrifugiti rakud alla 5 minutit 5000 g, sade külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80°C juures.

Sademed võeti sulama jääle ning suspendeeriti 1,7 ml lüüsipuhvril (25 mM Hepes-KOH pH 7,4, 300 mM NaCl, 10% glütserool), millele lisati 0,1 U/µl Dnaas I, proteaasi inhibiitorid (1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotiniin, 1 µg/ml pepstatiin A, 1 µg/ml leupeptiin) ning lüütsüümi lõppkontsentratsiooniga 1 mg/ml. Selle puhvriga resuspendeeriti sademed ning lüütsiti 15-20 minuti jooksul 4°C juures, mõne minuti tagant loksutades ning fuugiti 15 minutit 14800 g 4°C

juures. Valgu puhastamiseks valmistati ette kolonnid, milleks pipeteeriti sinna 100 µl Chelating Sepharose keraid (GE Healthcare) ja pesti kolonni kümne kolonni ruumala ddH₂O-ga, kolonni laadimiseks lisati kolonni ühe kolonni ruumala 200 mM CoCl₂ lahust ning pesti kümne kolonni ruumala lüüsipuhvriga. Tsentrifugeeritud supernatant lisati kolonnile, misjärel kolonni pesti kaks korda kümne kolonni ruumala lüüsipuhvriga ning seejärel kümne kolonni ruumala lüüsipuhvriga, kuhu oli lisatud 50 mM imidasool. Valk elueeriti kolmes etapis, kasutades iga kord ühe kolonni ruumala elueerimispuhvrit (300 mM NaCl, 10% glütserool, 25 mM Hepes-KOH pH 7,4) ning eluaadid külmutati vedelas lämmastikus ja hoiustati -80°C peal.

2.2.7. *In vitro* kinaasikatsed

In vitro kinaasikatseteks kasutati tsükliin-Cdk1 komplekse, mis olid puhastatud vastavalt juba kirjeldatud meetoditel (Kõivomägi *et al.*, 2013) või mutant Clb5-Cdk1 komplekse (F284A ja M1), mis olid eelnevalt puhastatud (Kaur Pääbo., 2017) ning 6x His-märgisega puhastatud substraatvalke. Substraatvalkude kontsentratsioone määrati *Coomassie Brilliant Blue G-250*-ga (Applichem) värvitud akrüülamiidgeelidel, võrreldes valkude signaalide intensiivsust akrüülamiidgeelil teada olevate BSA (i.k *bovine serum albumin*) (Thermo Scientific) valgukoguste põhjal tehtud kalibreerimiskõveral. Valgud fikseeriti loksutades akrüülamiidgeele fikseerimispuhvris (30% etanool, 30% äädikhape) 15 minutit, pärast mida värviti geele vähemalt kolm tundi ning pesti veega. Geelid skaneeriti ning valkude signaalide intensiivsus kvantiseeriti ImageQuant TL-iga (Amersham). Sic1 mutantide kontsentratsioon katsetes oli 1 µM või 50nM. Kinaasikatsete jaoks valmistati 20µl reaktsioonisegud: 50mM Hepes-KOH pH 7,4, 200mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,2 mg/ml BSA, 500 nM Cks1, 500 µM ATP, 0,1 µCi/µl [γ -³²P]ATP, ensüüm ja substraatvalk ning inhibitsioonikatsete jaoks 0,04 mg/ml histoon H1. Reaktsioonid viidi läbi toatemperatuuril ning koguti kaks ajapunkti – 8 ja 16 minutil. Reaktsioonid peatati Laemmli SDS puhvriga (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glütserool, 5% β-merkaptotetanool, 2% SDS, 0,01% bromofenoolsinine), Sic1 mutantide multifosforüleerimise uurimiseks võeti vaid üks 16 minutiline ajapunkt ning reaktsioonisegud lahutati 10% *Phos-Tag* (Wako Chemicals) SDS-polüakrüülamiidgeelis (10% akrüülamiid, 25 µM phos-tag, 50 µM MnCl₂), ülejäänud proovid lahutati 10% või 15% SDS-PAA geelil geelelektroforeesil. Geele foreesiti foreesipuhvris (25 mM Tris-HCl, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS) 15 mA juures ning seejärel värviti *Coomassie Brilliant Blue R-250*-ga (Applichem) (40% metanool, 7% äädikhape, 0,025% *Coomassie Brilliant Blue R-250*) ja pesti *High Methanol Destain* lahusega (7% äädikhape, 40% metanool) ja seejärel veega. Reaktsioone analüüsiti

autoradiograafiliselt kasutades Typhoon 5 (Amersham) ning signaale analüüsiti ImageQuant TL (Amersham) programmiga.

2.2.8. *In vivo* katsed

Sic1(min) mutantide ning Sic1(min) muteeritud fosfosaidiga mutandid transformeeriti *in vivo* katse jaoks Clb6 deletsiooniga pärmitüvesse ning kus on lisaks Clb5(wt) või Clb5(F284A) mutant (Kaur Pääbo., 2017). Lisaks on tüves olemas ka Whi5-mCherry, mis on rakutsükli markeriks. *In vivo* mikroskoopia katsete jaoks kasvatati pärmirakke SC-Ura 2% glükoosi söötmes OD=0,2-0,6-ni ning rakud pipeteeriti 18mm alusklaasile ja kaeti 1 mm paksuse 2% agarosiga (SC-Ura söötmesse lisatud *Lonza Nusieve GTG* agaros ning 2% glükoos) ning sellele peale veel omakorda katteklaas.

Rakkude visualiseerimiseks kasutati Zeiss Observer Z1 mikroskoobi 63x/1.4NA õliimmersioon objektiivi ning Orca-r2 C10600-10B kaamerat (Hamatsu Photonics). Rakkude hoidmiseks 30°C juures kasutati Tempcontrol 37-2 digital-i (PeCon) ning pilte tehti rakkudest 8 tunni vältel iga 3 minuti tagant.

Rakke ergastati Whi5-mCherry jaoks 750 ms Colibri 540-80 LED mooduliga ning Sic1-GFP jaoks 15 ms Colibri 470 LED mooduliga, mida kasutati 25% võimsusel. Rakkude segmenteerimiseks ja fluorestsentssignaalide kvantiseerimiseks kasutati MATLAB-i (The Mathworks, Inc) (Doncic *et al.*, 2013).

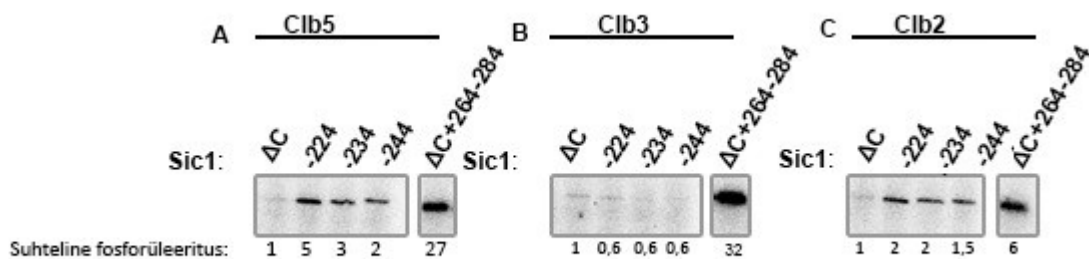
3. Tulemused ja arutelu

3.1. Sic1 inhibitoorse domeeni interaktsioonide positiivne mõju Sic1 fosforüleerimisele

Sic1 on kõrge afiinsusega Clb5-Cdk1 kompleksi inhibiitor (Venta *et al.*, 2012), kuid inhibitsiooniks vajalikke interaktsioone ei ole seni lähemalt uuritud. Käesolevas magistritöös uuriti, kas Sic1 inhibitoorses alas võib leida motiive, mis toimiksid seondumismotiividena tsükliin-Cdk1 kompleksidele ning mis mõjuksid Sic1 fosforüleerimisele positiivselt. Selle uurimiseks mõõdeti *in vitro* tsükliin-Cdk1 komplekside võimet fosforüleerida erinevaid Sic1 mutante, milles mitteinhibitoorsele Sic1 variandile (Sic1(1-215) ehk Sic1 Δ C) oli lisatud järjestusi inhibitoorsest alast (aminohapped positsioonidest 215-224, 215-234, 215-244 või 264-284) (Tabel 2). Sic1 N-terminaalsed fosforüleerimismotiivid olid muteeritudalaniinideks, alles olid C-terminaalsed T173 ning S191. Fosfosaitide muteerimine tegi süsteemi lihtsamaks ning N-terminuses asuvad optimaalsed fosfosaidid häiriksid oletatava seondumissaidi uurimist.

Sic1 mutantide ning tsükliinide omavahelise seondumise mõju fosforüleerimisele uuriti kolme metsiktüüpi kinaaskompleksiga – Clb5-, Clb3- ja Clb2-Cdk1 (Joonis 6).

Sic1 inhibitoorne domeen paikneb 70 C-terminaalse aminohappe sees (Mendenhall, 1999), eemaldades inhibitoorse ala, jääb alles Sic1 Δ C, millel puudub võime inhibeerida tsükliin-Cdk1 komplekse. Joonisel 6 on näha ka tsükliin-Cdk1 komplekside võimetust fosforüleerida Sic1 Δ C mutanti, millel on N-terminaalsed fosfosaidid muteeritud. Lisades aga Sic1 Δ C mutandile C-terminuse aminohapetest 10 aminohapet otsa, mõjub see positiivselt fosforüleerimisele Clb5-Cdk1 puhul (Joonis 6A) ning ka Clb2-Cdk1 kompleksi puhul (Joonis 6C), viidates nende 10 aminohappe sees olevale seondumissaidile, tänu millele saaks toimuda Sic1 mutandi fosfosaitide fosforüleerimine. Veidi nõrgemat fosforüleerimist on näha 20 ja 30 aminohappe kaupa pikendatud Sic1 Δ C puhul Clb5-Cdk1 kompleksi (Joonis 6A) ning Clb2-Cdk1 kompleksi juuresolekul (Joonis 6C), mis võib tuleneda inhibitsioonist. Clb3-Cdk1 puhul need järjestused ei aita fosforüleerimist (Joonis 6B), seega võiks interaktsioon olla tsükliinidega Clb5 ja Clb2. Kuna selle regiooni mõju fosforüleerimisele on tsükliin-spetsiifiline, võib see tähendada, et Sic1 aminohapped positsioonides 214-234 seonduvad ka inhibitoorses Cdk1 kompleksis just tsükliiniga.



Joonis 6. Erinevate tsükliin-Cdk1 komplekside mõju Sic1 variantide fosforüleerimisele.

Joonisel on näidatud autoradiograafid SDS-poliüakrüülamiid geelidel elektroforeesitud *in vitro* kinaasireaktsioonidest, milles uuriti metsiktüüpi tsükliin-Cdk1 komplekside erinevate Sic1 mutantide fosforüleerimise võimet. Tsükliinidest kasutati Clb5 (A), Clb3 (B) ja Clb2 (C). Katses kasutati Sic1 Δ C mutante, mida oli pikendatud 10 aminohappe kaupa ning samuti mutanti, kus oli Sic1 Δ C-le lisatud Sic1 aminohapped positsioonidest 264-284. Iga Sic1 mutandi all on toodud suhteline fosforüleeritus, mis näitab fosforüleerimiskiirust Sic1 Δ C suhtes iga ensüümkompleksi piires.

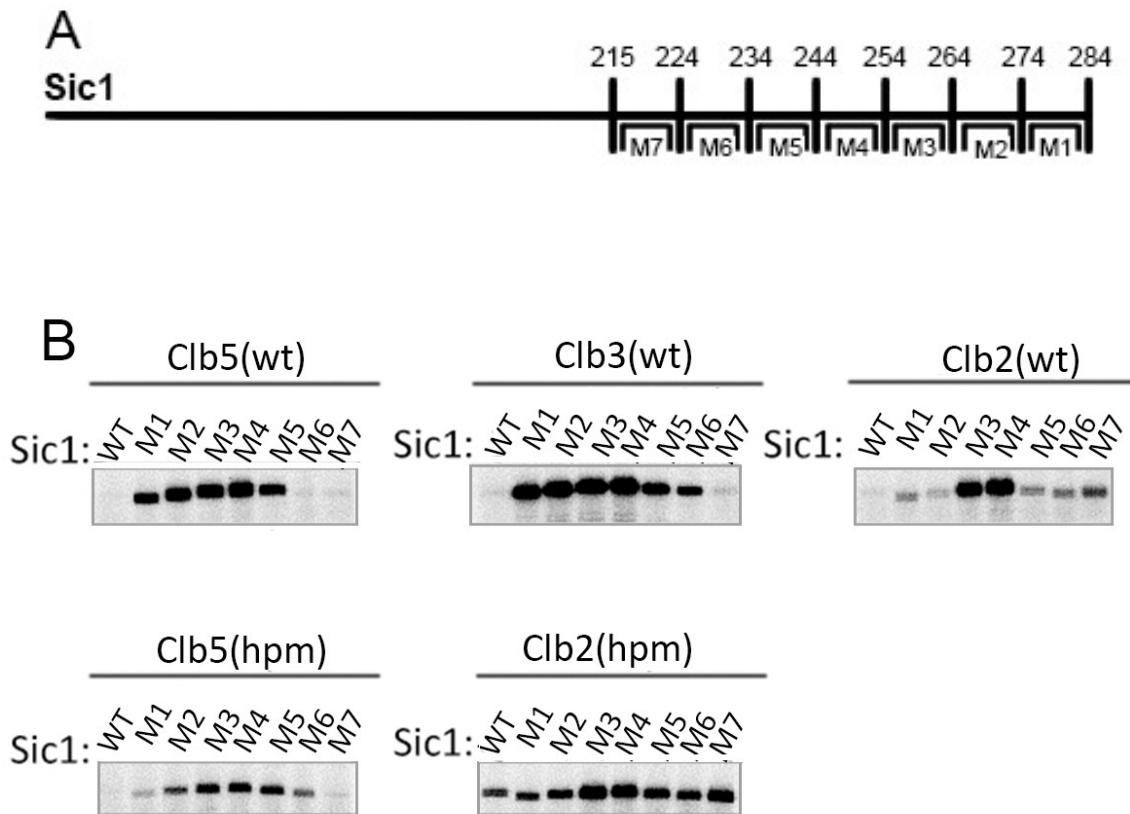
Nii Clb5-, Clb3- kui ka Clb2-Cdk1 kompleksid fosforüleerivad kiirelt Sic1 Δ C+264-284 mutanti (Joonis 6). Sic1 C-terminaalses otsas asub võimalik RxL motiiv – ²⁷⁴KALF²⁷⁷, kusjuures eelnevalt on ka näidatud, et RxL motiivil on tugev mõju Clb5- ja Clb3-Cdk1- vahendatud fosforüleerimisele ning nõrgem mõju Clb2-Cdk1 kompleksile (Kõivomägi *et al.*, 2013). Clb3 kompleksi puhul on Sic1-Cdk1 inhibitsioon sõltuv Clb3 hüdrofoobsest alast (Rainis Venta, avaldamata andmed). Aminohapped 215-244 Clb3 puhul ei mõjuta fosforüleerimist, seega võib oletada, et kuna tsükliinil Clb3 see interaktsioon puudub, on Clb3 kompleksi puhul hüdrofoobse tasku ja C-terminuse RxL motiivi vaheline interaktsioon inhibitsiooniks hädavajalik. Tsükliinid Clb5 ja Clb2 seonduvad aga Sic1 aminohapete 215-224 regiooni ehk C-terminuse algusesse, mis võib aidata kaasa fosfosaidi T173 fosforüleerimisele. On näidatud, et stressi korral fosforüleeritakse Sic1 fosfosait T173 ning fosforüleeritud T173 moodustab seondumissaidi CDK fosfoadapterile Cks1-le (Moreno-Torres *et al.*, 2017). Kinaasikatsetest joonisel 6 selgus, et Sic1 inhibitoorses domeenis võib olla seondumismotiiv, mis suunab Clb5-Cdk1 kompleksi fosforüleerima saiti T173.

3.2. Sic1 inhibitoorse domeeni analüüs

Kirjeldamaks Sic1 inhibitsiooni mehhanisme, asendati metsiktüüpi Sic1 C-terminuses olevad 70 aminohapet 10 kaupaalaniin-seriin linkeriga (Joonis 7A).

Nende mutantidega viidi läbi *in vitro* inhibitsioonikatse, kuhu kõrvale võeti võrdluseks metsiktüüpi Sic1 (wt). Inhibitsiooni katsetesse lisati histoon H1, mille fosforüleerimise järgi saab hinnata inhibitsioonist vaba Cdk1 hulka ning selle alusel uurida erinevate Sic1 mutantide tsükliin-Cdk1 komplekside inhibeerimise võimet. Katses kasutati metsiktüüpi tsükliinide Clb5, Clb3 ning Clb2 kinaaskomplekse ning Clb5 ja Clb2 hüdrofoobse tasku mutantidega komplekse, et näha kas Sic1 mutantide puhul hüdrofoobne tasku muutub inhibitsiooniks vajalikuks.

Clb5-Cdk1 kompleks ei ole võimeline fosforüleerima substraati H1 metsiktüüpi (wt) Sic1 juuresolekul (Joonis 7B) ning sama ka M6 ja M7 puhul, viidates sellele, et M6 ja M7 käituvad kui Sic1 wt ning nende mutantide asendatud 10 aminohappes ei ole midagi inhibitsioonile hädavajalikku. Sic1 aminohappejääkide muteerimine positsioonides 215-224 (M7) ei mõjuta tugevalt inhibitsiooni, toetades hüpoteesi, et nendes positsioonides asub Sic1 fosforüleerimisele positiivselt mõjuv seondumismotiiv, mis suunab T173 fosforüleerimist. Ka Moreno-Torres *et al.*, 2017 näitasid, et T173 ei ole vajalik tugevaks Clb-Cdk1 komplekside inhibitsiooniks *in vitro*. M1-5 on kaotanud oma tugeva inhibitsiooni võime metsiktüüpi Clb5 kinaaskompleksiga (Joonis 7B).



Joonis 7. Sic1 inhibitoorse domeeni mutatsioonanalüüs. (A) Skeem selgitamaks kasutatud Sic1 mutante. Inhibitoorses domeenis asendati 10 aminohappejäägi pikkused lõigud alaniin-seriin linkeriga. (B) Kinaasikatses kasutati metsiktüüpi Sic1 ning seitset erinevat Sic1 mutanti (A) ja substraadina histooni H1, et võrrelda erinevate Sic1 mutantide inhibitsiooni võimet. Katse viidi läbi viie erineva tsükliin-Cdk1 kompleksiga – Clb5, Clb3, Clb2, Clb5(hpm) ning Clb2(hpm). Sic1 kontsentratsioon katses oli 50nM. Joonisel on näidatud polüakrüülamiid geelil lahutatud substraatvalgu H1 32-P radioaktiivne signaal.

Tugev inhibeerimine toimub ka Sic1 wt ning M7 puhul Clb3 kinaasi juuresolekul (Joonis 7B). Võrreldes Clb5- ja Clb2-Cdk1 kompleksidega, on Sic1 C-terminaalsel otsal, mis on muteeritud mutantides M1 ja M2, suurem olulisus Clb3-Cdk1 kompleksi inhibitsiooniks. Koos joonisel 6 toodud andmetega toetab see hüpoteesi, et inhibitoorses kompleksis on Sic1 C-terminaalne RxL motiiv ²⁷⁴KALF²⁷⁷ seotud Clb3 hüdrofoobse taskuga.

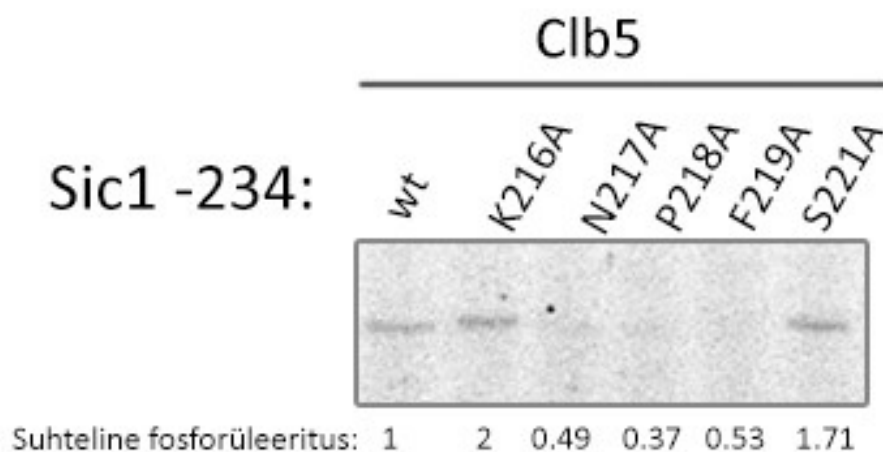
Mitootilise Clb2-Cdk1 kompleksi puhul toimub tugev inhibitsiooni nõrgenemine vaid siis, kui muteerida Sic1 positsioonid 244-264 (M3 ja M4, Joonis 7B). Sic1 inhibitoorse domeeni otstes paiknevatel järjestustel (positsioonides 215-234 ja 264-284) on tsükliin-spetsiifilised mõjud kas inhibitsioonile või Sic1 fosforüleerimisele (Joonis 6, 7B), mis võib tähendada, et inhibitoorses kompleksis on need aminohappejäägid seotud tsükliiniga. Seevastu aminohappejääkide muteerimisel positsioonides 244-264 (M3 ja M4), on sarnane inhibitsiooni nõrgendav mõju kõikidele kasutatud tsükliin-Cdk1 kompleksidele, mis võib tähendada, et selle regiooniga

toimub Sic1 seandumine Cdk1 subühikuga. Nii Clb5 kui ka Clb2 korral nõrgendab tsükliini hüdrofoobse tasku muteerimine Sic1 inhibitsiooni, kusjuures tsükliini muteerimisel on suurem mõju potentsiaalse RxL motiivi ²⁷⁴KALF²⁷⁷ asendamisel (M1) (Joonis 7B). Seega seondub tsükliinide Clb5 ja Clb2 hüdrofoobne tasku täiendavalt mingi Sic1 regiooniga, milleks võivad olla N-terminaalsed RxL motiivid.

3.3. Sic1 positsioonides 215-224 paikneva seandumismotiivi kaardistamine

Eelnevast *in vitro* kinaasikatsest, peatükis 3.1, oli näha nii Sic1 -224, -234 kui ka -244 mutandi tugevat fosforüleerimist Clb5-Cdk1 poolt, kuigi Sic1ΔC-le lisatud aminohapped pärinesid inhibitoorsest domeenist, aitasid lisatud 10-30 aminohapet siiski fosforüleerimisele kaasa. Sellest tulenevalt otsustati kaardistada nende 10 aminohappe hulgast need, mis võiksid toimida Clb5 seandumismotiivina. Selleks valiti konserveerunud aminohapped (²¹⁶KNPFAS²²¹) (Lisa 1) ning need asendati ühe kaupaalaniiniga. Mutantide tegemisel kasutati matriitsina 234 aminohappe pikkust Sic1, millel muteeriti N-terminaalsed fosfosaidid alaniinideks, et vähendada N-terminuses olevate fosfosaitide fosforüleerimisest tulenevat tausta. Kuna fosfosaidid T173 ning S191 ei ole optimaalsed CDK fosforüleerimismotiivid, siis N-terminaalsete optimaalsete fosforüleerimissaitide olemasolu korral varjestaks nende fosforüleerimise signaal C-terminaalsete saitide signaali.

Saadud Sic1 -234 üksikmutantide (Tabel 3) fosforüleerimist vaadeldi metsiktüüpi Clb5-Cdk1 kompleksiga (Joonis 8).



Joonis 8. Sic1 üksikmutantide fosforüleerimise võrdlus metsiktüüpi Clb5 kinaaskompleksiga. Joonisel toodud kinaasireaktsioonid lahutati SDS-PAA geelelektroforeesil. Autoradiograafidel on toodud Sic1 üksikmutantidega kinaasikatse, mis viidi läbi Clb5-Cdk1 kompleksiga. Mutandid on tehtud 234 aminohappe pikkuse Sic1, mille N-terminaalsed fosfosaidid olid muteeritud alaniinideks (AP), baasil. Joonisel on toodud suhteline fosforüleeritus, milles mutantide fosforüleerimissignaali on jagatud wt substraatvalgu fosforüleerimissignaali.

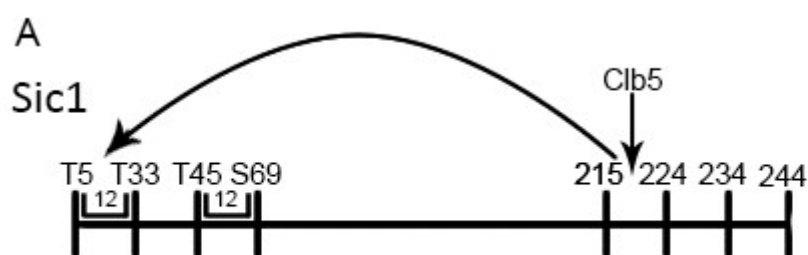
Kinaasikatsele võrdluseks toodi üksikmutantide kõrvale ka metsiktüüpi Sic1(wt), millel olid küll N-terminaalsed fosfosaidid muteeritud ning on 234 aminohappe pikkune, kuid antud motiiv ($^{216}\text{KNPFAS}^{221}$) on jäänud muteerimata.

Näha on nõrka Sic1(wt) fosforüleerimist Clb5 kinaaskompleksi poolt (Joonis 8). Samasugust nõrka fosfosignaali on näha ka Sic1 mutantide K216A ning S221A puhul, viidates justkui nende aminohapete ebaolulisusele antud interaktsioonis. Pea 3 kordne fosforüleerimise kadu, võrreldes wt-ga, on aga kolme üksikmutandi puhul: N217A, P218A ning F219A. Nagu ka jooniselt 6 oli näha, et Sic1 Δ C ning Sic1 -234 fosforüleerimiste vahel on 3 kordne efekt, seega üksikud mutatsioonid kaotavad pea kogu seondumise efekti ära. Seetõttu võib Clb5 kinaaskompleksi seondumismotiiviks olla lühike lineaarne motiiv $^{217}\text{NPF}^{219}$. Need kolm aminohappejääki on ka vastavas Sic1 regioonis enim konserveerunud (Lisa 1).

3.4. NPF motiivi mõju minimaalse Sic1 variandi fosforüleerimisele erinevate Clb5-Cdk1 mutantide poolt

Selleks, et sünteetilistes võrgustikes fosforüleerimise kaudu erinevaid valke reguleerida, tuleks välja töötada erinevad moodulid, mille kaudu vastav fosforegulatsioon toimuks ning mida saab siis huvipakkuvate valkude külge liita. Kuna Sic1 valgu puhul viib fosforüleerimine valgu

lagundamisele, oleks Sic1 baasil võimalik teha valgu stabiilsust mõjutavad moodulid. Selleks, et lisatavad moodulid mõjutaksid vähem huvipakkuva valgu toimimist, võiksid nad olla võimalikud väikesed. Sellest lähtudes disainiti Sic1 valgust minimaalne variant, milles võeti Sic1 90 N-terminaalset aminohappejääki, mille hulgas on kõik vajalikud fosforüleerimissaidid ning fosforüleerimissaitide omavahelisi kaugusi vähendati sedasi, et potentsiaalsete Cks1-vahendatud fosforüleerimise praimer- ja akseptorsaitide omavaheliseks kauguseks jäeti 12 aminohappejääki, mis on minimaalne vajalik distant selle mehhanismi jaoks (Kõivomägi *et al.*, 2013) ning lisati otsa C-terminaalsed aminohappejäägid positsioonidest 200-215, 200-224, 200-234 ja 200-244 (Joonis 9). Lisaks jäeti alles kõik lüsiinid, mis on vajalikud ubikvitineerimiseks. Niisugune minimaalne Sic1 variant nimetati Sic1(min).

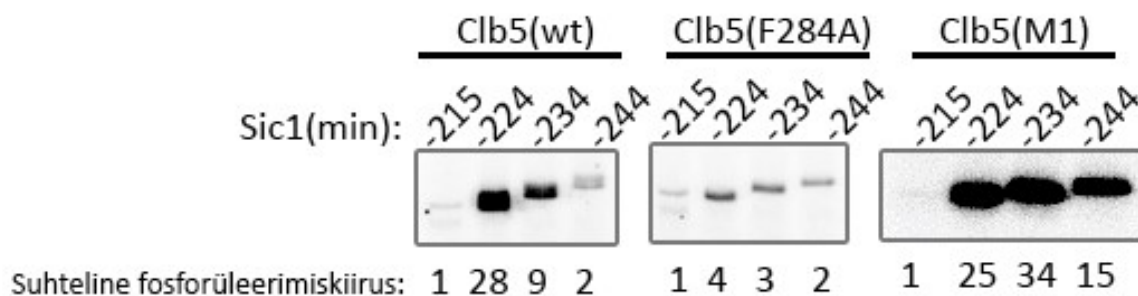


Joonis 9. Sic1(min) variantide kirjeldav skeem. Joonisel näidatud Clb5 seondumissait Sic1(min) mutandis, mille fosfosaitide omavahelised kaugused on vähendatud 12 aminohappeni ning mis aitavad C-terminaalsete saitide fosforüleerimist.

Teine aspekt fosforegulatsioonis on, et rakus olevad kinaasid võivad fosforüleerida disainitud mooduleid või et lisatav kinaas võib fosforüleerida igasuguseid valke, mõjutades rakulisi protsesse. S-faasi tsükliin-CDK kompleksid vajavad oma substraatide kiireks fosforüleerimiseks tsükliin-substraat seondumist. Selleks, et lisatav kinaas ei fosforüleeriks Cdk1 rakutsükli substraate, peaks tsükliini hüdrofoobne tasku olema muteeritud ning substraadi puhul selleks, et vähendada Sic1(min) fosforüleerimist rakutsükli Cdk1 komplekside poolt, muteeriti Sic1(min) valgus ka kõik RxL motiivid.

Selleks, et uurida, kuidas Sic1 inhibitoorse domeeni interaktsioonid mõjutavad Sic1 N-terminaalste fosforüleerimissaitide fosforüleerimist minimaalses Sic1 variandis, lisati Sic1(min) valgule Sic1 aminohappejäägid positsioonidest 200-215, 200-224, 200-234 ja 200-244 (Joonis 9). Neid valke fosforüleeriti kolme Cdk1 kompleksiga, kus tsükliiniks oli kas metsiktüüpi Clb5, Clb5(F284A) või Clb5(M1). Clb5(M1) tsükliinis on muteeritud hüdrofoobse tasku ligidal olevad aminohapped V208, F212, Y267, I268 alaniinideks (Lisa 2) ning need mutatsioonid põhjustavad Sic1-vahendatud inhibitsiooni kadumise (Kaur Pääbo, 2017).

Fosforüleerimise tasemete uurimiseks eraldati *in vitro* katse käigus saadud reaktsioonisegud 15% polüakrüülamiid geelil (Joonis 10).



Joonis 10. Sic1(min) mutantide fosforüleerimise võrdlus erinevate Clb5 kinaaskompleksidega. Katses kasutati Sic1(min) mutante (Joonis 9), mida on pikendatud 10 aminohappe kaupa. Kinaasireaktsioonid viidi läbi erinevate Clb5 kinaaskompleksidega – Clb5(wt), Clb5(F284A) ning Clb5(M1). Kinaasireaktsioonid lahutati SDS-PAA geelelektroforeesil, joonisel on näidatud autoradiograafid. Iga reaktsiooni all on toodud suhteline fosforüleerimiskiirus, mis on jagatud Sic1(min) -215 suhtes.

Võrreldes Sic1(min) -215 ja Sic1(min) -224 fosforüleerimist, selgus et Clb5-Cdk1 kompleks fosforüleerib -224 valku 28 korda kiiremini (Joonis 10). See tähendab, et minimaalsetes Sic1 variantides stimuleerib NPF motiiv ka N-terminaalsete fosforüleerimissaitide fosforüleerimist. Sarnaselt T173-S191 fosforüleerimisega joonisel 6, väheneb ka Sic1(min) puhul fosforüleerimise kiirus, kui lisada pikem lõik inhibitoorsest domeenist.

Clb5(F284A)-Cdk1 puhul kiirendab NPF motiivi lisamine substraadi fosforüleerimist 7 korda vähem võrreldes metsiktüüpi Clb5-Cdk1 kompleksiga (Joonis 10). See võib tähendada, et F284A mutandi puhul Sic1 aminohapete 215-224 vahelises alas oleva motiivi seondumine on suures osas kaduma läinud.

Clb5(M1) mutandi puhul aga fosforüleeritakse kõiki Sic1(min) mutante, mis sisaldavad NPF motiivi, puudub aga Sic1(min) -215 fosforüleerimine, mis on ka oodatav, kuna antud mutant ei sisalda seondumismotiivi. Ei ole teada, kuhu Clb5 mutandi M1 regioonid seonduvad, kuid Sic1(min) -224 seondumist mutatsioonid ära ei riku. Seega on NPF motiiv esimene kirjeldatud B-tüüpi tsükliinide seondumismotiiv, mis ei seonu tsükliini hüdrofoobsesse taskusse.

Sic1(min) mutantidest -224 tekitas metsiktüüpi Clb5 kinaaskompleksiga kõige tugevama fosfosignaali ning näitas kuidas leitud seondumismotiiv stimuleerib fosforüleerimist. Sic1(min) mutandi puhul on seondumissaidi efekt suurem kui eelnevate Sic1 mutantide puhul, millel fosforüleeriti fosfosaiti T173. Põhjuseks võib olla Sic1(min) kompaktsem järjestus, kus

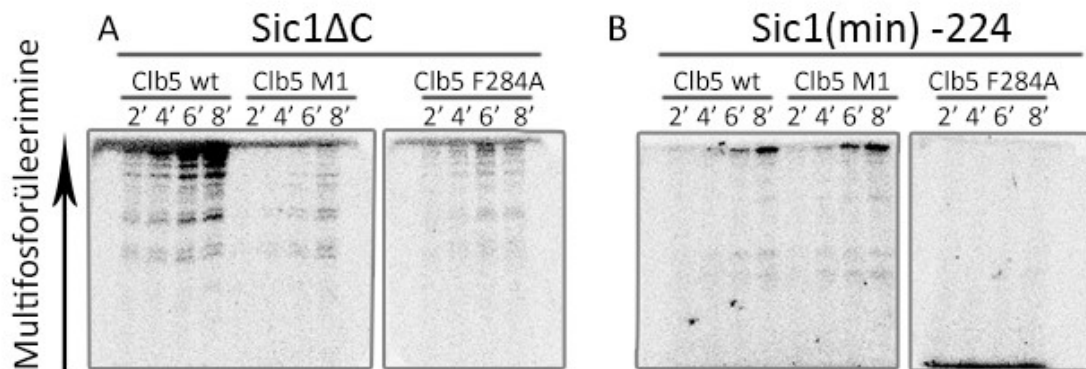
fosforüleeritakse optimaalseid N-terminaalseid fosfosaite ning fosfosaitide kaugused on vähendatud, mis teeb fosforüleerimise efektiivsemaks.

3.5. Sic1(min) valgu multifosforüleerimise dünaamika

Uurimaks, kuidas leitud seondumismotiiv mõjutab substraadi multifosforüleerimise dünaamikat, viidi läbi *in vitro* kinaasikatse metsiktüüpi Clb5-Cdk1 kompleksiga ja mutantsete Clb5-Cdk1 kompleksidega (F284A ja M1) neljal ajapunktil – 2, 4, 6 ning 8 minutil ja eraldati 10% *Phos-Tag* polüakrüülamiidgeelil (Joonis 11)

Sic1 Δ C (Joonis 11A) fosforüleeritakse kiirelt Clb5-Cdk1 metsiktüüpi kinaasi poolt. Kõikides ajapunktides on reaktsioonis tekkinud enim kõrgelt fosforüleeritud Sic1 vormi. Kuna erinevalt fosforüleeritud vormide osakaalud muutuvad ajas vähe, on tegemist suures osas protsessiivse multifosforüleerimisega.

Clb5(M1) kinaaskompleks fosforüleerib Sic1 Δ C valku vähesel määral (Joonis 11A) nng on vähem protsessiivsem, mis võib olla mõjutatud puudulikust substraatseondumisest. M1 mutandi spetsiifika on sarnane Clb5 hpm mutandiga ning vastavad mutatsioonid on tehtud hüdrofoobse tasku läheduses. Kõivomägi *et al.*, 2013 on näidanud, et Sic1 Δ C protsessiivne multifosforüleerimine vajab tsükliin-substraat seondumist. Seega M1 mutatsioonid võivad ära rikkuda hüdrofoobse tasku ja RxL motiivi vahelise seondumise, mistõttu võib arvata, et interaktsioonis substraadi RxL motiiviga osaleb rohkem aminohappejääke kui need kolm, mis on muteeritud hüdrofoobse tasku mutantides.



Joonis 11. Sic1 Δ C ning Sic1(min) -224 mutandi fosforüleerimise protsessiivsuse võrdlus ajas. Kinaasireaktsiooni fosfovormid lahutati *Phos-Tag* polüakrüülamiid geelelektroforeesil. *Phos-Tag* polüakrüülamiidgeel eraldab valgud nende fosforüleerituse astme järgi, geeli ülemisse otsa jäävad kõrgelt fosforüleeritud vormid (6P) ning kõige alumised on ühe fosfaadiga variandid. Joonisel A ning B viidi läbi kinaasikatse erinevate Clb5 kinaaskompleksidega, et võrrelda nende poolset kahe erineva Sic1 mutandi fosforüleeritust.

Clb5(F284A) kinaaskompleks fosforüleerib Sic1 Δ C ning on protsessiivne, kuna tekivad kohe kõrgelt fosforüleeritud vormid (Joonis 11A). Selle mutandi muster on sarnane metsiktüüpi Clb5 kinaaskompleksiga, mis viitab sellele, et RxL motiividega seondumine toimib Clb5(F284A) mutandi puhul.

Sic1(min) -224 mutandi puhul on näha, et metsiktüüpi Clb5 kinaaskompleksiga on antud Sic1 mutant protsessiivsem, kuna reaktsioonis tekib valdavalt maksimaalselt fosforüleeritud vormi (Joonis 11B). Sellel võib olla kaks põhjust: kas fosforüleerimissaitide vahelise distantsi vähendamine muudab Cks1-vahendatud fosforüleerimise nii palju efektiivsemaks või NPF motiiv tagab kõrgema seondumisafiinsuse kui RxL motiivid, võimaldades seega suuremat protsessiivsust.

Clb5(M1) mutant on sarnane metsiktüüpi kinaaskompleksiga, mis näitab, et Sic1(min) -224 mutandi seondumissait stimuleerib fosforüleerimist. Clb5(F284A) kinaaskompleksiga ei ole näha mitte mingisugust fosforüleerimist (Joonis 11B), mis on ka oodatav tulemus, kuna Sic1(min) mutandid ei sisalda RxL motiive ja seetõttu ei toimu ka Sic1(min) -224 mutandi ning Clb5(F284A) mutandi omavahelist interaktsiooni.

Clb5(M1) mutant on seega sobilik alus sünteetilise tsükliin-Cdk1 kompleksi loomiseks, sest on võimeline NPF motiivi vahendusel kiirelt spetsiifilisi substraate fosforüleerima, samas kuna Clb5(M1)-Cdk1 RxL motiiviga substraate ei fosforüleeri, ei tohiks see kinaas teisi Cdk1 rakutsükli substraate suurel määral fosforüleerida. Clb5(F284A) seevastu suudab fosforüleerida

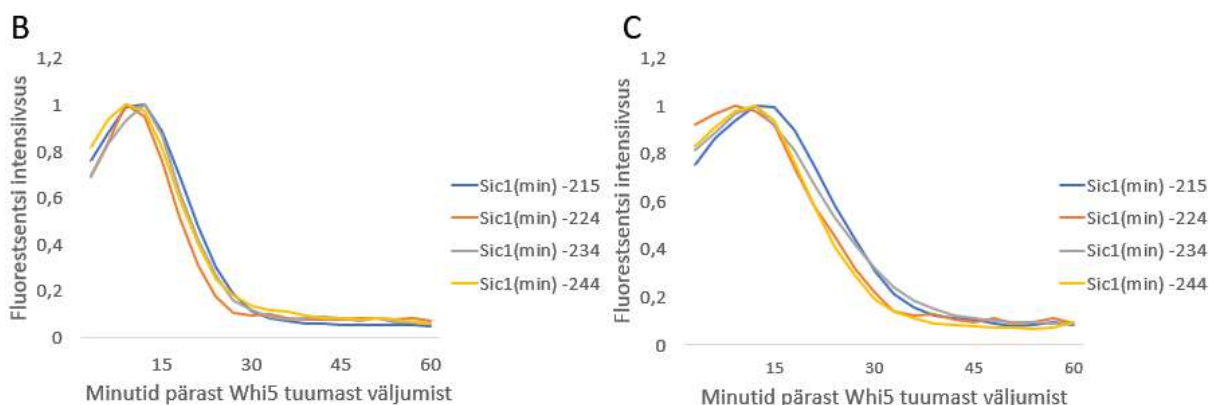
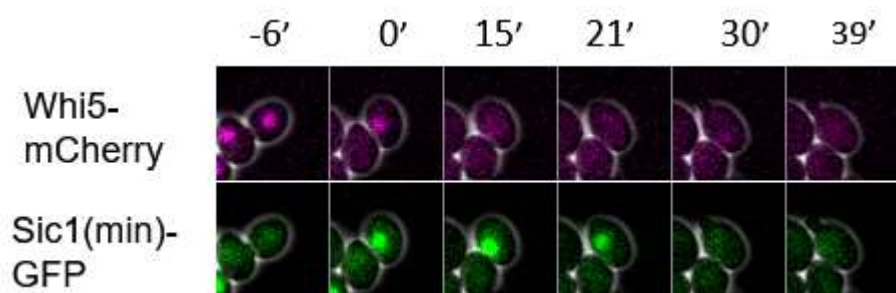
RxL motiiviga substraate, kuid mitte NPF motiiviga substraate. Kuna teadaolevalt ühegi rakutsükli olulise substraadi fosforüleerimine ei sõltu NPF motiivist, siis selleks, et vähendada rakutsükli Cdk1 mõju NPF motiiviga sünteetiliste moodulite fosforüleerimisele, oleks võimalik kasutada pärmitüve, mis ekspresseerib metsiktüüpi Clb5 asemel Clb5(F284A) mutanti. Kuna tsükliin Clb5 on lokaliseerunud rakutuuma (Rossi *et al.*, 2005), siis ekspresseerides NPF motiiviga fosfomoduleid tsütoplasmas, kus toimuvad ka valdav osa metaboolsetest radadest, ei fosforüleeri metsiktüüpi Clb5-Cdk1 neid substraate.

3.6. Sic1(min) mutantide lagundamine *in vivo*

Sic1 fosforüleerimine põhjustab valgude degradatsiooni, seega läbi Sic1 taseme saab vaadata Sic1 fosforüleerimist. Kontrollimaks, kas loodud Sic1(min) mutandid degradeeritakse rakutsüklist sõltuvalt ning uurimaks kas leitud seondumismotiiv võiks stimuleerida fosforüleerimist ka *in vivo*, viidi Sic1(min) mutandid pRS306 vektorisse, kuhu oli eelnevalt viidud Sic1 promootor, ning C-terminaalne GFP. Sic1(min) mutante vaadeldi *clb6Δ* tüves, et oleks võimalik jälgida Sic1 ja Clb5 vahelist interaktsiooni ning et ei toimuks Clb5 mutantide korral Clb6-poolset kompenseerimist rakutsükli. Sic1(min) mutante vaadeldi kahes *clb6Δ* tüves: ühes oli alles metsiktüüpi Clb5, teises aga Clb5(F284A) mutant.

In vivo katse viidi läbi 8 tunni jooksul, kus rakke pildistati iga 3 minuti tagant. Katses ekspresseeriti ka Whi5-mCherry liitvalku, mille liikumisega tuumast välja saab määrata START punkti. G1/S-faasi üleminek toimub umbes 12 minutit pärast Whi5 väljumist tuumast. Eesmärgiks oli vaadelda Sic1(min) mutantide taset pärast Whi5 tuumast väljumist.

Sic1(min) mutantide GFP liitvalkude tase hakkab langema umbes 12 minutit pärast Whi5 väljumist tuumast. Umbes samal ajal vabanevad ka Clb5-Cdk1 kompleksid Sic1-vahendatud inhibitsioonist, mistõttu võib järeldada, et Sic1(min) valkude degradatsioon on fosforüleerimisest sõltuv. Metsiktüüpi Clb5 olemasolul tüves (Joonis 12A) langeb Sic1(min) tase kõige kiiremini -224 mutandi puhul. Sellele järgneb -234 ning -244 mutant. Nendest kõige aeglasem on -215 mutant ning kuna tal puudub ka võimalik seondumissait, siis on see ka oodatav tulemus.



Joonis 12. Sic1(min) mutantide tasemed pärast Whi5 tuumast väljumist. Alajoonisel A toodud fluorestsentsmikroskoopia pildid *in vivo* katsest, kus on näha nii Whi5-mCherry kui ka Sic1(min) mutandi GFP signaal. Whi5 tase 50% on toodud 0 ajapunktina. Alajoonisel B ja C toodud rakkude keskmine fluorestsentsi intensiivsus, mis on iga Sic1(min) mutandi piires normaliseeritud. Erinevad rakud sünkroniseeriti Whi5 tuumast väljumise alusel. Katses uuriti Sic1(min) mutantide taset pärast Whi5 tuumast väljumist. Rakke pildistati iga 3 minuti tagant. (A) Sic1(min) mutante võrreldi metsiktüüpi *Clb5 clb6Δ* tüves. (B) Sic1(min) mutante võrreldi *Clb5(F284A) clb6Δ* tüves.

Clb5(F284A) mutandi olemasolul tüves (Joonis 12B) muutuvad aga Sic1(min) mutandid aeglasemaks ning üldiselt pikemad mutandid lagundatakse kiiremini kui lühemad. Sic1(min) -224 mutant, mis metsiktüüpi *Clb5* juuresolekul langes oma tasemelt poole võrra kõige kiiremini, on *F284A* mutandi olemasolul hoopis aeglasem, kinnitades seondumismotiivi toimimist.

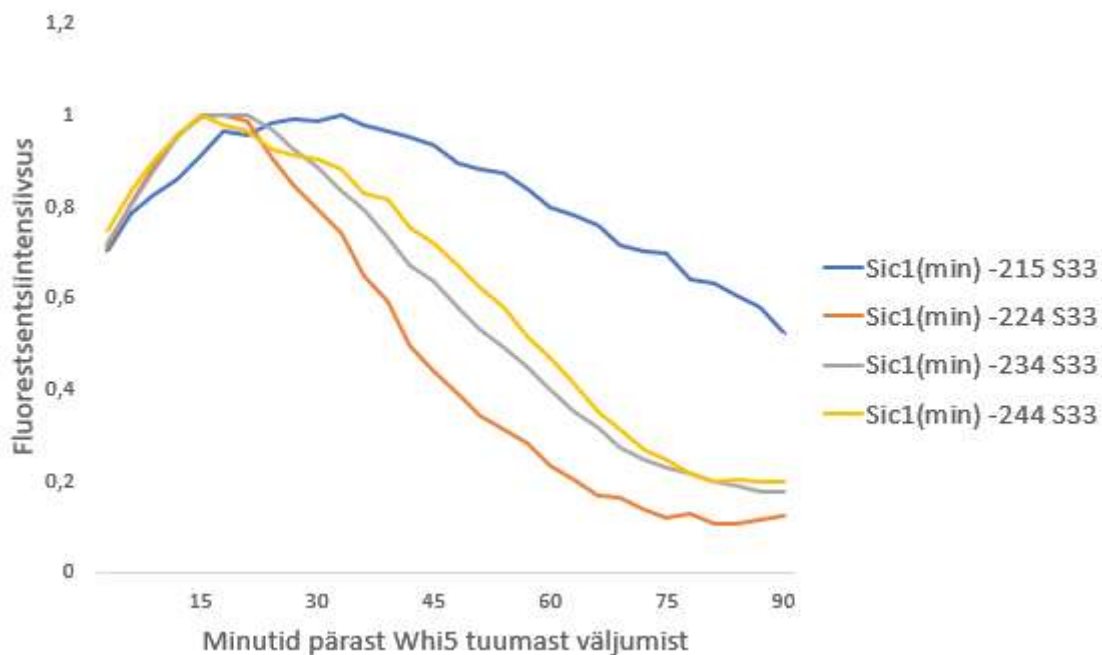
Sellest *in vivo* katsest võib järeldada, et Sic1(min) mutant töötab ning võib võtta Sic1-st tagumise osa ära ja nii saab kompaktsema variandi, mis antud juhul ka rakutsükli töötab. Nendest mutantidest kõige optimaalsem ja kiiremini lagundatav on aga Sic1(min) -224 ning see näitab, et kui lisada veel inhibitoorsest domeenist aminohappeid juurde, muutub degradeerimine aeglasemaks, justkui muutes mutanti inhibiitoriks.

3.8. T33S mutatsioon muudab Sic1(min) degradatsiooni NPF motiivist sõltuvaks

Fosfosaidi T33 muteerimisel seriiniks kaob Cks1-poolne seondumine selle fosforüleerimissaidiga. Eelnevalt on näidatud, et T45-T48 degroni fosforüleerimine toimub Cks1-vahendatud mehhanismil läbi T33 praimersaidi (Kõivomägi *et al.*, 2013).

Peatükis 3.7 nähti, et isegi koos seondumismotiiviga, lagundatakse kõik Sic1(min) mutandid peaaegu sama kiirusega. Seega Sic1(min) puhul on fosforüleerimine piisavalt efektiivne, et tsükliin-substraat seondumine ei ole *in vivo* jaoks liialt oluline. Sellest tulenevalt aga muteeriti fosfosait T33 seriiniks (S33), mis muudab degroni saitide fosforüleerimise aeglasemaks ning muudab Sic1(min) mutandid kehvemateks substraatideks. Selleks, et näha, kuidas T33S mutatsioon mõjutab Sic1 degradatsiooni *in vivo*, ning kas see muutub NPF motiivist sõltuvaks, vaadeldi *clb6Δ* tüves metsiktüüpi Clb5 olemasolul antud substraatide lagundamise kiirust (Joonis 13).

Sic1(min) mutant -215, millel puudub uuritav seondumismotiiv, jääb peaaegu stabiilselt kogu rakutsükli vältel rakkudesse (Joonis 13). Samas aga teiste mutantide tase ei jää rakkudesse stabiilselt, kui lisada Sic1(min) mutandile seondumismotiiv, siis need siiski viiakse lagundamisele, küll aga mitte nii järsult kui ilma fosfosaidi mutatsioonita variantide puhul (Joonis 12A). Kui teha Sic1(min) -224 mutanti pikemaks 10 aminohappe kaupa, ei lähe degradeerimine kiiremaks ning samuti oli eelnevalt näha, et fosforüleerimise kiirus väheneb ka *in vitro*. Seega, kuigi pikem lõik inhibitoorsest domeenist võiks tagada kõrgema seondumisafiinsuse, mis võiks aidata degroni saitide fosforüleerimist, kui Cks1-vahendatud mehhanism on nõrgendatud, on siiski kõige efektiivsemalt fosforüleeritud ainult NPF motiiviga substraat.



Joonis 13. Sic1(min) mutandid muteeritud fosfosaidiga *in vivo* katses. Joonisel toodud fluorestsentsi intensiivsus, mis on iga Sic1(min) fosfosait mutandi piires normaliseeritud. Sic1(min) mutantidel muteeriti optimaalne fosfosait T33 seriiniks, et uurida kas seetõttu muutuvad nad kehvemateks substraatideks. Sic1(min) fosfosait mutante vaadeldi metsiktüüpi *Clb5 clb6Δ* tüves.

Kui teha rakutsükli Cdk1-st sõltumatut Sic1 mutanti, siis on antud *in vivo* katsetest näha, et kui teha Cks1-vahendatud fosforüleerimine aeglasemaks, on võimalik teha substraate, mille fosforüleerimine sõltub spetsiifilise seondumismotiivi olemasolust.

Clb5(M1) on hea alguspunkt rakutsüklist sõltumatu tsükliin-Cdk1 kompleksi tegemisel, kuna see kompleks ei fosforüleeri RxL motiiviga substraate, mistõttu ei tohiks Clb5(M1)-Cdk1 kompleks suurel määral mõjutada rakulisi protsesse. Teiseks, Sic1 ei inhibeeriks Clb5(M1)-Cdk1 kompleksi, võimaldades selle kinaasi aktiivsuse toimimist ka G1-faasis. Clb5 tsükliin degradeeritakse enne anafaasi APC ubikvitiinligaaskompleksist sõltuvalt, kusjuures järjestused, mille abil APC Clb5 tsükliiniga seondub, on teada (Shirayama *et al.*, 1999). Kui need Clb5(M1) puhul ära muteerida, oleks võimalik saada tsükliin-Cdk1 kompleks, mille aktiivsus ei sõltu rakutsüklist.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö põhiliseks eesmärgiks oli uurida, kas Sic1 C-terminaalses inhibitoorses domeenis on olemas motiiv või osa, mis toimiks kui tsükliinide seondumissait, mille kaudu oleks võimalik suunata substraatide fosforüleerimist. Selleks kasutati reaktsioonides erinevaid tsükliin-Cdk1 komplekse, et välja selgitada võimalik seondumismotiiv mõnele tsükliin-Cdk1 kompleksile.

Sic1 inhibitoorne domeen paikneb valgu viimase 70 aminohappe sees. Eemaldades need 70 aminohapet, saadakse Sic1 Δ C, millel puudub inhibeeriv mõju. *In vitro* kinaasireaktsioonidega näidati, et Sic1 C-terminaalsest domeenist võetud järjestused võivad stimuleerida substraadi fosforüleerimist. Pikendades Sic1 Δ C 10 aminohappejäägi kaupa, mõjutab see fosforüleerimist positiivselt, viidates Sic1 aminohapete 215-224 sees olevale võimalikule seondumismotiivile.

Võimaliku seondumismotiivi kaardistamiseks muteeriti leitud alas paiknevad konserveerunud aminohapped (²¹⁶KNPFAS²²¹) alaniinideks. Kinaasireaktsioonidega näidati madalat fosforüleerituse taset, kui muteeritud olid aminohapped ²¹⁷NPF²¹⁹, seega NPF võiks olla võimalik lühike seondumismotiiv.

Analüüsid Sic1 inhibitoorset domeeni, selgus, et inhibitsioonis on tsükliin-spetsiifilised erinevused. Lisaks selgus, et inhibitoorse domeeni N- ning C-terminaalsed otsad seonduvad tsükliiniga ning keskmine osa seondub Cdk1-ga.

Selleks, et sünteetilistes radades fosforüleerimisest sõltuvaid lüliteid kasutada, töötati välja Sic1 baasil kompaktne variant (Sic1(min)), mille degradatsioon toimub Cdk1 fosforüleerimise kaudu. Analüüsid Sic1(min) fosforüleerimist, leiti et efektiivne fosforüleerimine Clb5-Cdk1 poolt sõltub NPF motiivist. Kui lisada pikem lõik Sic1 inhibitoorsest domeenist Sic1(min) külge, mis võiks tagada kõrgema seondumisafiinsuse, siis huvitaval kombel fosforüleerimine aeglustub.

Selgus, et Sic1(min) valku, millele oli lisatud NPF motiiv, fosforüleeritakse protsessiivsemalt kui Sic1 Δ C valku. Kasutades fluorestsentsmikroskoopiat, näidati, et Sic1(min) degradeeritakse fosforüleerimisest sõltuvalt. Metsiktüüpi Sic1(min) puhul toimus degradatsioon kiiresti, sõltudes vähesel määral seondumismotiividest. Kui aga muteerida T33 fosfosait seriiniks ning läbi selle teha Cks1-vahendatud fosforüleerimine aeglasemaks, on võimalik teha substraate, mille fosforüleerimine sõltub olemasolevast spetsiifilisest seondumismotiivist.

Muteerides tsükliini Clb5 on võimalik luua Clb5-Cdk1 mutante, mis fosforüleerivad spetsiifiliselt kas RxL või NPF motiiviga substraate.

Mapping of CDK inhibitory docking motifs on Sic1

Reelika Schilf

Summary

In this thesis the aim was to study Sic1 C-terminal inhibitory domain and its possible linear motif, that would stimulate phosphorylation and that could be used to direct substrate phosphorylation. Different cyclin-Cdk1 complexes were used for identifying the possible docking motif.

Sic1 inhibitory domain consists of 70 amino acids from the C-terminal inhibitory domain. By removing those amino acids, we have a noninhibitory Sic1 Δ C. During *in vitro* kinase assays, it was seen that Sic1 has a part in its inhibitory domain, that stimulates phosphorylation. Extending the Sic1 Δ C mutant by 10 amino acids, we get a higher phosphorylation rate, indicating that there could be a docking motif.

To map the possible docking motif, the conserved amino acids found in the area (²¹⁶KNPFAS²²¹) were mutated into alanines. When amino acids ²¹⁷NPF²¹⁹ were mutated, there was low phosphorylation signal, meaning that NPF could be a possible short binding motif for cyclin docking.

Analysing the inhibitory domain of Sic1, it was seen that there are differences in inhibition with different cyclin-CDK complexes. It turned out that the inhibitory domains N- and C-terminal parts bind to cyclin, but the middle part binds to Cdk1.

A short Sic1 mutant was made (Sic1(min)), that is degraded by phosphorylation by Cdk1. By analysing the Sic1(min) phosphorylation, it was seen that effective Clb5-Cdk1 phosphorylation depends on the NPF motif. If you extend the Sic1(min) mutant with amino acids from the inhibitory domain, it slows down the phosphorylation rate.

It was seen that Sic1(min) mutant with NPF motif is phosphorylated more efficiently than Sic1 Δ C. With fluorescence microscopy it was seen that Sic1(min) degradation depends from its phosphorylation. Sic1(min) wildtype was degraded fast, meaning that it doesn't depend on its docking motif. When phosphoserine T33 was mutated into S33, the Cks1 mediated phosphorylation is slower and with that it is possible to make substrates that depend on the specific docking motif NPF.

KASUTATUD KIRJANDUS

Barberis, M., Gioia, L. De, Ruzzene, M., Sarno, S., Coccetti, P., Fantucci, P., Vanoni, M., ja Alberghina, L. (2005). The yeast cyclin-dependent kinase inhibitor Sic1 and mammalian p27 Kip1 are functional homologues with a structurally conserved inhibitory domain. *Biochem. J.* 387: 639–647.

Barberis, M., Linke, C., Adrover, M.À., González-novo, A., Lehrach, H., Krobitch, S., Posas, F., ja Klipp, E. (2012). Sic1 plays a role in timing and oscillatory behaviour of B-type cyclins. *Biotechnol. Adv.* 30: 108–130.

Bhaduri, S., ja Pryciak, P.M. (2011). Article Cyclin-Specific Docking Motifs Promote Phosphorylation of Yeast Signaling Proteins by G1 / S Cdk Complexes. *Curr. Biol.* 21: 1615–1623.

Bloom, J., ja Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 149–160.

Bourne, Y., Watson, M.H., Arvai, A.S., Bernstein, S.L., Reed, S.I., ja Tainer, J.A. (2000). Crystal structure and mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle regulatory protein Cks1: implications for domain swapping, anion binding and protein interactions. *Structure* 8: 841–850.

Brown, N.R., Noble, M.E.M., Endicott, J.A., ja Johnson, L.N. (1999). The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.* 1: 483–43.

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.

Bähler, J. (2005). Cell-Cycle Control of Gene Expression in Budding and Fission Yeast. *Annu. Rev. Genet.* 39: 69–94.

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.

Denby, C.M., Li, R.A., Vu, V.T., Costello, Z., Lin, W., Chan, L.J.G., Williams, J., Donaldson, B., Bamforth, C.W., Petzold, C.J., *et al.* (2018). Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer. *Nat. Commun.* 9: 1–10.

- Doncic, A., Falleur-fettig, M., ja Skotheim, J.M. (2011). Distinct interactions select and maintain a specific cell fate. *Mol. Cell* 43: 528–539.
- Doncic, A., Eser, U., Atay, O., ja Skotheim, J.M. (2013). An Algorithm to Automate Yeast Segmentation and Tracking. *PLoS One* 8: e57970.
- Enserink, J.M., ja Kolodner, R.D. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div.* 5: 1–41.
- Ferrezuelo, F., Colomina, N., Futcher, B., ja Aldea, M. (2010). The transcriptional network activated by Cln3 cyclin at the G1-to-S transition of the yeast cell cycle. *Genome Biol.* 11: R67.
- Glotzer, M., Murray, A.W., ja Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132.
- Hao, B., Oehlmann, S., Sowa, M.E., Harper, J.W., ja Pavletich, N.P. (2007). Structure of a Fbw7-Skp1-Cyclin E Complex: Multisite-Phosphorylated Substrate Recognition by SCF Ubiquitin Ligases. *Mol. Cell* 26: 131–143.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R., ja Reid, B.J. (1973). Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic analysis of *cdc* mutants. *Genetics* 74: 267–268.
- Holloway, S.L., Glotzer, M., King, R.W., ja Murray, A.W. (1993). Anaphase Is Initiated by Proteolysis Rather Than by the Inactivation of Maturation-Promoting Factor. *Cell* 73: 1393–1402.
- Holmes, J.K., ja Solomon, M.J. (1996). A Predictive Scale for Evaluating Cyclin-dependent Kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 25240–25246.
- Hopkins, M., Tyson, J.J., Novák, B., ja Solomon, M.J. (2017). Cell-cycle transitions: a common role for stoichiometric inhibitors. *Mol. Biol. Cell* 28: 3437–3446.
- Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H., ja Nasmyth, K. (1993). A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science* 261: 1551–1557.
- Krivoruchko, A., Siewers, V., ja Nielsen, J. (2011). Opportunities for yeast metabolic engineering: Lessons from synthetic biology. 262–276.
- Kõivomägi, M., ja Skotheim, J.M. (2014). Docking interactions: Cell-cycle regulation and beyond. *Curr. Biol.* 24: 647–649.
- Kõivomägi, M., Valk, E., Venta, R., Iofik, A., Lepiku, M., Morgan, D.O., ja Loog, M. (2011a). Dynamics of Cdk1 Substrate Specificity during the Cell Cycle. *Mol. Cell* 42: 610–623.

Kõivomägi, M., Valk, E., Venta, R., Iofik, A., Lepiku, M., Balog, E.R.M., Rubin, S.M., Morgan, D.O., ja Loog, M. (2011b). Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature* 480: 128–131.

Kõivomägi, M., Örd, M., Iofik, A., Valk, E., Venta, R., Faustova, I., Kivi, R., Balog, E.R.M., Rubin, S.M., ja Loog, M. (2013). Multisite phosphorylation networks as signal processors for Cdk1. *Nat. Publ. Gr.* 20: 1415–1424.

Lengronne, A., Schwob, E., ja Mende, R. De (2002). The Yeast CDK Inhibitor Sic1 Prevents Genomic Instability by Promoting Replication Origin Licensing in Late G1. *Mol. Cell* 9: 1067–1078.

Lew, D.J. (2003). The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 648–653.

Loog, M., ja Morgan, D.O. (2005). Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature* 434: 104–108.

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. Publ. Gr.* 20: 1407–1414.

Mendenhall, A.H.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.

Mendenhall, M.D. (1993). An inhibitor of p34cdc28 protein kinase activity from *S. cerevisiae*. *Science* (80-.). 259: 216–219.

Mendenhall, M.D. (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.

Michaelis, C., Ciosk, R., ja Nasmyth, K. (1997). Cohesins: Chromosomal Proteins that Prevent Premature Separation of Sister Chromatids. *Cell* 91: 35–45.

Moreno-Torres, M., Jaquenoud, M., Péli-Gulli, M.-P., Nicastro, R., ja De Virgilio, C. (2017a). TORC1 coordinates the conversion of Sic1 from a target to an inhibitor of cyclin-CDK-Cks1. *Cell Discov.* 3: 17012.

Morgan, D.O. (2007). *The Cell Cycle: Principles of control*. p13-15. 1st ed. New Science Press.

Na, D., Kim, T.Y., ja Lee, S.Y. (2010). Construction and optimization of synthetic pathways in

- metabolic engineering. *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 363–370.
- Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 21.
- Nugroho, T.T., ja Mendenhall, M.D. (1994). An inhibitor of yeast cyclin-dependent protein kinase plays an important role in ensuring the genomic integrity of daughter cells. *Mol. Cell Biol.* 14: 3320–3328.
- Pääbo, K. (2017). Clb5 valgu mutagenees ja selle mõju substraatvalkude fosforüleerimisele
- Raspelli, E., Cassani, C., Chirolì, E., ja Fraschini, R. (2015). Budding Yeast Swe1 Is Involved in the Control of Mitotic Spindle Elongation and Is Regulated by Cdc14 Phosphatase during Mitosis. *J. Biol. Chem.* 290: 1–12.
- 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.
- Rossi, R.L., Zinzalla, V., Mastroiani, A., Vanoni, M., Rossi, R.L., Zinzalla, V., ja Alberghina, L. (2005). Subcellular Localization of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitor Sic1 is Modulated by the Carbon Source in Budding Yeast. *Cell Cycle* 4: 1798–1807.
- Schulman, B.A., Indstrom, 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., Böhm, T., Mendenhall, M.D., ja Nasmyth, K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79: 233–244.
- Shirayama, M., Tóth, A., Gálová, M., ja Nasmyth, K. (1999). APCCdc20 promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* 402: 203.
- Tang, Y., ja Reed, S.I. (1993). The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G 1 and G2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 7: 822–832.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F., ja Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400: 37.
- Valk, E., Venta, R., Örd, M., Faustova, I., Kõivomägi, M., Loog, M., ja Kellogg, D. (2014). Multistep phosphorylation systems : tunable components of biological signaling circuits. *Mol. Biol. Cell* 25: 3456–3460.
- Venta, R., Valk, E., Kõivomägi, M., ja Loog, M. (2012). Double-negative feedback between S-

- phase cyclin-CDK and CKI generates abruptness in the G1/S switch. *Front. Physiol.* 3: 1–15.
- Verma, R., Feldman, R.M.R., ja Deshaies, R.J. (1997). Sic1 Is Ubiquitinated In Vitro by a Pathway that requires CDC4, CDC34 and cyclin/CDK activities. *Mol. Biol. Cell* 8: 1427–1437.
- Visintin, R., Craig, K., Hwang, E.S., Prinz, S., Tyers, M., Amon, A., ja Irniger, C. (1998). The Phosphatase Cdc14 Triggers Mitotic Exit by Reversal of Cdk-Dependent Phosphorylation. *Mol. Cell* 2: 709–718.
- Wittenberg, C., ja Reed, S.I. (2005). Cell cycle-dependent transcription in yeast : promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* 24: 2746–2755.
- Yadav, V.G., ja Stephanopoulos, G. (2010). Reevaluating synthesis by biology. *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 371–376.
- Yamamoto, A., Guacci V, ja Koshland, D. (1996a). Pds1p is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 133: 85–97.
- Yamamoto, A., V, G., ja Koshland, D. (1996b). Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J. Cell Biol.* 133: 99–110.
- Yang, X., Lau, K., Sevim, V., ja Tang, C. (2013). Design Principles of the Yeast G1 / S Switch. *PLoS One* 11: e1001673.

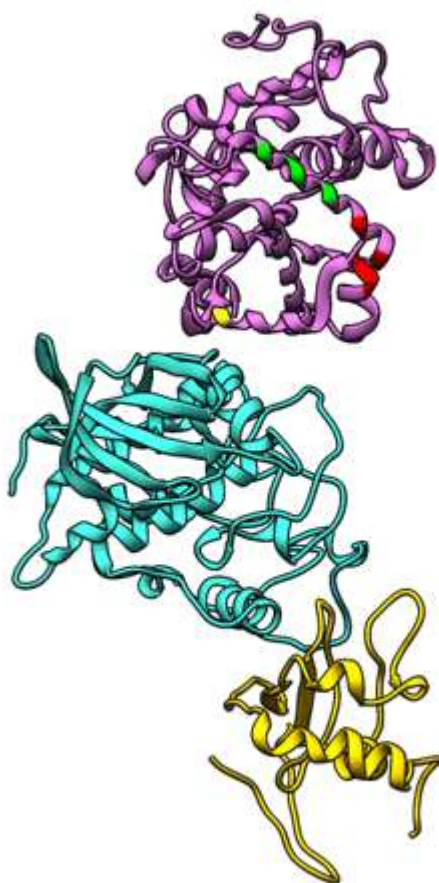
LISAD

Lisa 1.

| | |
|-----------------------|--------------|
| <i>S. cerevisiae</i> | RVGKNPFASDEL |
| <i>C. glabrata</i> | KPLKNPFASDDV |
| <i>T. delbrueckii</i> | KSLYNPFQSEEV |
| <i>V. polyspora</i> | NSSVNPFFSDSI |
| <i>Z. rouxii</i> | VTPTNPFQSSSP |
| <i>K. lactis</i> | SNLENPFLSNNI |
| <i>E. cymbalariae</i> | IKLPNPFLSDEF |
| <i>L. meyersii</i> | KSLKNPFESGST |
| <i>K. africana</i> | GKLINPFESTKV |
| <i>N. castellii</i> | VSSYNPFMDSKV |
| <i>A. aceri</i> | LQLENPFLACGA |
| <i>C. jadinii</i> | AELHNPFISSSS |

Lisa Joonis 1. Konserveerunud NPF motiiv erinevates pärmiliikides. Joonisel toodud Sic1 homologide konserveerunud motiiv eri pärmiliikides, mis võiks toimida kui seondumismotiiv ning stimuleerida fosforüleerimist.

Lisa 2



Lisa Joonis 2. Clb5-Cdk1-Cks1 kompleksi struktuurimudel koos Clb5 muteeritud aminohapetega. Joonisel Cks1 värvitud kollaseks, Cdk1 siniseks. ning Clb5 lillaks. Clb5 pinnal on kollasega märgitud F284A, punasega M1 mutandi mutatsioonid (V208A, F212A, Y267A ja I268A) ning rohelisega hpm mutandi mutatsioonid (M197, L201 ja W204).

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Reelika Schilf

(sünnikuupäev 17.03.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loe (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Sic1 ja CDK kompleksi vaheliste inhibitoorsete seondumismotiivide kaardistamine“,

mile juhendajad on Mart Loog ja Mihkel Örd,

1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguste 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