

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Sic1 baasil loodud sünteetiliste degronite fosfosaitide iseloomustamine *Saccharomyces cerevisiae*'s

Bakalaureusetöö

12 EAP

Kristel Alman

Juhendaja *Ph.D* Rait Kivi

TARTU 2018

INFOLEHT

Sic1 baasil loodud sünteetiliste degronite fosfosaitide iseloomustamine *Saccharomyces cerevisiae*'s

Rakkude ehituskividenä pakuvad valgud mitmeid viise ka rakutsükli mõjutamiseks. Valkude töötlemine võimaldab nende funktsiooni muuta, näiteks läbi fosforüleerimise. Sic1 valk vastutab rakus sünteesifaasi minemise ehk rakutsükli alustamise eest. Sic1 valku lagundatakse ubiquitiin-proteasoomi rajal, kuhu võib valk sattuda fosfodegronite fosforüleerimise kaudu tsükliinsõltuva kinaasiga. Käesolevas bakalaureusetöös disainiti Sic1 baasil sünteetilised degronid, mille erinevate fosforüleerimissaitide mõju Sic1 lagundamisele uuriti *in vivo* degronile liidetud eGFP ja mCherry fluorestsentsmarkerite abil mikroskoobi ning FACSiga. Samuti uuriti aminohappelise järjestuse mõju degronis kinaasiga seondumisel. Kogutud andmeid ning loodud katsesüsteemi saab edaspidi kasutada erinevate kontrollitava toimega fosfodegronite loomiseks.

Märksõnad: degron, fosforüleerimine, kinaas, rakutsükkel

CERCS kood: P310 (Proteiinid, ensüümid)

Characterization of synthetic degron phosphosites based on Sic1 in *Saccharomyces cerevisiae*

Serving as the building blocks for cells, proteins have several ways to influence the cell cycle. The processing of proteins enables the altering of their functions, for example through phosphorylation. Sic1 protein is responsible for initiating the synthesis phase, i.e., the cell cycle. The Sic1 protein is degraded in the ubiquitin-proteasome pathway, where the protein can enter due to the phosphorylation of the phosphodegron by the cyclin-dependent kinase. In this bachelor thesis, Sic1-based synthetic degrons were designed and the effects of various phosphorylation sites on Sic1 degradation were studied *in vivo* using microscopy and FACS with eGFP and mCherry fluorescence markers combined. The effect of the amino acid sequence on degron kinase binding was also studied. The collected data and the generated test system can be used to create various tunable phosphodegrons.

Key words: degron, phosphorylation, kinase, cell cycle

CERCS research code: P310 (Proteins, enzymology)

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Pärmirakutsükkel ja selle regulatsioon	7
1.2. Cdk1-tsükliin komplekside roll rakutsükli regulatsioonis	8
1.3. Cdk1-tsükliini substraadispetsiifilisus	10
1.4. Valkude degradatsioon pärmis.....	12
1.5. Valkude degradatsioon fosfodegronite abil	13
1.6. Cln2 Grr1 degroni iseloomustamine.....	14
1.7. Sünteetilised degronid.....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA	16
2.1. Töö praktilise osa eesmärgid	16
2.2. Materjalid ja meetodika	16
2.2.1. Kasutatud plasmiidid, tüved, söötmed, lahused	16
2.2.2. Degronite disain.....	17
2.2.3. Degronite nimekiri.....	17
2.2.4. PCR synthDNA-mCherry fragmendi tegemiseks.....	19
2.2.5. Restriktsioon.....	20
2.2.6. Ligatsioon	20
2.2.7. Transformatsioon <i>E. coli</i> DH5 α rakkudesse.....	20
2.2.8. Plasmiidide eraldamine <i>E. coli</i> DH5 α rakkudest.....	21
2.2.9. PCR N- ja C-terminaalsete fragmentide amplifitseerimiseks.....	21
2.2.10. PCR degroni kokkuliitmiseks	22
2.2.11. Restriktsioon pärmis transformeerimiseks.....	22
2.2.12. Transformatsioon pärmis	22
2.2.13. Mikroskoopia	23
2.2.14. FACS.....	23
2.3. Tulemused ja arutelu.....	24
2.3.1. Fosfodegronite disainimine	24
2.3.2. Fosfodegronite analüüs <i>in vivo</i> : mikroskoopia.....	24
2.3.3. Fosfodegronite analüüs <i>in vivo</i> : FACS	27
KOKKUVÕTE	32
SUMMARY	33

KASUTATUD ALLIKAD	34
LISAD	37
LISA 1: Töös kasutatud praimerid.....	37
LISA 2: Aminohappe järjestused degronite kaupa	39
LISA 3: Töös kasutatud pRS305 Adh1 promootoriga vektor	44
LISA 4: FACS katse R1, mCherry ja GFP filter	45
LISA 5: mCherry keskvaärtused – DOM0090 fluorestsents.....	46
LIHTLITSENTS.....	47

KASUTATUD LÜHENDID

Sic1 – (i.k *Subunit Inhibitor of Cyclin-dependent protein kinase 1*)

CDK – tsükliinsõltuv kinaas (i.k *cyclin dependent kinase*)

Cln – N-tüüpi tsükliin

Clb – B-tüüpi tsükliin

SCF – i.k *Skp1-Cullin-F-box*

SBF – i.k *SCB Binding Factor*

RxL – aminohappeline motiiv, milles arginiini ja leutsiini vahele võib jääda üks suvaline aminohape

LRR – leutsiinirikas aminohappejärjestus

TPD – suunatud valgu degradatsioon (i.k *targeted protein degradation*)

LB - Luria-Bertani sööde

DMSO – dimetüülsulfoksiid

FACS – fluorestsents-signaali detekteeriv läbivoolutsütomeeter (i.k *fluorescence activated cell sorter*)

GFP – roheliselt fluorestseeruv valk (i.k *green fluorescent protein*)

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

OD600 – optiline tihedus 600nanomeetri juures (i.k *optical density*)

SAM – S-adenosüül-L-metioniin

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

SISSEJUHATUS

Pidevaks arenguks ning jätkusuutlikuks püsimiseks protsessivad rakud nii keskkonnast tulevaid kui ka rakusiseseid signaale. Kasutades erinevaid signaaliradasid on võimalik rakkudel adapteeruda erinevate tingimustega. Signaaliradades kantakse teave edasi mööda erinevaid valke. Valkude fosforüleerimise abil on samuti võimalik nende funktsiooni muuta. Neile signaalidele toetumine võimaldab rakkudel jälgida ka oma rakutsükli kas seda aktiveerides või peatades, sealjuures enamasti on vajalik käiva faasi lõpetamine.

Üks olulisemaid kontrollpunkte rakutsükliks asub G1-faasi lõpus ning selle läbimine võimaldab rakul edasi minna sünteesifaasi. S-faasi minek on algus uuele rakutsüklile, mille tulemusena tekib kaks identset tütarrakku. Kuna see on rakule ressursside poolest väga kulukas protsess, on sünteesifaasile eelnev kontrollpunkt rakule väga tähtsaks indikaatoriks. Olulised signaalid on eelkõige seotud keskkonnaga, metabolismiga ning substraatidega replikatsiooniks. Kui need tingimused pole sobivad rakujagunemiseks, läheb rakk üle G0- ehk puhkefaasi.

Sic1 valk on S-faasi minekul inhibeeriva toimega, seega selle lagundamisel on võimalik rakk viia sünteesifaasi. Sic1 valku lagundatakse ubikvitiin-proteasoomi rajal, kuhu võib valk sattuda fosfodegronite fosforüleerimise kaudu tsükliinsõltuva kinaasiga. Käesolevas bakalaureusetöös disainiti Sic1 baasil sünteetilised degronid, mille erinevate fosforüleerimissaitide mõju Sic1 lagundamisele uuriti *in vivo* degronile liidetud fluorestsentsmarkerite abil. Samuti uuriti töös aminohappelise järjestuse mõju degronis kinaasiga seondumisel.

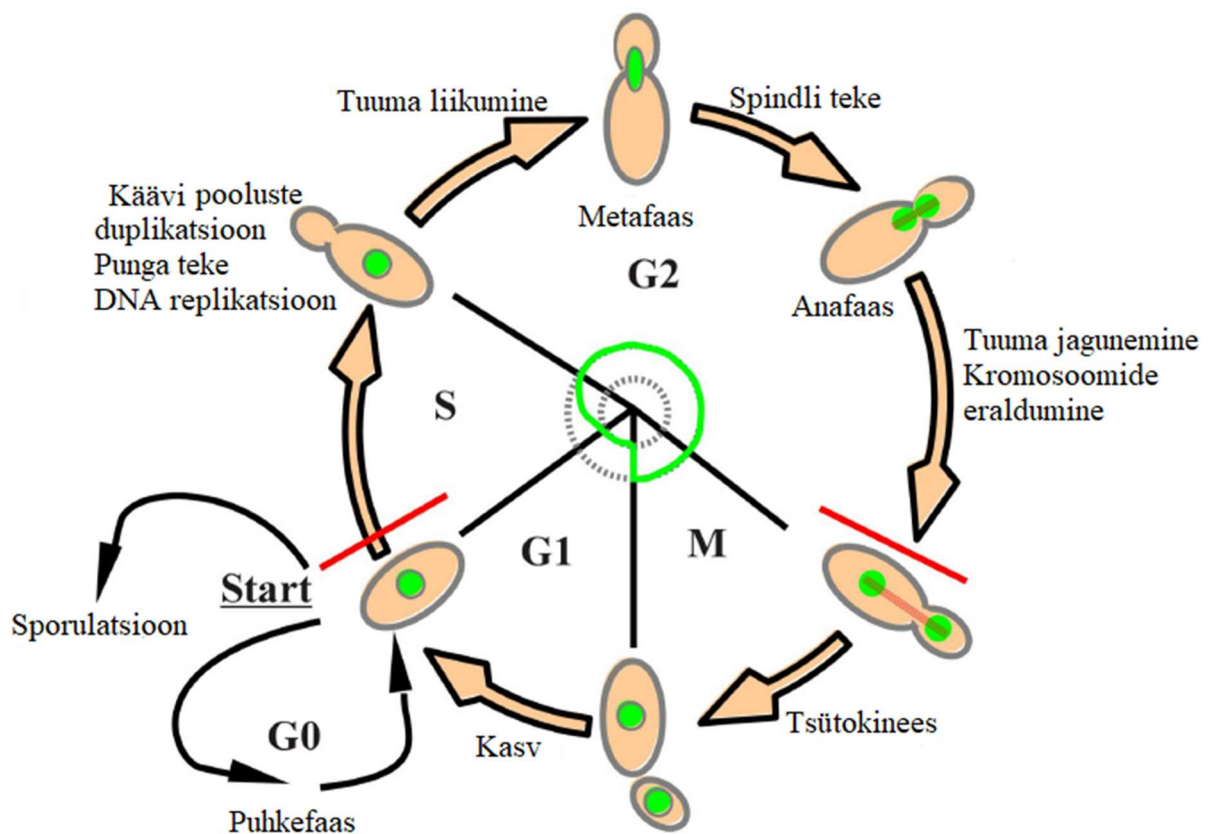
Käesolev bakalaureusetöö on valminud Tartu ülikooli tehnoloogiainstituudi molekulaarse süsteemibioloogia laboris.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Pärmi rakutsükkel ja selle regulatsioon

Rakutsükkel on jagunemisprotsess, mille jooksul rakk kahekordistab oma geneetilise informatsiooni ning lõpptulemusena jagatakse kromosoomid kahe tütaraku vahel. *Saccharomyces cerevisiae* toimub paljunemine pungumise teel või seksuaalselt. Pungumise korral läbi rakk mitoosi, mille tagajärjel tekivad 2 tütarakku. Seksuaalse paljunemise puhul ühinevad kaks haploidset rakku ning läbivad meioosi, mille tagajärjel tekivad 4 haploidset rakku. Laboritingumustes kasutatakse pungumise teel paljunevaid rakke. Rakutsükkel koosneb neljast põhifaasist: S-faasist, milles toimub DNA replikatsioon, M-faasist, milles toimub mitoos, ning nendevahelistest G1 ja G2 faasidest (joonis 1). Rakud, mis ei pooldu, on puhkefaasis ehk G0. Rakutsükklis paiknevad nad järjekorras G1-faas, S-faas ja G2-faas, mis moodustavad interfaasi, neile järgneb M-faas, mille saab jagada neljaks: profaas, metafaas, anafaas ning telofaas (Morgan, 2007). Mõnede autorite kohaselt on G2/M-faaside üleminek raskesti määratletav ning neid loetakse ka G2/M-faasiks. Selle järgi asuvad profaas ja metafaas G2-faasi pooles ning mitoosi alla loetakse juba eraldunud kromosoomidega jagunevat rakku (joonis 1) (Delobel and Tesnière, 2014). Uue faasi algamiseks peab eelmine faas olema lõppenud (Morgan, 2007).

G1-faas, mis ajaliselt asub M- ja S-faasi vahel, on ettevalmistus rakkude jagunemiseks. *S. cerevisiae* puhul on leitud START-punkt, mis asub G1 faasi lõpus. START-punktis on oluline saada keskkonnast ning raku seest informatsiooni energiaallikate, metabolismi jm kohta, mis mõjutab raku kasvu ning tingimusi (Alberghina et al., 2012). G1-S-faasi üleminek toimub positiivse tagasiside kaudu. Transkriptsiooni aktivatsioon START punktis käitub vastavalt põhimõttele „kõik või mitte midagi“ ehk kas aktiveeritakse rakutsükkel ja alustatakse sünteesifaasi või minnakse üle nõ puhkefaasi ehk G0 (Morgan, 2007).



Joonis 1. Rakutsükli faasid ning tähtsamad protsessid. Joonis kohandatud kujul (Delobel and Tesnière, 2014).

Kõige pikem faas rakutsükliks on S-faas, mis võtab pea ühe kolmandiku tervest rakutsükli ajast. S-faasis toimub DNA replikatsioon, mis hiljem M-faasis jaotatakse kahe raku vahel nii, et tekiks kaks identse DNA-ga tütarrakku. G2-faas on S- ja M-faasi vahefaas, kus toimub uute valkude süntees ning raku ruumala suurenemine. M-faasis liiguvad kromosoomid kahe pooluse suunas võrdselt, toimub tuuma jagunemine ja tsütokinees (Hartwell et al., 1974).

Rakutsükli kontrolliks on olemas kolm suuremat regulaatorpunkti, esimene neist START-punkt, mis kontrollib raku S-faasi algust – rakk hakkab poolduma, kui keskkond on selleks soodne. Teiseks G2-M-faasi üleminekuks vajalik kontrollpunkt mitoosifaasi alustamiseks - kromosoomide lahkumine ei alga enne, kui kogu DNA on replitseerunud. Kolmas metafaasist anafaasi ülemineku APC-de aktiveerimise kaudu, kus lagundatakse valke, mis hoiavad tütarchromatiide koos (Morgan, 2007).

1.2.Cdk1-tsükliin komplekside roll rakutsükli regulatsioonis

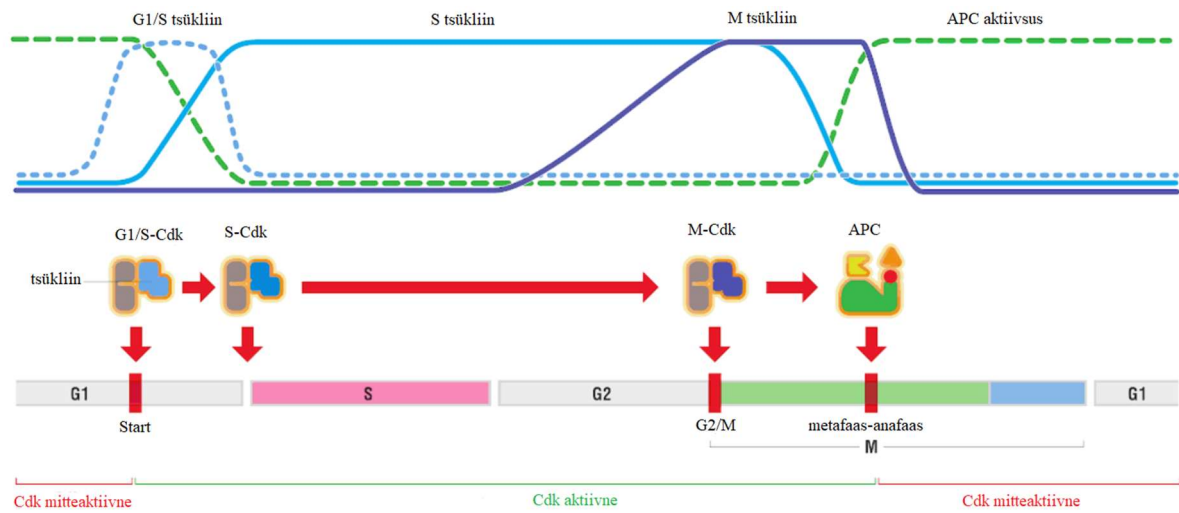
Päristuumsete organismide rakutsükkel on reguleeritud tsükliinsõltuvate kinaaside poolt. *S. cerevisiae* puhul on Cdk1 (i.k *cyclin dependent kinase*) (Cdc28) ainuke rakutsükli kontrolliv

tsükliinsõltuv kinaas. Cdk1 aktiveerimine on vajalik, et rakk uut jagunemistsükli alustaks (Alberghina et al., 2012). Selleks, et tsükliinsõltuvad kinaasid ehk Cdk-d saaksid toimida, peavad nad olema seotud tsükliinidega. Samuti on Cdk1-tsükliini kompleksis fosfoadaptorvalk Cks1. Cdk1 kontsentratsioon rakus on konstantne, aktiivsus sõltub Cdk1-tsükliin kompleksi moodustamiseks vajalike tsükliinide kontsentratsioonist (Morgan, 2007).

Cdk1 vastutab nii G1-S kui ka G2-M-faaside ülemineku eest. CDK aktiivsus on negatiivselt kontrollitud inhibeerivate valkudega, mida kutsutakse ka CKI-deks. Seni on pärmis avastatud kaks CKI-d: Far1 ja Sic1 (i.k. *Subunit Inhibitor of Cyclin-dependent protein kinase 1*). Far1 vastutab haploidsete rakkude aresti eest Start punktis vastusena paljunemisferomoonidele, inhibeerides Cdk1 aktiivsuse. Sic1 on *Saccharomyces cerevisiae*'s leiduv valk, mis on Cdk1-Clb (B-tüüpi tsükliinide) komplekside stöhhiomeetiline inhibiitor. Kuna aktiivse tsükliin-Cdk1 kompleksi moodustumine on rakutsükli S-faasi käivitaja, siis selle inhibeerimisega reguleerib Sic1 S-faasi initsiatsiooni: hoiab ära enneaegse DNA replikatsiooni G1-faasi rakkudes. Sic1 viib läbi ka mitoosist väljumist: Clb-Cdk1 aktiivsuse paralleelne inhibeerimine APC^{Cdh1} ja Sic1 poolt käivitab tsütokineesi ja mitootilise käävi lahtivõtmise ning taastab G1-faasi jaoks olulise madala aktiivsusega Cdk1 oleku, mis on vajalik replikatsiooni originide tekkeks (Kõivomägi et al., 2011; Tyers and Jorgensen, 2000; Willems et al., 1996).

Pärmirakkudes on kahte erinevat tüüpi tsükliine: Cln (N-tüüpi tsükliin) ja Clb (B-tüüpi tsükliin). Cln tsükliine on 3, vastavalt Cln1, Cln2, Cln3. Clb-tüüpi tsükliine on 6, vastavalt Clb1, Clb2, Clb3, Clb4, Clb5 ja Clb6. G1-faasis on peamine regulaator Cdk1-Cln3 kompleks. Cln3-Cdk1 tase rakus korreleerub positiivselt G1 faasis soodsate keskkonnatingimustega ning kui selle tase on rakus tõusnud piisavalt kõrgeks, põhjustab see Whi5, mis on rakutsükli initsiatsioonil transkriptsiooniks olulise SBF (i.k. *SCB Binding Factor*) kompleksi repressor, kompleksilt dissotsieerumise ning tuumast lahkumise. Selle tagajärjel alustatakse rakutsükli G1-S üleminekuks vajalike geenide, muuhulgas Cln2 ja Cln1, transkriptsiooni. Selles üleminekus on Cdk1 substraatideks rakutsükli inhibiitorid, näiteks Whi5, mis represserib rakutsükli initsiatsiooniks vajalike geenide transkriptsiooni. Whi5 viiakse Cdk1-Cln2 poolt läbiviidava fosforüleerimise tagajärjel tuumast välja. Cln1,2 reguleerivad enda ekspressiooni läbi positiivse tagasisideahela, mis viib rakutsükli sisenemiseni. S-faasis on Cdk1 kompleksis Clb5 ja Clb6-ga. G2-faasis on Cdk1-ga kompleksis valdavalt tsükliinid Clb3/4, M-faasis aga Clb1/2 (joonis

2) (Bertoli et al., 2013; Bhaduri et al., 2015).



Joonis 2. Tsükliinide hulk rakus ning komplekside moodustamine erinevate faaside ajal. Kinaasi aktiivsus erinevate faaside ajal. Joonis kohandatud kujul (Morgan, 2007).

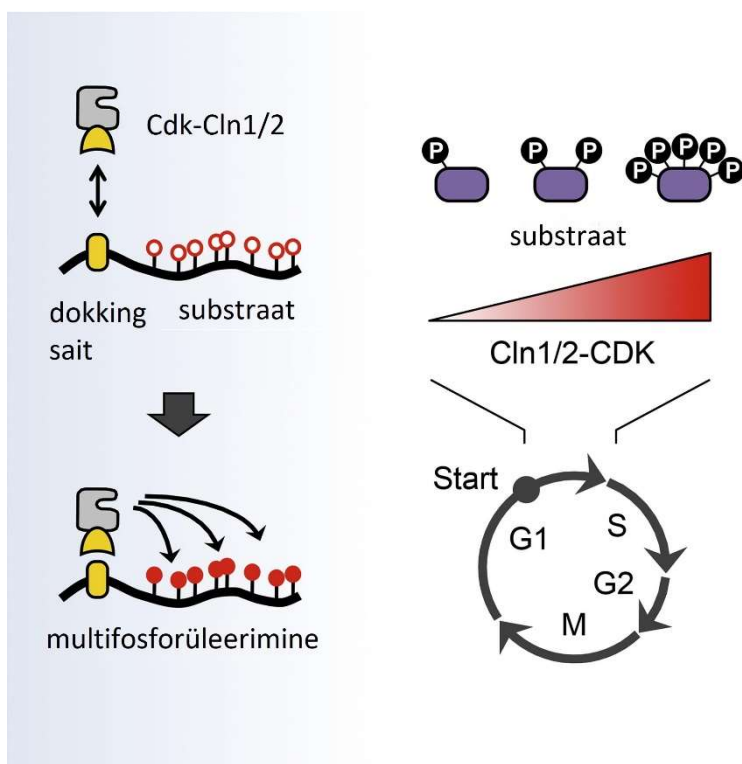
G1-S-faasis toimub suure hulga valkude akumulatsioon, sealhulgas erinevate tsükliinide näol. Nende valkudega on võimalik rakul reguleerida transkriptsiooni, põhjustades näiteks negatiivset tagasisidet signaalirajas. Cdk1-Clb ja Cdk1-Cln suhe mõjutab SBF kompleksi transkriptsiooni. Cdk1-Clb komplekside rohkus viib SBF kompleksi vabastamiseni promotori alt, peatades varajaste rakutsükli valkude transkriptsiooni. Cdk1-Cln kompleksid aitavad Sic1-l inhibeerida Cdk1-Clb komplekse, reguleerides nende omavahelist suhet (Bertoli et al., 2013). Sic1 ja Cdh1 takistavad B-tüüpi tsükliinide aktivatsiooni, reguleerides S- ja M-faasi minekut (Bhaduri et al., 2015).

1.3. Cdk1-tsükliini substraadispetsiifilisus

Enamasti on Cdk1 substraatidel mitmeid fosforüleerimissaite, millel on eri tsükliinide suhtes erinev afiinsus. Taoline substraadispetsiifilisus tagab substraatide fosforüleerimise ajalise ning ka ruumilise eraldatuse sõltuvalt rakutsükli faasidest. Cdk1 substraatidel on sageli sarnane fosforüleerimiskonsensus [Ser*/Thr*]-Pro-X-[Lys/Arg] (*tähistab fosforüleeritud aminohapet). Substraadispetsiifilisuse määravad tsükliinide pinnal asuvad Cdk1 substraatide seondumiseks vajalikud motiivid. Näiteks sisaldavad mõned substraadid, muuhulgas ka Sic1, lühikest RxL järjestust, teise nimega Cy motiivi, mis seondub Clb5 tsükliini pinnal oleva väikse hüdfoobse taskuga (Bhaduri and Pryciak, 2011; Harashima et al., 2013).

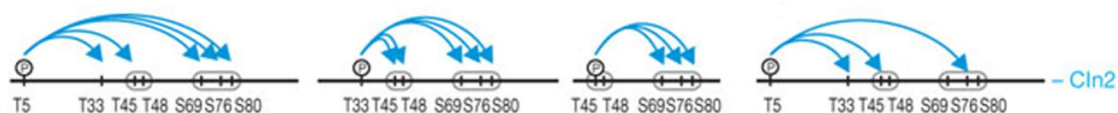
Cln1 ja Cln 2 tunnevad Cdk1 substraatidel ära kindlat LP-dokkingmotiivi, mida Cln3 ning S- ja M-faasi tsükliinid ei tunne (joonis 3). LP motiiv koosneb Leu ja Pro jääkidest ning fosforüleeritakse Cdk1-Cln1,2 poolt (Bhaduri ja Pryciak, 2011).

Rakutsükli läbimiseks fosforüleerivad aktiivsed Cdk1-tsükliini kompleksid sihtmärkvalkude Ser ja Thr jääke. Fosforüleerimise tagajärjel võib muutuda substraatvalgu konformatsioon, aktiivsus või asukoht raku (Harashima et al., 2013).



Joonis 3. Tsükliin-Cdk1 kompleksi interaktsioon seondumissaidiga, mis viib substraadi multifosforüleerimiseni. Substraadi fosforüleeritavate aminohapete hulga mõju fosforüleeritavusele. Joonis kohandatud kujul (Bhaduri et al., 2015).

Kinaaside aktiivsuse puhul on olulised ka kahe konsensusmotiivi omavahelised kaugused ning seondumissaidi ja fosforüleeritava aminohappe vahemaa. *In vivo* ja *in vitro* katsed on näidanud, et seondumissaidi ja fosfosaidi vahele peaks jääma 12-16 aminohapet ning efektiivseim on 10-12 aminohapet kahe konsensusmotiivi vahel (Kõivomägi et al., 2013).



Joonis 4. Sic1 puhul olulised fosfosaidid ning paiknemine multifosforüleerimisel. Joonis kohandatud kujul (Kõivomägi et al., 2011).

Sic1-l on üheksa Cdk1 konsensusmotiivi ([Ser/Thr]-Pro-X-[Lys/Arg]), millest viis on treoniinid ja neli seriinid (Kõivomägi et al., 2013). Sic1 lagundamiseks on vajalik vähemalt kuue saidi fosforüleerimine üheksast (joonis 4). Sic1 fosforüleerimissaidid paiknevad kolmes

rühmas T2 / T5 / S9, T33 / T45 / T48 ja S69 / S76 / S80 (Nash et al., 2001). Sic1 fosforüleerimissaidid saab jagada kolme kategooriasse: 1) paaris degroni alad, mis paiknevad üksteisest 3-7 aminohappe kaugusel; 2) N-terminaalselt asuvad praimimiskohad iga paaris degroni jaoks, ja 3) saidid, mis toimivad nii praimimis- kui ka degnikohtadena (näiteks Thr45) (Kõivomägi et al., 2011). Sic1 järjestus sisaldab 2 degronit: T45/T48 ning S69/S76/S80.

Lisaks eelnevalt kirjeldatud tsükliinspetsiifikale osaleb valkude multifosforüleerimises ka Cks1 valk, mis seob spetsiifiliselt fosforüleeritud treoniini jääke (Reynard et al., 2000), hoides osaliselt fosforüleeritud Sic1 valku Cdk1-tsükliini kompleksi küljes.

1.4. Valkude degradatsioon pärmis

Tsükliinide kontsentratsioon rakus kontrollib Cdk1 aktiivsust –seega nende sünteesi ja lagundamise läbi saab kontrollida rakutsükli faase ja nende üleminekuid. Valkude õigeaegseks lagundamiseks on oluline tunda ära ka spetsiifilised valgud. Sic1 seotakse WD40 järjestusele F-box valk-valk interaktsioonil. Ubikvitiinist sõltuv proteolüüs kontrollib otseselt regulaatorvalkude puudumist, märgistades lagundamisele minevad valgud ubikvitiiniga. Ubikvitiin on kõrgelt konserveerunud 76st aminohappest koosnev valk, mis põhjustab kiire ATP-st sõltuva proteolüüsi. Ubikvitiinsõltuva proteolüüsi ajal lagundatakse spetsiifilised valgud ubikvitiin-26S proteasoomi rajas (joonis 5).

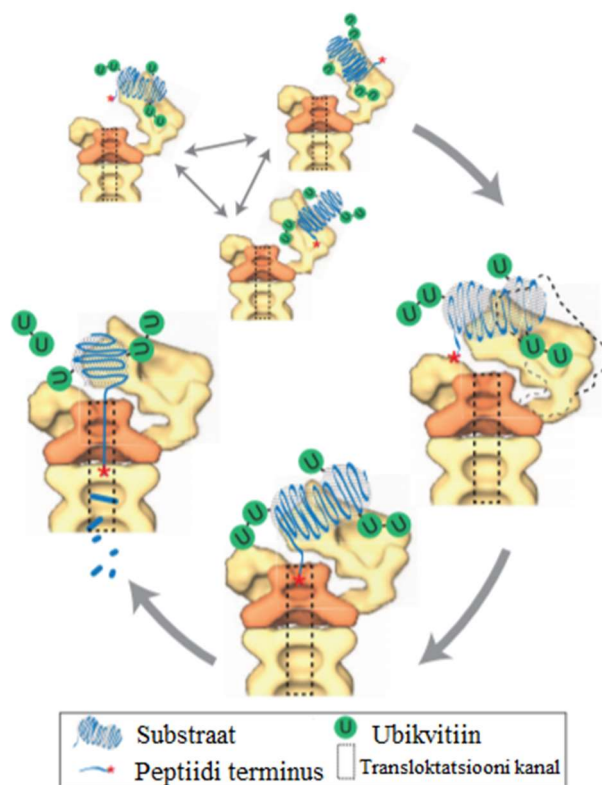
Ubikvitiinsõltuv proteolüüsirada koosneb kolmest peamisest komponendist: E1, E2, E3. E1 on ubikvitiini aktiveeriv ensüüm, mis kasutab ATP energiat tioestersideme moodustamiseks ubikvitiiniga. Ubikvitiin kantakse tioestersideme abil üle ubikvitiini konjugeerivale ensüümile – E2. E2 kannab ubikvitiini üle sihtmärkvalgu lüsiini jäägile, tihti koos E3-ga, mis on ubikvitiin-valk ligaas.

E3, mis ubikvitineerib B-tüüpi tsükliine asub APC ehk anafaasi viivas kompleksis või tsüklosoomis. APC-d reguleerib rakk fosforüleerimise kaudu ning on aktiivne anafaasist START-punktini. Mutatsioonid APC-s jätavad raku metafaasi aresti ning rakk ei saa lõpuni jaguneda.

Ubikvitiin-proteasoomi raja proteolüütiline komponent on 26S proteasoom, mis koosneb reguloorsest partiklist 19S ja katalüütilise aktiivsusega 20S-ist. Kolmikkompleks loob silindrikujulise kogumi.

26S proteasoom tunneb ära ubikvitiiniga märgistatud substraate ning lõikab need lühikesteks peptiidideks. Degradatsiooni efektiivsus sõltub substraadist, mis näidati katsetes sama pikkade seotud ubikvitiinahelatega. Samuti on väga oluline N-terminuse kõige otsapoolsem

ubikvitineeritud lüsiini jääk: mida lähemal terminuse lõpule, seda suurem on lagundamise kiirus (Lu et al., 2015).



Joonis 5. Tähtsamad üleminekud ubikvitineeritud substraatide proteasomaalsel degradatsioonil. Polübikvitineeritud substraat otsib stohhastilisel seandumisel sobivat konfiguratsiooni proteasoomiga seandumiseks. Sobiva struktuuriga ubikvitiinahelaga substraadi seandumisel proteasoomiga ning ATP hüdroolüüsil toimuvad proteasoomi subühikutel ümberkorraldused paremaks seandumiseks. Selle tulemusena liigub substraat või substraadi terminus sisenemisavasse ja liigub translokalisatsiooni kanalisse, mis viib valgu lagundamiseni. Joonis kohandatud kujul (Lu et al., 2015).

1.5. Valkude degradatsioon fosfodegronite abil

Degron on poliübikvitiinne aminohappejärjestus, mis kodeerib teistele valkudele ülekantavat valgu degradatsiooni signaali (Yu et al., 2015). Fosfodegronid on järjestusmotiivid, mis koosnevad kahest fosforüülitud saidist, mis paiknevad üksteisest 2-3 aminohappe kaugusel ja mida tunneb ära ubikvitiin-ligaas SCF-Cdc4/Grr1 (Valk et al., 2014).

Cdk1 seotuna G1- ja S-faasi tsükliinidega fosforüleerib Sic1 kindla järjestuse mitmel erineval saidil, mis viib fosfodegronete moodustumiseni, mida tunneb ära ubikvitiin-ligaasi SCF-Cdc4.

Sic1 ja teiste substraatide järjestikune fosforüleerimine (joonis 4) sõltub kolmest olulisest interaktsioonist Cdk1 komplekside ja erineva ahelaga substraadi vahel (Valk et al., 2014).

SCF(i.k *Skp1-Cullin-F-box*) on kolmest komponendist koosnev kompleks: SKp1, Cullin(pärmides Cdc53), F-box valk, mis on kokku üks E3 ubikvitiin-ligaasi eritüüp, samamoodi nagu APC. Spetsiifilisuse valkude suhtes määrab ära F-boxi kuuluv valk. Põhiliselt on SCF kompleksiga leitud seoseid Cdc4-1, Grr1-1 ning Met30-1. Cdc4 tunneb ära Cdk1 inhibiitoreid Sic1 ja Far1 ning replikatsioonvalku Cdc6; Grr1 sihtmärkideks on G1 tsükliinid Cln1,2 ning Cdc42 efektor Gic2; Met30 ubikvitineerib morfogeneesi kontrollpunkti kinaasi Swe1 ning transkriptsioonifaktor Met4 (Hsiung et al., 2001; Willems et al., 1999). On näidatud, et G1 tsükliin tunnevad ära nii Cdc4 (tuumas) kui Grr1 (tsütoplasmas). Kui viia Cdc4 tsütoplasmasse, suudab ka see lagundada Cln2 (Landry et al., 2012).

Sic1 fosforüülimise dünaamika analüüs on näidanud, et fosfoadapter Cks1 on võtmetegur, mis kontrollib multifosforüleerimise dünaamikat. Cks1 seondub Cdk1-ga ja ka fosforüülitud aladega, suurendades seeläbi C-terminaalselt paiknevate naabersaitide fosforüleerimist optimaalsetel vahemaadel Cks1-ga seotud fosforüülitud saidist (Valk et al., 2014).

1.6.Cln2 Grr1 degroni iseloomustamine

Cln2 tsükliin on G1-faasi tsükliin, mida kodeeritakse Cln2 geenilt ning mis akumulereerub G1 faasi jooksul, saavutades maksimumi G1-faasi lõpus olevaks START-kontrollpunktiks. Cln2 fosforüleerimine viib kiire degradatsioonini ning äratundmine käib Grr1 degroni kaudu (Hsiung et al., 2001). Cln2-1 on 7 Cdk1-ga seandumiseks sobivat fosfosaiti, nendes positsioonides on kas treoniinid või seriinid. Nende saitide muteerumisel või deletsioonil ei tööta degron efektiivselt (Lanker et al., 1996).

Grr1-1 on keskne roll mitmete valkude, sealhulgas Cln2- SCF-sõltuva ubikvitineerimise reguleerimisel. SCF seandumine ja Cln2 ubikvitineerimine sõltuvad Cln2 fosforüülimisest. Grr1 on negatiivne regulaator transkriptsioonil. On näidatud, et LRR ehk leutsiinirikas kordusjärjestus on oluline fosforüülitud Cln2-i ja sellele järgneva proteolüüsi sidumiseks.

Grr1 äratundmissaidiks on LRR domään. Grr1 puhul koosneb see järjestus 12-st terviklikust LRRist ning ühest osalisest LRRist, mis sisaldab ka tsüsteiini. LRR on Grr1 degroni funktsioneerimiseks ja sihtmärkvalkudega seandumiseks obligatoorne. Molekulaarsed mudelid on näidanud Grr1 LRR hobuseraua-laadse (i.k *horseshoe*) valgumotiivi pinnal kõrget positiivset laengut, mis viitab positiivselt laetud aminohappejääkide võimele siduda negatiivse laenguga fosforüleeritud G1 tsükliin. Samad aminohappejäägid pole olulised SCF-Grr1 kompleksi

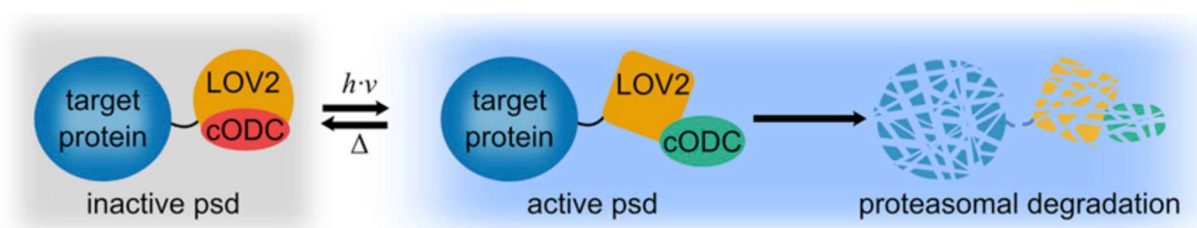
moodustamisel. Toimivateks interaktsioonideks on oluline ka Grr1 C-terminus. Deleteeritud C-terminusega Grr1 mutandid ei suuda luua püsivaid sidemeid Cln2-ga (Hsiung et al., 2001).

1.7.Sünteesilised degronid

Sünteesilised degronid võimaldavad valkude degradatsiooni ning rakulist funktsiooni kontrollida ka teistes organismides, kui algsed degronid. Võrreldes genoomi muutmisega (i.k. *editing*) ja RNA interferentsi (RNAi) meetodikaga, pakub TPD (i.k. *targeted protein degradation*) posttranslatsioonilisel tasemel lisavõimaluse fenotüübi muutmisel. Valgu kontsentratsiooni kontroll TPD-ga on kiirem kui geeni või mRNA katkestus. Lisaks sellele pakub TPD võimalust eemaldada jäänud pika elueaga valke, mida RNAi ei pruugi täielikult eemaldada. RNAi ja TPD meetodite kombineerimine võib pakkuda paremat valgu eemaldamise efektiivsust (Yu et al., 2015).

Näiteks on loodud Arabidopsise ja pagaripärmi valgustundlik degron. Arabidopsise valgustundlik LOV2 domään liideti närilise ornitiini dekarboksülaadi-sarnase degradatsiooni järjestusega cODC1. Mudelit demonstreeriti pagaripärmis.

Katse tulemusena saadi kohanenud mutandid, milles on valgustundlik tsükliinsõltuva kinaasi aktiivsuse regulatsioon ja valguse mõjutatav rakkude kasv. Esiialgu modelleeriti arvutis psd moodulit, võimaldades paremini aru saada selle olemusest. Valguse mõju taime regulatsioonis toimib võtmeregulaatorite proteolüüsis (joonis 6) ja signaali keskmeks on ubikvitiin-valk liigaas COP1, millel on negatiivne kontroll valgustundlike radade poolt (Renicke et al., 2013).

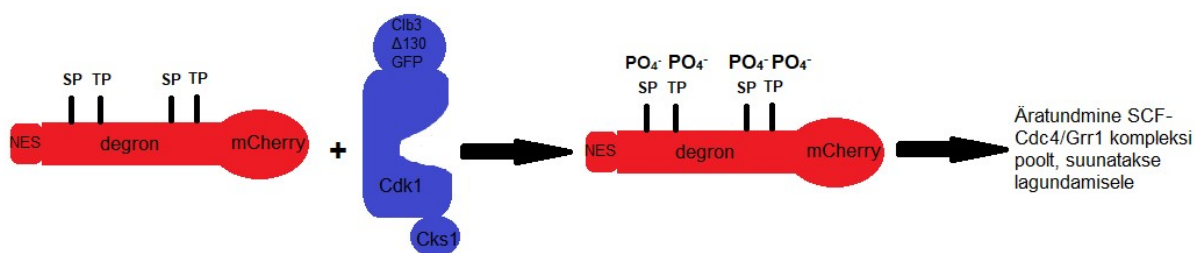


Joonis 6. LOV-degron pimedas ning valguse käes. Pimedas on valgustundlik degron (joonisel psd) inaktiivses olekus. Valguse käes mõjutab degroni aktiveermist sinine kiirgus, mis aktiveerib degroni ning viib valkude lagundamiseni. Joonis kohandatud kujul (Renicke et al., 2013).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö praktilise osa eesmärgid

Teaduskirjanduses ei ole andmeid kontrollitava toimega sünteetiliste degronite kohta. Töö eesmärgiks oli luua erineva tugevusega degroneid - disainisin, valmistasin ning testisin erinevaid Cdk1 poolt fosforüleeritavaid degroni kombinatsioone, kasutades selleks fluorestsentsmikroskoopiat ning FACS-i.



Joonis 7. Östradioliga indutseerides tõuseb NES-Clb3-GFP tase ja hakkab degroneid fosforüleerima, mille tagajärjel SCF-Cdc4/Grr1 ubikvitineerib degroni.

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Kasutatud plasmiidid, tüved, söötmed, lahused

Degronid kloonitati pRS305 Adh1 promootoriga vektorisse (täpsem skeem LISA 3 all).

Kloneerimiseks kasutati *Escherichia coli* (*E. coli*) tüve DH5 α [supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1] (Invitrogen), mille kompetentsed rakud olid valmistatud laborant Jevgeni Mihhejevi poolt.

Bakterikultuure kasvatati LB (Luria Bertani) vedel- või tardsöötmele [10 g/l trüptooni (Formedium), 10 g/l NaCl, 5 g/l pärmiekstrakti (Formedium), tardsöötme korral lisaks 2% agar (Formedium)].

Pärmi transformatsioonis kasutatud lahuste koostised:
Lahus A [5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 mM EDTA, 100 mM liitiumatsetaat], lahus B [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 40% PEG(molaarmass 3350 g/mol), 100 mM liitiumatsetaat], 1x TE lahus [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA]

Metsiktüüpi pärmitüvena kasutati *Saccharomyces cerevisiae* tüve DOM0090 [MATa (leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15) (ϕ i⁺), David O.Morgan'i labor, California Ülikool].

Degronite testimiseks tranformeeriti need tüvesse RKI0106: NES-Clb3 Δ 130-GFP ekspresseerimiseks tranformeeriti DOM0090 tüvesse 2 integreeruvat plasmidi: östradiooliga aktiveeritav LexA transkriptsioonifaktor (FRP880 PACT1(-1-520)-LexA-ER-haB112-TCYC) ning LexA promootori alt transkribeeritav NES-Clb3 Δ 130-GFP (pRKI0118).

Pärmikultuure kasvatati YPD vedelsöötmes [10 g/l pärmiekstrakti (Formedium), 20 g/l peptooni (Formedium), 20 g/l glükoosi (BioTop)]

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

2.2.2. Degronite disain

Degronite disain põhineb pagaripärmi CKI Sic1 N-terminaalsel järjestusel, millel ei ole C-terminuses olevat inhibeerivat osa ning Cln2 järjestusel. Degronite taseme jälgimiseks olid need kokku pandud mCherry fluorofooriga, mis 587 nm kiiritades fluorestseerub 609 nm maksimumiga. 23PNF mutantide puhul on Sic1 metsiktüüpi järjestuses 2. ja 3. RxL motiiv vahetatud YPR174c valgust pärit Clb3 dockingsaidiga, et muuta taoline Sic1 mutant Clb3 spetsiifiliseks.

Vajalikke mutatsioone viidi sisse kas sünteetilise DNA tellimisega (firmast Thermo Fisher Scientific) või PCR-iga.

2.2.3. Degronite nimekiri

Degronite aminohappelased järjestused toodud LISAS 2.

1. NES-Sic1wt Δ C RXL deg -nls -vllpp T173A T191A



2. NES-Sic1 Δ C N2deg 23PNF +deg -nls -vllpp T173A T191A



3. NES-Sic1 Δ C 23PNF N2deg -nls -vllpp T173A T191A



4. NES-Sic1 Δ C 23PNF N2deg 4A -nls -vllpp T173A T191A



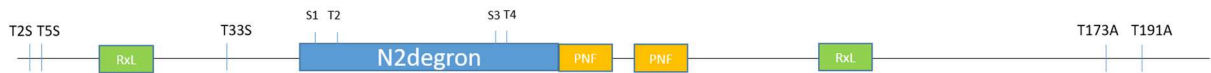
5. NES-Sic1ΔC N2deg RXL -nls -vllpp T173A T191A



6. NES-Sic1ΔC 23ANA N2deg -nls -vllpp T173A T191A



7. NES-Sic1ΔC S2S5S33 23PNF N2deg -nls -vllpp T173A T191A



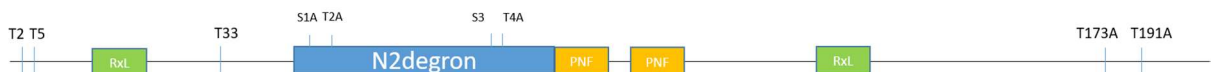
8. NES-Sic1ΔC 23PNF N2deg AAAT -nls -vllpp T173A T191A



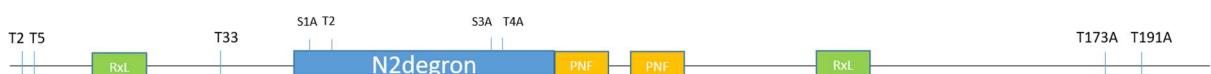
9. NES-Sic1ΔC 23PNF N2deg AASA -nls -vllpp T173A T191A



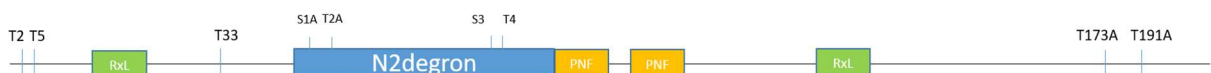
10. NES-Sic1ΔC 23PNF N2deg ATSA -nls -vllpp T173A T191A



11. NES-Sic1ΔC 23PNF N2deg ATAA -nls -vllpp T173A T191A



12. NES-Sic1ΔC 23PNF N2deg AAST -nls -vllpp T173A T191A



13. NES-Sic1ΔC 23PNF N2deg SSST -nls -vllpp T173A T191A



14. NES-Sic1ΔC 23PNF N2deg STAA –nls -vllpp T173A T191A



15. NES-Sic1ΔC 23PNF N2deg STSA –nls -vllpp T173A T191A



16. NES-Sic1ΔC 23PNF N2deg 5 Psites –nls -vllpp T173A T191A



17. NES-Sic1ΔC 23PNF 2x(N2deg)–nls -vllpp T173A T191A



2.2.4. PCR synthDNA-mCherry fragmendi tegemiseks

PCR segu koostis: 10 ng sünteetilise DNA template'i, 10 ng mCherry 3HA template'i, 0,3 μM pärisuuna praimer (kasutatud praimerite nimekiri ja järjestused LISA 1 all), 0,3 μM vastassuuna praimer, 1x HF puhver, 250 μM dNTP segu, 1 ühik Phusion DNA polümeraasi, mQ H₂O kuni 50 μl. Kasutati Aeri Esco Thermal Cycler termotsüklerit järgneva programmiga.

Tabel 1. Termotsükkleri programm sünteetilise DNA ja mCherry kokkuliitmiseks.

Temperatuur	Aeg
98°C	30 sek
50°C	30 sek
72°C	5 min
Oligonukleotiidide lisamine	
98°C	10 sek
50°C	10 sek
72°C	40 sek
72°C	5 min
15°C	∞

Tsüklit korratakse 35 korda

Saadud PCR segule lisati 10x FastDigest Green puhvrit foreesivärvina, viies lõppkontsentratsioon 1x-ni. Produktide lahutamiseks elektroforeesil kasutati etiidumbromiidiga (0,5 mg/ml) 1% agarosgeeli 1x TAE puhvris. Produktide sobivust kontrolliti UV valgusega 254 nm lainepikkusel. Õige pikkusega produktid lõigati välja ning puhastati FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit'i(Favorgen Biotech Corp.) kasutades vastavalt tootja juhistele.

2.2.5. Restriksioon

Restriksioonides on kasutatud Thermo Scientific Fast Digest restriктаase. Restriksioonisegusse võeti 40 µl geelist puhastatud PCR produkti, 0,5 µl BamHI FastDigest restriктаasi, 0,5 µl NotI FastDigest restriктаasi, 5 µl 10x FastDigest Green puhver ja mQ H₂O mahuni 50 µl. Reaktsioonisegu inkubeeriti 30 min 37 °C juures.

Restriksioonis saadud produktid lahutati ja puhastati geelelektroforeesiga eespool kirjeldatud viisil.

2.2.6. Ligatsioon

Restriksioonisegu ligeeriti eelnevalt BamHI ja NotI restriктаasidega lõigatud pRS305 pAdh1 plasmiidiga 1:1 suhtes. 20 µl mahuga ligatsioonisegu koosnes 1 µl vektorist, 2 µl plasmiidist, 2 µl 10x T4 ligaasipuhvrist, 1 µl T4 DNA ligaasist ja 14 µl mQ-st H₂O. Ligatsioonireaktsioone inkubeeriti üleöö 18°C juures.

2.2.7. Transformatsioon *E. coli* DH5α rakkudesse

Transformatsiooniks võeti reaktsiooni kohta 2 µl eelpool saadud ligatsioonisegu ning 50 µl *E. Coli* DH5α kompetentseid rakke. Segu inkubeeriti 30 minutit jääl, mille järel tehti rakkudele

kuumašokk 42°C juures 2 minutit. Seejärel inkubeeriti rakke taas 2 minutit jääl. Segule lisati 500 µl LB söödet ning inkubeeriti saadud segu 50 minutit 37°C loksutil. Inkubatsioonijärgselt tsentrifuugiti rakukultuur alla 2 minuti jooksul 6000 pööret minuti juures. Eemaldati 400 µl supernatanti, allesjäänud segu suspendeeriti ühtlustamiseks ning külvati ampitsilliini(Fisher Scientific, sisaldus 100µl/ml) selektiivsusega LB agariga Petri tassile. Tasse inkubeeriti üleöö 37°C juures.

2.2.8. Plasmiidide eraldamine *E. coli* DH5α rakkudest

Plasmiidide eraldamiseks DH5α rakkudest pandi kolooniatest võetud rakud kasvama 5 ml LB vedelsöötmesse, kuhu on lisatud 1000ng/ml kohta ampitsilliini(Fisher Scientific). Segu hoiti 12h 37°C loksutil ning plasmiidne DNA puhastati segust välja FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit abil vastavalt tootjapoolsete juhistele. Proovide kontsentratsiooni mõõdeti Thermo Scientific NanoDrop spektrofotomeetriga ning plasmiidide õigsust kontrolliti sekveneerimisel Sangeri meetodiga(Genoomika instituudi sekveneerimise tuumiklaboris).

2.2.9. PCR N- ja C-terminaalsete fragmentide amplifitseerimiseks

Sobivate degnonite valmistamiseks PCRiga tuli disainida mutatsiooni(de)ga oligonukleotiidid, millega sai üles amplifitseerida mutatsiooni(de)st N-ja C-terminaalsed PCR produktid.

PCR segu koostis: 10 ng sünteetilise DNA template'i, 0,3 µM pärisuuna praimer, 0,3 µM vastassuuna praimer, 1x HF puhver, 250 µM dNTP segu, 1 ühik Phusion DNA polümeraasi, mQ H₂O kuni 50 µl. Kasutati *Aeris Esco Thermal Cycler* termotsüklerit järgneva programmiga.

Tabel 2. Termotsükkleri programm N- ja C-terminaalsete fragmentide amplifitseerimiseks

N-terminus		C-terminus	
Temperatuur	Aeg	Temperatuur	Aeg
98°C	20 sek	98°C	20 sek
98°C	10 sek	98°C	10 sek
50°C	10 sek	57°C	10 sek
72°C	9 sek	72°C	39 sek
72°C	5 min	72°C	5min
15°C	∞	15°C	∞

Tsükliit korratakse 35 korda

PCRist saadud produktid lahutati ja puhastati geelelektroforeesil eespool toodud viisil.

2.2.10. PCR degroni kokkuliitmiseks

PCR segu koostis: 1:1 suhtes puhastatud C-terminuse ja N-terminuse PCR produkti, 1x HF puhver, 250 μ M dNTP segu, 1 μ hik Phusion DNA polümeraasi, mQ H₂O kuni 47 μ l. Peale I sünteesi etappi lisati 0,3 μ M pärisuuna praimert ja 0,3 μ M vastassuuna praimerit, Kasutati *Aeris Esco Thermal Cycler* termotsüklerit järgneva programmiga.

Tabel 3. Termotsükkleri programm degroni kokkuliitmiseks.

Temperatuur	Aeg
98°C	30 sek
50°C	30 sek
72°C	5 min
Oligonukleotiidide lisamine	
98°C	10 sek
50°C	10 sek
72°C	40 sek
72°C	5 min
15°C	∞

Tsükliit korratakse 35 korda

PCRist saadud produktid lahutati ja puhastati geelelektroforeesil eespool toodud viisil.

Etappe restriksioonist mini-prepideni viidi läbi eelpool toodud viisil.

2.2.11. Restriksioon pärmi transformeerimiseks

Pärmi transformeerimiseks oli vaja plasmiidid eelnevalt lineariseerida, et need homoloogilise rekombinatsiooniga pärmi genoomi integreeruks. Restriksioonisegusse võeti 1 μ g plasmidi, 1 μ l FastDigest AjuI restriksiooni, 1 μ l 20x SAMi (S-adenosüül-L-metioniin), 2 μ l 10x FastDigest puhvrit ja mQ H₂O kuni 20 μ l mahuni.

2.2.12. Transformatsioon pärmi

Pärmitüve kasvatati üleöö YPD vedelsöötmes kuni optiline tihedus oli OD₆₀₀ (i.k. *optical density*) = 0,6. Pämirakkude kogumiseks tsentrifuugiti segu 3500 pöoret/minutis juures 1 minut ning võeti üles 1 ml mQs H₂O. Vesilahuses rakud fuugiti uuesti alla samade parameetrite juures ning eemaldati tekkinud supernatant. Rakke pesti läbi kaks korda lahusega A (koostis toodud üleval), vahepeal segu taas alla fuugides vastavalt varasemalt kirjeldatud parameetritele, vahepeal supernatanti eraldades. Saadud rakusademele lisati kahekordses sademe mahus lahust A ning inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Paralleelselt kuumutati 100°C juures *Salmon Sperm* DNAd(SSIDNA, Sigma), peale mida jahutati maha jää. Transformatsiooniks segati kokku 10 μ l restriksioonisegu (eelmises alapunktis), 10 μ l SSIDNAd ja 100 μ l kompetentseid

pärmirakke. Lisati ka 700 µl lahust B ning 48 µl DMSO (dimetüülsulfoksiid) lahust. Saadud transformatsioonisegu viidi 42°C termoblokki 40 minutiks. Peale inkubatsiooni hoiti segu kaheks minutiks jääl ning tsentrifugeeriti 6000 pööret/minutis 30 sekundit. Tsentrifugeerimise järgselt eemaldati supernatant ning rakke suspendeeriti 1 ml 1x TE lahuses. Segu tsentrifugeeriti 3500 pööret/minutis 1 minuti vältel. Supernatant eemaldati ning rakke suspendeeriti 200 µl 1x TE lahuses ning külvati 2% glükoosiga CSM (i.k *complete supplement mixture*) -Ura -His -Leu tardsöötmega plaadile klaaskuulide abil. Plaate inkubeeriti 30°C juures kolooniate tekkimiseni 2-3 päeva.

2.2.13. Mikroskoopia

Katses kasutati *Zeiss Axio Observer Z1* mikroskoopi vastavalt tootjapoolsetele juhistele. eGFP (i.k *green fluorescent protein*) ja faaskontrasti kanalis mõõdeti rakke 15 ms jooksul, mCherry kanalis 750 ms jooksul. Iga kolme minuti tagant tehti pilt.

Katses kasutatud rakud kasvasid 12h 5 ml 2% glükoosiga CSM söötmes 30°C juures loksutil (160 RPM), kuni $OD_{600}=0,3$. Kultuure sonikeeriti 8 sek 10% võimsuse juures *Bandelin Sonoplus HD 2070* ultraheigeneraatoriga. Ühele osale kultuurist tõsteti 2 µl katseklaasile, asetades peale eelnevalt valmistatud 2% agarosgeel. Teisele osale kultuuridest (st pooled kultuurid) asetati peale 10 nM östradiooliga (Sigma) 2% agarosgeel. Proovid suleti õhukindlatesse kambritesse.

Eksperimendi jooksul salvestatud pilte analüüsiti programmiga MatLab (MathWorks) ja sellisele analüüsile spetsiaalse alamprogrammi (Doncic and Skotheim, 2013) abil

2.2.14. FACS

Katses kasutati *Attune NxT Flow Cytometer Invitrogen Thermo Fisher Scientific* FACS (i.k *fluorescence activated cell sorter*) lugejat, plaadilugemisrežiimil (96 kambriga plaat), vastavalt tootjapoolsetele juhistele. Kultuure mõõdeti kuni 100 000 rakuni 50 µl mahus, lugedes kiiruse 25 µl/min. Kasutati lasereid eGFP B11 530/30 nm ja mCherry kollane (yellow) 620/15 nm. Ala suuruse taust (area scaling background)=1,29.

Rakkude ettevalmistus:

Rakud kasvasid 12 h 3 ml mahus 2% glükoosiga CSM söötmes 30°C juures loksutil (160 RPM), kuni $OD_{600}=0,5$. Igast kultuurist viidi kultuur kahte katsutisse samas mahus (1 ml). Üht osa (st pooled kultuurid) indutseeriti 100 nM östradiooli lahusega. Mõõtmist alustati 2 h peale indutsiooni.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Fosfodegronite disainimine

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli luua erineva tugevusega fosfodegroneid, mis aktiveeruvad fosforüleerimise tagajärjel. Kasutatavaks degroniks valiti SCF ligaasi adaptorvalgu Grr1 poolt äratuntav järjestus, mis pärines tsükliinidest Cln2 või Cln3 (edaspidi: Grr1 degron), mille puhul polnud teada, millised fosfosaidid fosforüleerimisel olulised on. Fosfodegroni disainimisel lähtuti peamiselt uurimisgrupi eelmistest eksperimentidest ja saadud tulemustest, lisaks kasutati infot teadusartiklitest Grr1 degroni kohta. Degroni disainil lähtuti *S. cerevisiae* Cdk1 inhibiitor Sic1-st, mis on rakus S-faasi käivitaja. Sic1 puhul on varasemalt meie uurimisgrupis kirjeldatud Cdk1 poolt fosforüleeritavat fosfodegroni järjestust.

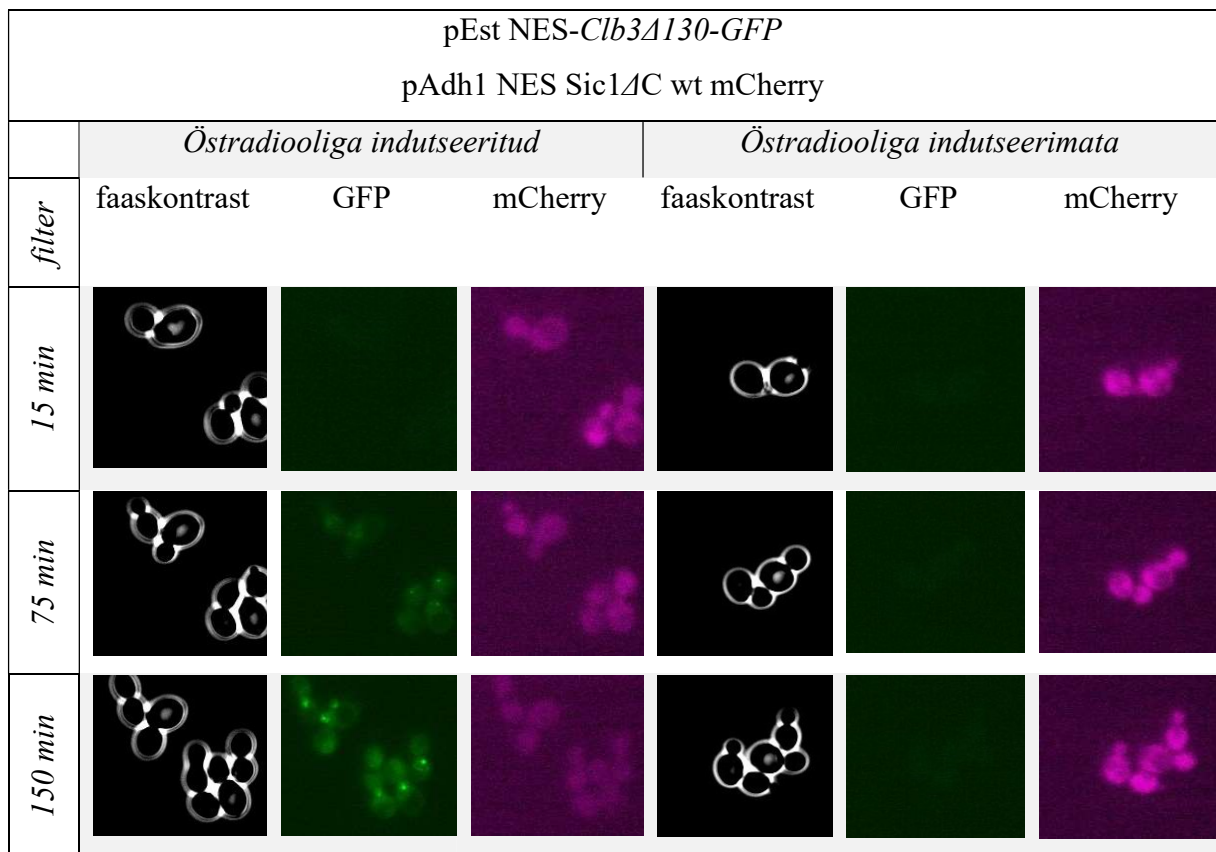
Degroni valmistamiseks disainiti ning telliti sünteetiline järjestus, mille C-terminusse lisati eGFP järjestus ning N-terminusse NES (i.k. *nuclear export signal*) järjestus. Konstruktid loodi Grr1 degroni näitel, millega märgistamine toimub tsütoplasmaatilisel, seega lisati degronitele, mida üldjuhul SCF kompleksi poolt tuumas lagundatakse, tuumaekspordisignaali. Degronile lagunemise jälgimiseks liideti sellele C-terminaalselt mCherry järjestus.

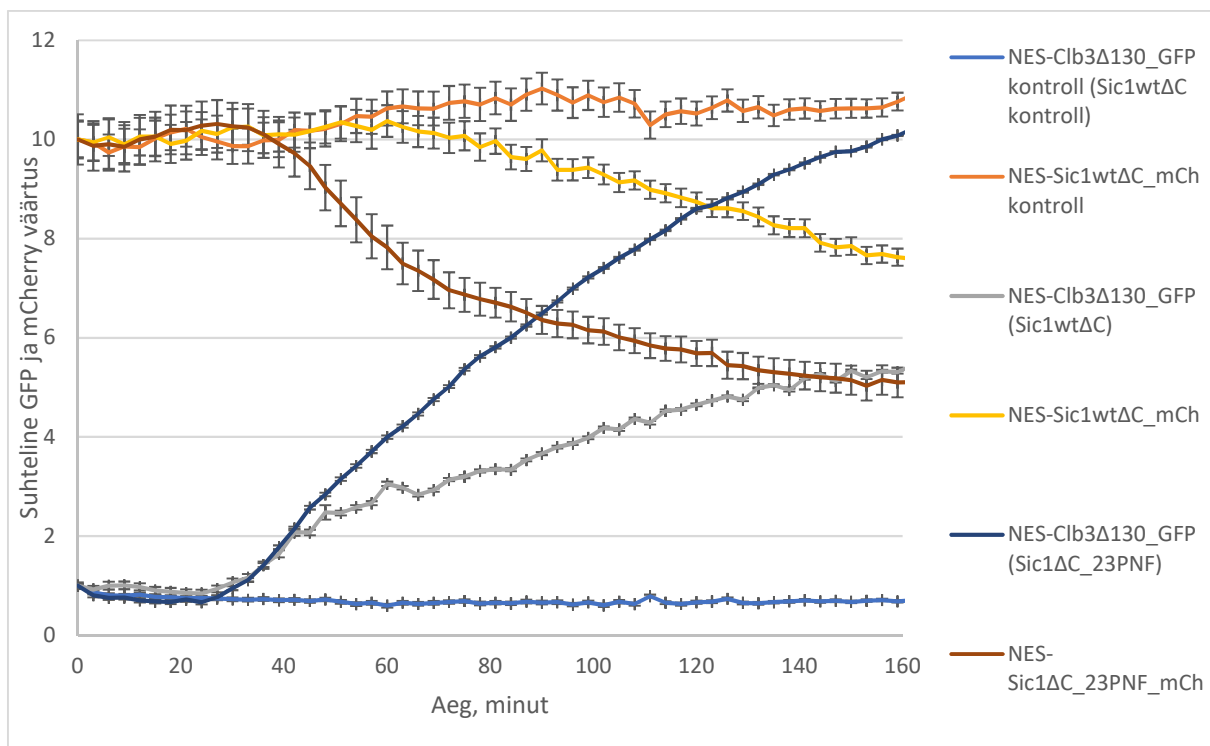
2.3.2. Fosfodegronite analüüs *in vivo*: mikroskoopia

Fosfodegronite efektiivsuse võrdlemiseks viidi Adh1 promootoriga degron-mCherry konstruktid pärimisviisiga RKI0106, mis sisaldas östradiooliga indutseeritavat NES-Clb3 Δ 130-GFP.

NES-Clb3 Δ 130-GFP indutseerimise mõju erinevate degroni versioonidega mCherry lagunemisele jälgiti fluorestsentsmikroskoopiaga (Joonis 8A,B). Kui võrrelda NES-Sic1wt Δ C degroni efektiivsust NES-Sic1 Δ C N2deg 23PNF-iga, on näha, et viimast degradeeritakse kiiremini ning suuremas ulatuses. Kui wt degroni tase on peale 2 tundi Clb3 ekspressiooni langenud umbes 25%, siis Cln2 degroni ja Clb3 dockingsaitidega Sic1 Δ C tase on sama ajaga langenud 2 korda enam 50%-ni. Taolist efekti saab seletada sellega, et Sic1wt sisaldab fosfodegroneid, mis on Cdc4 spetsiifilised. Cdc4 ise lokaliseerub rakutuumas, seega on selle kaudu SCF vahendatud valgulagundamine raskendatud. Mõningast tsütoplasmaatilist Sic1wt põhineva degroni lagunemist võib seletada sellega, et NES-Sic1 Δ C –mCherry valgumolekulmass on umbes 55 kDa, samas tuumapoore läbivad passiivselt kuni 60 kDa suurusega valgud (Weis, 2003). Seega võib fosforüleeritud mCherry koos degroniga tuuma difundeeruda, kus ta lagundatakse Cdc4 abil. Teine seletus võib seisneda selles, et Cdc4 ja Grr1 omavad teataval määral funktsionaalset kattuvust, ehk nad suudavad ära tunda üksteise substraatide degroneid.

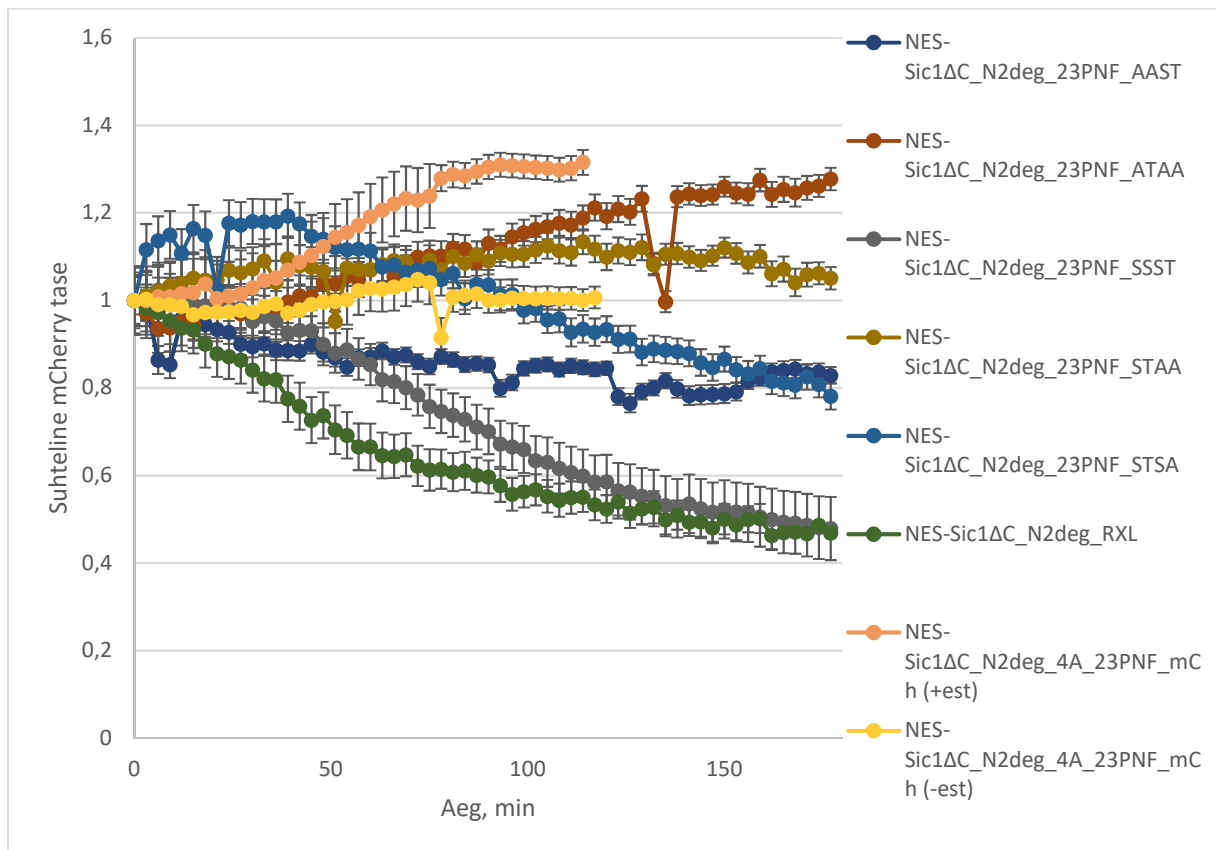
A



B

Joonis 8. A. Mikroskoobiga tehtud pildid NES-Sic1_wt degroniga rakkudest erinevate filtritega erinevates ajapunktides. Mikroskoobiga tehtud piltidelt sai jälgida eGFP ja mCherry muutust erinevatel ajahetkedel, millest kolm ajapunkti on lisatud näitlikustamiseks (15 min, 75 min ja 150 min). Samuti jälgiti faaskontrastiga rakkude suuruse muutust ning asukohta. NES-Clb3Δ130-GFP indutseerimine põhjustab mCherry küljes olevate degronite fosforüleerimist ning degradatsiooni. **B. GFP ja mCherry tasemete suhteline väärtus ja selle muutus ajas.** Kontrollides on toodud estradiooliga indutseerimata mutandid. Andmed on keskmistatud, lisatud standardvead. Degronite skeemid toodud peatükis 2.2.3 ja aminohappejärjestused LISA 2 all.

Kuna selgus, et tsütoplasmas funktsioneerib Grr1 siduv Cln2 fosfodegron tunduvalt paremini võrreldes Sic1 Cdc4 poolt siduva degroniga, otsustati täpsemalt välja selgitada Cln2 degronis olevate Cdk1 fosfosaitide funktsioon. Esialgne fosfosaitide mutantide analüüs näitas, et tugevam mõju Sic1 lagundamisele on neljast muteeritud fosfosaidist kahel viimasel – S3 ja T4, sealjuures esimesed kaks – S1 ja T2 degradatsioonis suurt rolli ei oma (joonis 9).



Joonis 9. Suhteline mCherry ja GFP tase fosfodegrom mutantide kohta sõltuvalt ajast. Andmed on keskmistatud, lisatud standardvead. Degronite skeemid toodud peatükis 2.2.3 ja aminohappejärjestused LISA 2 all.

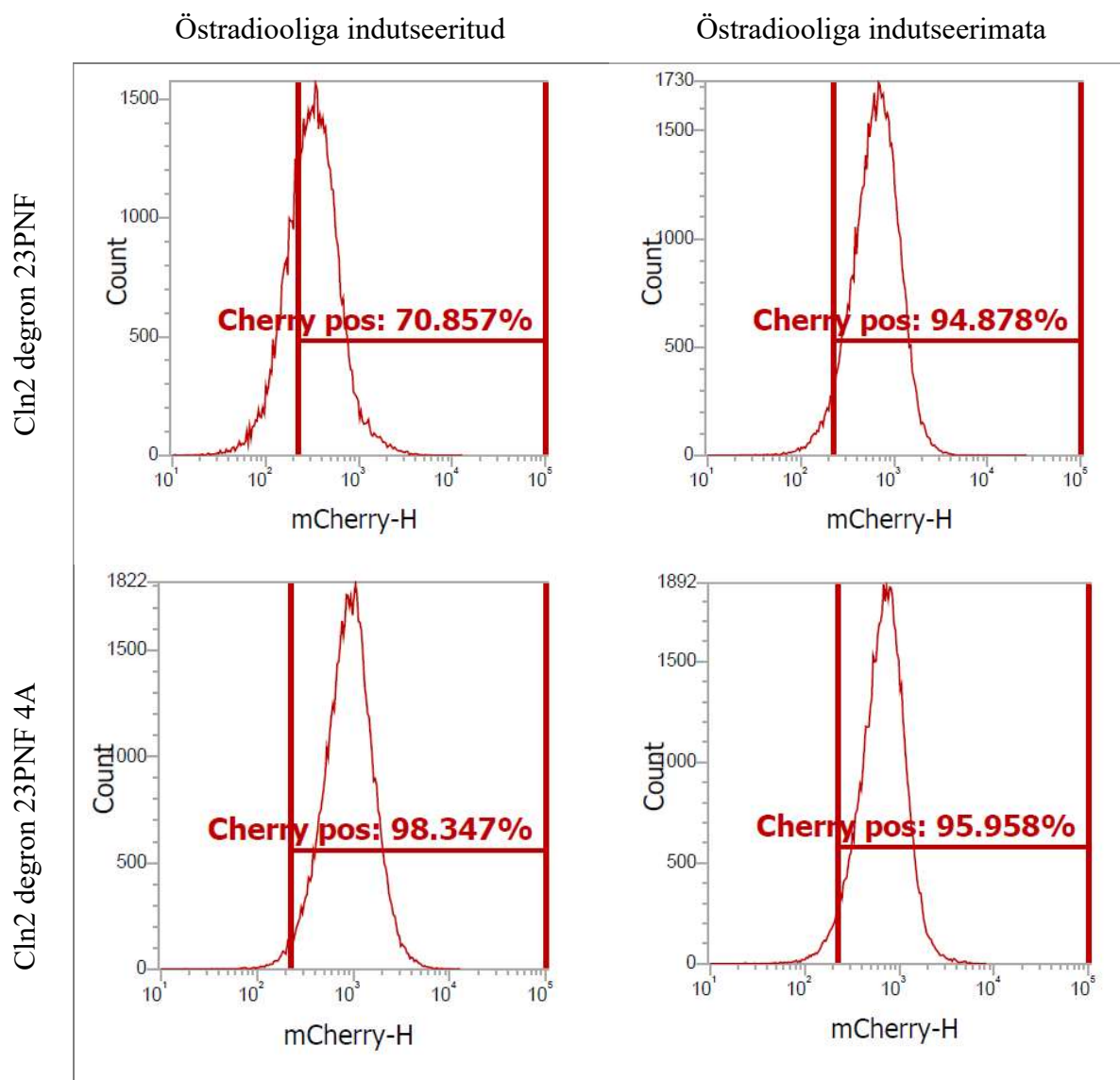
2.3.3. Fosfodegromite analüüs in vivo: FACS

FACS katsete abil uuriti mCherry fluorestseeruvust erinevate degromite puhul. Mutantide puhul näitab mCherry fluorestsents degromite hulka rakus. Kui mCherry fluorestsents NES-Clb3Δ130-GFP ekspressiooni tõttu väheneb, viitab see fosforüleerimise tagajärjel degromite lagunemisele, mCherry püsiv tase või selle tõus aga Sic1 stabiilsusele.

FACSiiga mõõdeti rea fosforüleeritavate degromite lagunemist. Katse viidi läbi järgmiselt: logaritmilises kasvufaasis olevad rakud jagati kaheks, mille üht osa indutseeriti 100 nM östradioliga 2 h. Seejärel mõõdeti proovide GFP ja mCherry taset ning võrreldi saadud väärtusi indutseeritud ja indutseerimata rakkudes.

Katse näitlikustamiseks on joonisel 10 võrreldud kahte Clb3 spetsiifilist (23PNF) Cln2 degromit: Sic1 N2deg 23PNF ning selle mutanti, mille 4 fosforüleeritavat treoniini ja seriini aminohappejääki on muteeritudalaniinideks (Sic1 N2deg 4A 23PNF). Kui võrrelda mõlema degromi mCherry keskmist väärtust NES-Clb3Δ130-GFP indutseeritud ja indutseerimata rakkudes, on näha, et Sic1 N2deg 23PNF degromi puhul väheneb mCherry keskmine väärtus (503 indutseeritud vs 783 indutseerimata rakud, Tabel 4). Degromialaniinimutandi puhul (Sic1

N2deg 4A 23PNF) taolist mCherry taseme langust näha ei ole. Saadud tulemused lähevad hästi kokku mikroskoopiaga saadud tulemustega, mille tõttu saab öelda, et FACSiga saab mõõta degronite lagunemist.



Joonis 10. mCherry positiivsete rakkude osakaal. Alustades ülevalt vasakult, östradiooliga indutseeritud Cln2 degron 23 PNF, kõrval östradioolita kontroll. All vasakul Cln2 degron 4A 23 PNF, indutseeritud östradiooliga, kõrval östradioolita kontroll. Degronite skeemid toodud peatükis 2.2.3 ja aminohappejärjestused LISA 2 all.

Tabel 4. FACS-i mõõtmistulemused joonisel 10 toodud mutantide kohta. R1 populatsioon sisaldab sarnase suuruse ja kujuga rakke. GFP ja mCherry positiivsete filter eraldab üle kindla fluorestsentsitaseme omavad rakud, mis on läbinud R1 filtri. Täpsemad joonised filtrite kohta toodud LISAS 4.

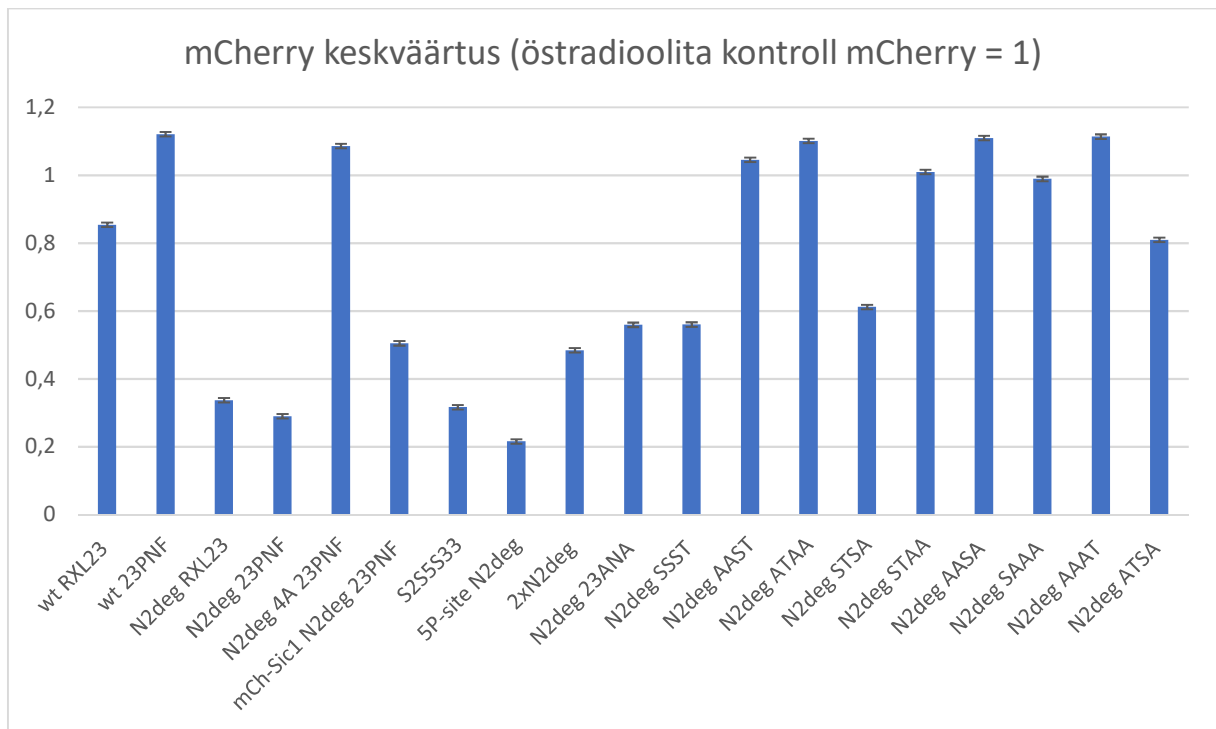
Degron	Filter	Rakkude arv	Protsentuaalselt kõigist rakkudest (%)	Protsentuaalselt filtrist (%)	X kesk-väärtus	X mediaan
<i>Cln2 deg</i> <i>23PNF +</i> <i>öst</i>	R1	62,98	62.98	62.98	97,45	91,01
	GFP positiivne	59,54	59.54	94.53	2,01	1,82
	mCherry positiivne	44,63	44.63	70.86	503	408
<i>Cln2 deg</i> <i>23PNF -</i> <i>öst</i>	R1	63,73	63.73	63.73	92,79	88,11
	GFP positiivne	3,11	3.11	4.88	1,31	1,20
	mCherry positiivne	60,47	60.47	94.88	783	690
<i>Cln2 deg</i> <i>4A</i> <i>23PNF +</i> <i>öst</i>	R1	66,29	66.29	66.29	99,66	93,73
	GFP positiivne	62,14	62.14	93.75	1,96	1,78
	mCherry positiivne	65,19	65.19	98.35	1,09	939
<i>Cln2 deg</i> <i>4A</i> <i>23PNF -</i> <i>öst</i>	R1	64,77	64.77	64.77	93,87	89,50
	GFP positiivne	2,55	2.55	3.93	1,30	1,20
	mCherry positiivne	62,16	62.16	95.96	804	718

Degronimutantide lagunemiseefektiivsust hindamiseks võrreldi mCherry positiivsete rakkude mCherry taseme keskvaartust. Mõõdetud väärtustest lahutati maha taustafluorestsents.

FACS-i analüüs kinnitas kahe viimase fosfosaidi olulisust *Cln2* degronis (joonis 11 – SSST kuni ATSA mutandid, degron 8-15).

Väga tugevat mõju näitasid östradiooliga indutseerimisel Cln2 degroniga RXL23 (ligi 64%), 23PNF (71%), S2S5S33 (68%) ja viie fosforüleeritava aminohappega (5P-site N2deg) mutandid (78%). Tugeva mõjuga mutandid olid mCherry-Sic1 Cln2 degron 23PNF (50%), kahekordse Cln2-ga degron (52%), Cln2 degron 23 analoog (44%), SSST fosfosaitidega Cln2 degron (44%) ja STSA degron (39%). Teiste mutantide puhul jäi mõju alla 20%. Vaadates erinevate saitide mutante, võib öelda, et ka FACS analüüs näitas just kahe viimase positsiooni tähtsust Sic1 lagundamisele (joonis 11).

Sic1 metsiktüüpi tüves RXL (degron 1) ja 23PNF (degron 2) mutatsioonid üksinda suurt muutust Sic1 lagundamisele ei andnud, kuna seal oli tegemist Cdc4 degroniga, mis on tuumaspetsiifiline, ent substraadid asusid tsütoplasmas. Cln2 degron (Grr1 degron) koos tsükliinide dockingsaitide RXL (degron 5) ja 23PNF (degron 3) järjestustega andsid pea kõige tugevamat mõju, samuti viie fosfosaidiga degroni kasutamine (üks treoniin lisaks positsioonis 381, degron 16). Üllatav oli tulemus, kus kolme fosfopraimingsaidi T2/T5/T33 seriiniks (degron 7) muutmine ei muutnud degroni efektiivsust madalamaks. Kuna Cdk1-ga kompleksis olev Cks1 ei seo fosfoseriini, oleks oodanud, et praimingsaitide muteerimine seriinideks muudab degroni fosforüleerimise distributiivseks ning seetõttu ka vähemefektiivseks. Kahekordse Cln2 degroniga (degron 17) ei olnud mõju ühega võrreldes suurem, vaid isegi mõnevõrra madalam. Cln2 degroni analoogi (degron 6) puhul, milles olid kaks RXL motiivi välja vahetatud Clb3 spetsiifiliste 23PNF motiivide vastu, töötas samuti edukalt, olles üle 40% mõjusam östradioolita kontrollist. Nagu võis eeldada, siis Cln2 degron 4A 23PNF (degron 4), millel olid neli fosfosaiti muudetudalaniinideks, ei degradeeru Clb3 indutseerimisel (joonis 11).



Joonis 11. mCherry tugevus sõltuvalt degronist. Iga mutandi võrdlus toodud östradiooliga indutseerimata sama mutandiga. Andmed on keskmistatud, lisatud on standardvead. Degronite skeemid toodud peatükis 2.2.3 ja aminohappejärjestused LISA 2 all. Östradiooliga võrdluseta joonis toodud LISAS 5.

KOKKUVÕTE

Valkude fosforüleerimise abil on rakus võimalik kontrollida erinevaid elutegevusega seotud protsesse. Valkude ära tundmiseks ja lagundamiseks on rakus erinevaid spetsiifilisemaid ja vähemetsiifilisi viise. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli luua erineva tugevusega fosfodegroneid, uurimaks erinevate fosfosaitide olemasolu ja aminohappe järjestuste mõju fosforüleerimisele.

Loodud fosfodegronid disainiti Sic1 valgu baasil ning uuriti fosfosaitide mõju selle lagundamisele, kasutades fluorestsentsmarkereid eGFP ja mCherry. Konstruktid loodi Grr1 degroni näitel, millega märgistamine toimub tsütoplasmaatilisel, seega lisati degronitele tuumaekspordisignaal. Indutseeritava NES-Clb3 Δ 130-ga *S. cerevisiae* tüvesse viidud konstrukte uuriti mikroskoopia ning FACSi abil.

Sic1 C-terminaalses osas olev mCherry marker näitas *in vivo* analüüsidest Sic1 lagundamist. Sic1 valgu lagundamisel langes ka mCherry tase ning sellega sai võrrelda fosforüleerimise mõju erinevates degronivariantides. Võrreldes mittefosforüleeritavate aminohapetega degronitega oli fosforüleeritavate aminohapetega degronite lagundamine tunduvalt efektiivsem. Samuti näitasid analüüsid, et neljast Cln2 degronis asuvast fosfosaidist on tähtsamad kaks viimast aminohapet ehk seriin 3 (S396) ja treoniin 4 (T405) võrrelduna mittefosforüleeritavaalaniiniga nendes positsioonides.

SUMMARY

Phosphorylation of proteins can be used as a tool to control different processes in the cell. There are various ways for protein recognition and degradation, which can be more or less specific. The aim of this bachelor thesis was to create phosphodegrons with varying degrees of strenght in order to evaluate the effect that the presence of different phosphosite and amino acid sequences have on phosphorylation.

The created phosphodegrons were designed on the basis of Sic1 protein and the effect on degradation by phosphosites was analyzed using fluorescence markers eGFP and mCherry. Nuclear exit signal was added, as the example used for the constructs was Grr1 which tags its substrates in the cytoplasm. The constructs were cloned into inducible NES-Cln3 Δ 130 *S. cerevisiae*'s strain and studied using microscopy and FACS analysis.

The mCherry marker in the C-terminus of Sic1 demonstrated degradation of Sic1 in *in vivo* analysis. The degradation of Sic1 protein also lowered the level of mCherry and was used to compare phosphorylation activity. Compared to degrons with non-phosphorylated amino acids, the degradation of phosphorylated amino acids was considerably more effective. In addition, analyses showed that the two last amino acids, serine 3 (S396) and threonine (T405), were the most important of the four phosphorylate sites in Cln2, compared to non-phosphorylated alanine in these positions.

KASUTATUD ALLIKAD

Alberghina, L., Mavelli, G., Drovandi, G., Palumbo, P., Pessina, S., Tripodi, F., Coccetti, P., and Vanoni, M. (2012). Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: Basic regulatory design and protein–protein interaction network. *Biotechnol. Adv.* *30*, 52–72.

Bertoli, C., Skotheim, J.M., and de Bruin, R.A.M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 518–528.

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

Bhaduri, S., Valk, E., Winters, M.J., Gruessner, B., Loog, M., and Pryciak, P.M. (2015). A Docking Interface in the Cyclin Cln2 Promotes Multi-site Phosphorylation of Substrates and Timely Cell-Cycle Entry. *Curr. Biol.* *25*, 316–325.

Delobel, P., and Tesnière, C. (2014). A Simple FCM Method to Avoid Misinterpretation in *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle Assessment between G0 and Sub-G1. *PloS One* *9*, e84645.

Doncic, A., and Skotheim, J. (2013). Feedforward Regulation Ensures Stability and Rapid Reversibility of a Cellular State. *Mol. Cell* *50*.

Harashima, H., Dissmeyer, N., and Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* *23*, 345–356.

Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R., and Reid, B.J. (1974). Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: A model to account for the order of cell cycle events is deduced from the phenotypes of yeast mutants. *Science* *183*, 46–51.

Hsiung, Y.G., Chang, H.-C., Pellequer, J.-L., La Valle, R., Lanker, S., and Wittenberg, C. (2001). F-Box Protein Grr1 Interacts with Phosphorylated Targets via the Cationic Surface of Its Leucine-Rich Repeat. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 2506–2520.

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

- Kõivomägi, M., Örd, M., Iofik, A., Valk, E., Venta, R., Faustova, I., Kivi, R., Balog, E.R.M., Rubin, S.M., and Loog, M. (2013). Multisite phosphorylation networks as signal processors for Cdk1. *Nat. Struct. Amp Mol. Biol.* *20*, 1415.
- Landry, B.D., Doyle, J.P., Toczyski, D.P., and Benanti, J.A. (2012). F-box protein specificity for g1 cyclins is dictated by subcellular localization. *PLoS Genet.* *8*, e1002851.
- Lanker, S., Valdivieso, M.H., and Wittenberg, C. (1996). Rapid Degradation of the G1 Cyclin Cln2 Induced by CDK-Dependent Phosphorylation. *Science* *271*, 1597–1601.
- Lu, Y., Lee, B., King, R.W., Finley, D., and Kirschner, M.W. (2015). Substrate degradation by the proteasome: A single-molecule kinetic analysis. *Science* *348*, 1250834.
- Morgan, D. (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control* (New Science Press).
- Nash, P., Tang, X., Orlicky, S., Chen, Q., B. Gertler, F., D. Mendenhall, M., Sicheri, F., Pawson, T., and Tyers, M. (2001). Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* *414*, 514–521.
- Renicke, C., Schuster, D., Usherenko, S., Essen, L.-O., and Taxis, C. (2013). A LOV2 Domain-Based Optogenetic Tool to Control Protein Degradation and Cellular Function. *Chem. Biol.* *20*, 619–626.
- Reynard, G.J., Reynolds, W., Verma, R., and Deshaies, R.J. (2000). Cks1 Is Required for G1 Cyclin–Cyclin-Dependent Kinase Activity in Budding Yeast. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 5858–5864.
- Tyers, M., and Jorgensen, P. (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *10*, 54–64.
- Valk, E., Venta, R., Örd, M., Faustova, I., Kõivomägi, M., Loog, M., Kellogg, D., and Lippincott-Schwartz, J. (2014). Multistep phosphorylation systems: tunable components of biological signaling circuits. *Mol. Biol. Cell* *25*, 3456–3460.
- Weis, K. (2003). Regulating Access to the Genome: Nucleocytoplasmic Transport throughout the Cell Cycle. *Cell* *112*, 441–451.
- Willems, A.R., Lanker, S., Patton, E.E., Craig, K.L., Nason, T.F., Mathias, N., Kobayashi, R., Wittenberg, C., and Tyers, M. (1996). Cdc53 Targets Phosphorylated G1 Cyclins for Degradation by the Ubiquitin Proteolytic Pathway. *Cell* *86*, 453–463.

Willems, A.R., Goh, T., Taylor, L., Chernushevich, I., Shevchenko, A., and Tyers, M. (1999). SCF ubiquitin protein ligases and phosphorylation-dependent proteolysis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *354*, 1533–1550.

Yu, G., Rosenberg, J.N., Betenbaugh, M.J., and Oyler, G.A. (2015). Pac-Man for biotechnology: co-opting degrons for targeted protein degradation to control and alter cell function. *Curr. Opin. Biotechnol.* *36*, 199–204.

LISAD

LISA 1: Töös kasutatud praimerid

N2deg_S1A_F	CCTGTCTCCATTCTGCTCCCGCTTCCTCATCT
N2deg_S1A_R	AGATGAGGAAGCGGGAGCAGGAATGGAGACAGG
N2deg_A3S_F	AATATGGAACAATCATCACCAATCGCTCCAAGT
N2deg_A3S_R	ACTTGGAGCGATTGGTGATGATTGTTCCATATT
N2deg_A4T_F	CAATCAGCTCCAATCACTCCAAGTATGTACCAA
N2deg_A4T_R	TTGGTACATACTTGGAGTGATTGGAGCTGATTG
N2deg_A1S_F	CCTGTCTCCATTCTTCGCCCCTTCCTCATCT
N2deg_A1S_R	AGATGAGGAAGCGGGCGAAGGAATGGAGACAGG
N2deg_T1S_F	CTTCCTCATCTCAAAGCCACTCTCCAATGAGAAACATGAGC TC
N2deg_T1S_R	GAGCTCATGTTTCTCATTGGAGAGTGGCTTTGAGATGAGGA AG
N2deg_T1_F	TTCCTCATCTCAAAGCCACACTCCAATGAGAAACATGAGCT C
N2deg_T1_R	GAGCTCATGTTTCTCATTGGAGTGTGGCTTTGAGATGAGGA A
N2deg_3S4T_F	TGGAACAATCATCACCAATCACTCCAAGTATGTACCAATTT GGTC
N2deg_3S4T_R	TACATACTTGGAGTGATTGGTGATGATTGTTCCATATTCCG G
N2deg_3A4A_F	TGGAACAATCAGCTCCAATCGCTCCAAGTATGTACCAATTT GGTC
N2deg_3A4A_R	TACATACTTGGAGCGATTGGAGCTGATTGTTCCATATTCCG G
N2deg_T4A_F	CAATCATCACCAATCGCTCCAAGTATGTACCAA
N2deg_T4A_R	TTGGTACATACTTGGAGCGATTGGTGATGATTG
N2deg_S1A_F	CCTGTCTCCATTCTGCTCCCGCTTCCTCATCT
N2deg_S1A_R	AGATGAGGAAGCGGGAGCAGGAATGGAGACAGG
N2deg_A3S_F	AATATGGAACAATCATCACCAATCGCTCCAAGT
N2deg_A3S_R	ACTTGGAGCGATTGGTGATGATTGTTCCATATT
N2deg_A4T_F	CAATCAGCTCCAATCACTCCAAGTATGTACCAA

N2deg_A4T_R	TTGGTACATACTTGGAGTGATTGGAGCTGATTG
N2deg_A1S_F	CCTGTCTCCATTCCTTCGCCCCTTCCTCATCT
N2deg_A1S_R	AGATGAGGAAGCGGGCGAAGGAATGGAGACAGG
1HA_stop_NotI_R	CATGCGGCCGCTTAAGCG
Sic1_NES_F	ATGCATGGATCCATGAAC
mCherry_3HA_No t1	ATGCATGCGGCCGCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTAT GGGTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAGCGTAA TCTGGAACATCGTATGGGTACTTGTACAGCTCGTCCATG

LISA 2: Aminohappe järjestused degronite kaupa

1. NES Sic1 delC wt RXL +deg -nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPTPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVTPSTTKSFKNAPLLAPPNSNMGMTSPFNGLTSPQASPFPATLFQFESHNGT
VREEQEPLGRVNRILFPTQQNVDIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSARQLHLSLERDEFDQT
HRKKIIKDVPGAPSDKVITFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDI I INPVRVG

2. NES Sic1 delC 23PNF +deg -nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPTPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVTPSTTKSFKNAPLLAPPNSNMGMTSPFNGLTSPQASPFPAPPKGNFYAKESHNGT
VREEQEPLPPKGNFYAKQQNVDIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSARQLHLSLERDEFDQT
HRKKIIKDVPGAPSDKVITFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDI I INPVRVG

3. NES Sic1 delC 23PNF N2deg -nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPTPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVPPSAASSQSHPTPMRNSSLSRNSVSRNMEQSAPTPRYQFGQQSNSLCPPKG
PNFYAKESHNGTVREEQEPLPPKGNFYAKQQNVDIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSARQL
LHLSLERDEFDQTHRKKIIKDVPGAPSDKVITFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDI I
INPVRVG

4. NES Sic1 delC 23PNF N2deg 4A -nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPTPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVPPSAASSQSHPTPMRNSSLSRNSVSRNMEQSAPTPRYQFGQQSNSLCPPKG
PNFYAKESHNGTVREEQEPLPPKGNFYAKQQNVDIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSARQL
LHLSLERDEFDQTHRKKIIKDVPGAPSDKVITFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDI I
INPVRVG

5. NES Sic1 delC N2deg RXL –nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPSTPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVSPASSSQSHTPMNMSSLSDNVFSRNMFSSTPSMYQFGQQQSNSTLRTLRFQFESHNDNGT
VREEQEPLGRVNRILFPTQQNVDIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSARQLHLSLERDEFDQT
HRKKIIKDVPGAPSDKVITFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDIIINPVRVG

6. NES Sic1 delC 23ANA N2deg –nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPSTPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVSPASSSQSHTPMNMSSLSDNVFSRNMFSSTPSMYQFGQQQSNSTLPPKG
ANAYAKESHNDNGTVREEQEPLPPKGANAYAKQQNVDIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSARQL
LHLSLERDEFDQTHRKKIIKDVPGAPSDKVITFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDII
INPVRVG

7. NES Sic1 delC S2S5S33 23PNF N2deg –nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMSPSPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKSPQKPSQNL
VPVSPASSSQSHTPMNMSSLSDNVFSRNMFSSTPSMYQFGQQQSNSTLPPKG
PNFYAKESHNDNGTVREEQEPLPPKGNPFYAKQQNVDIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSARQL
LHLSLERDEFDQTHRKKIIKDVPGAPSDKVITFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDII
INPVRVG

8. NES Sic1 delC 23PNF N2deg AAAT –nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPSTPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVSPASSSQSHAPMNMSSLSDNVFSRNMFSSTPSMYQFGQQQSNSTLPPKG
PNFYAKESHNDNGTVREEQEPLPPKGNPFYAKQQNVDIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSARQL
LHLSLERDEFDQTHRKKIIKDVPGAPSDKVITFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDII
INPVRVG

9. NES Sic1 delC 23PNF N2deg AASA –nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPSTPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVSTPAPASSSQSHAPMNRNMSLSDNSVFSRNMEQSSPAPSMYQFGQQQSNSICPPKG
PNFYAKESHNDNGTVREEQEPLPPKGPNFYAKQQNVDDIAAEIEEEEGEAAAAASRPTSARQ
LHLSLERDEFDQTHRKKIKDVPGAPSDKVITFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDII
INPVRVG

10. NES Sic1 delC 23PNF N2deg ATSA –nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPSTPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVSTPAPASSSQSHAPMNRNMSLSDNSVFSRNMEQSSPAPSMYQFGQQQSNSICPPKG
PNFYAKESHNDNGTVREEQEPLPPKGPNFYAKQQNVDDIAAEIEEEEGEAAAAASRPTSARQ
LHLSLERDEFDQTHRKKIKDVPGAPSDKVITFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDII
INPVRVG

11. NES Sic1 delC 23PNF N2deg ATAA –nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPSTPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVSTPAPASSSQSHAPMNRNMSLSDNSVFSRNMEQSSPAPSMYQFGQQQSNSICPPKG
PNFYAKESHNDNGTVREEQEPLPPKGPNFYAKQQNVDDIAAEIEEEEGEAAAAASRPTSARQ
LHLSLERDEFDQTHRKKIKDVPGAPSDKVITFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDII
INPVRVG

12. NES Sic1 delC 23PNF N2deg AAST –nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPSTPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVSTPAPASSSQSHAPMNRNMSLSDNSVFSRNMEQSSPAPSMYQFGQQQSNSICPPKG
PNFYAKESHNDNGTVREEQEPLPPKGPNFYAKQQNVDDIAAEIEEEEGEAAAAASRPTSARQ
LHLSLERDEFDQTHRKKIKDVPGAPSDKVITFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDII
INPVRVG

13. NES Sic1 delC 23PNF N2deg SSST –nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPTPPRSRGTRYLAAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVSPASSSQSHTPMRNMSSLSDNVFSRNMEQSSTPSMYQFGQQQNSIC PPKG
PNFYAKESHDNQTVREEQEPL PPKGPNFYAKQQNVVIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSARQ
LHLSLERDEFDQTHRKKI IKDVPGAPSDKVI TFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDI I
INPVRVG

14. NES Sic1 delC 23PNF N2deg STAA –nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPTPPRSRGTRYLAAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVSPASSSQSHTPMRNMSSLSDNVFSRNMEQSSTPSMYQFGQQQNSIC PPKG
PNFYAKESHDNQTVREEQEPL PPKGPNFYAKQQNVVIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSARQ
LHLSLERDEFDQTHRKKI IKDVPGAPSDKVI TFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDI I
INPVRVG

15. NES Sic1 delC 23PNF N2deg STSA –nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPTPPRSRGTRYLAAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVSPASSSQSHTPMRNMSSLSDNVFSRNMEQSSTPSMYQFGQQQNSIC PPKG
PNFYAKESHDNQTVREEQEPL PPKGPNFYAKQQNVVIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSARQ
LHLSLERDEFDQTHRKKI IKDVPGAPSDKVI TFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDI I
INPVRVG

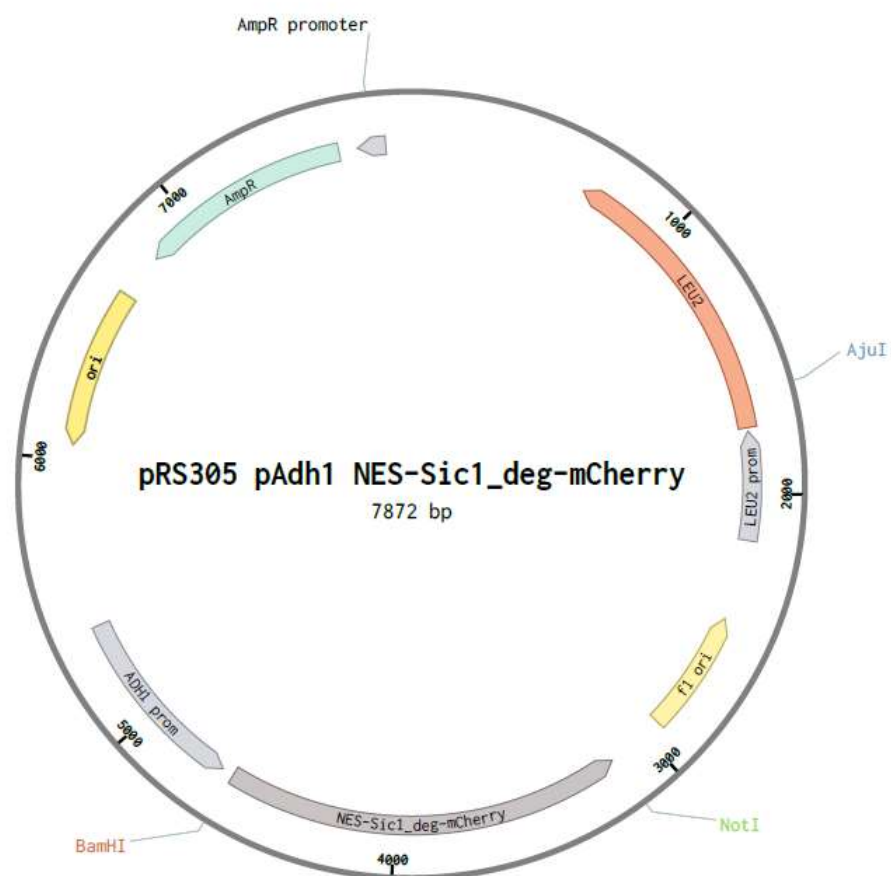
16. NES Sic1 delC 23PNF N2deg 5 Psites –nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKMTPTPPRSRGTRYLAAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNL
VPVNISRKLTISTPSCSFENSNSTSIPSPASSSQSHTPMRNMSSLSDNVFSRNMEQSSTPSMYQFGQQQNSIC
PPKGPNFYAKESHDNQTVREEQEPL PPKGPNFYAKQQNVVIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSARQ
LHLSLERDEFDQTHRKKI IKDVPGAPSDKVI TFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDI I
INPVRVG

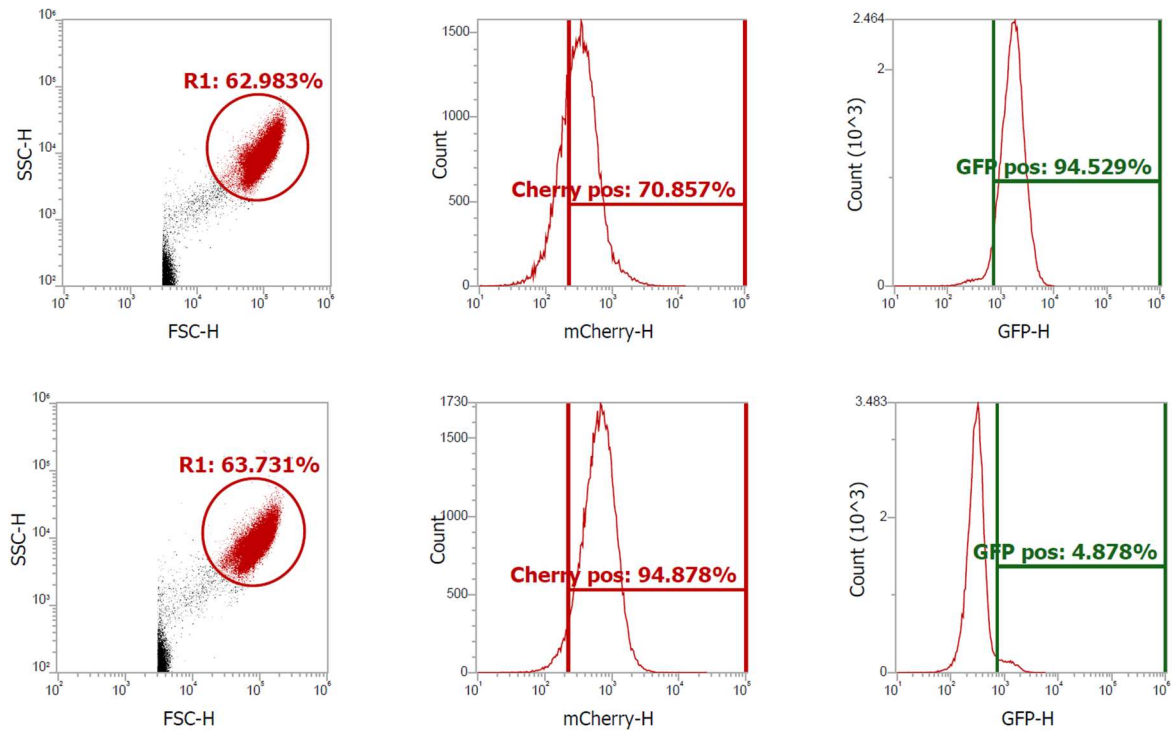
17. NES Sic1 delC 23PNF 2x(N2deg)-nls -vllpp T173A T191A

MNELALKLAGLDINKM**TPSTP**PRSRGT**RYL**AQPSGNTSSSALMQGQK**TP**QKPSQNL
VPVSI**SPASSIPSPASSSQSHTPMRQSHTPMRNMSLSLSDNSVFSRNMEQS****SPITPSMEQS****SPITPS**SMYQFGQQQ
SNSIC**PPKGNFYAK**ESHDNQTVREEQEPL**PPKGNFYAK**QQNVDIDAAEEEEEGEAAAAASRPTS**ARQ**
LHLSLERDEFDQTHRKKI IKDVPGAPSDKVITFELAKNWNNNAPKNDARSQESEDEEDII
INPVRVG

LISA 3: Töös kasutatud pRS305 Adh1 promootoriga vektor



LISA 4: FACS katse R1, mCherry ja GFP filter

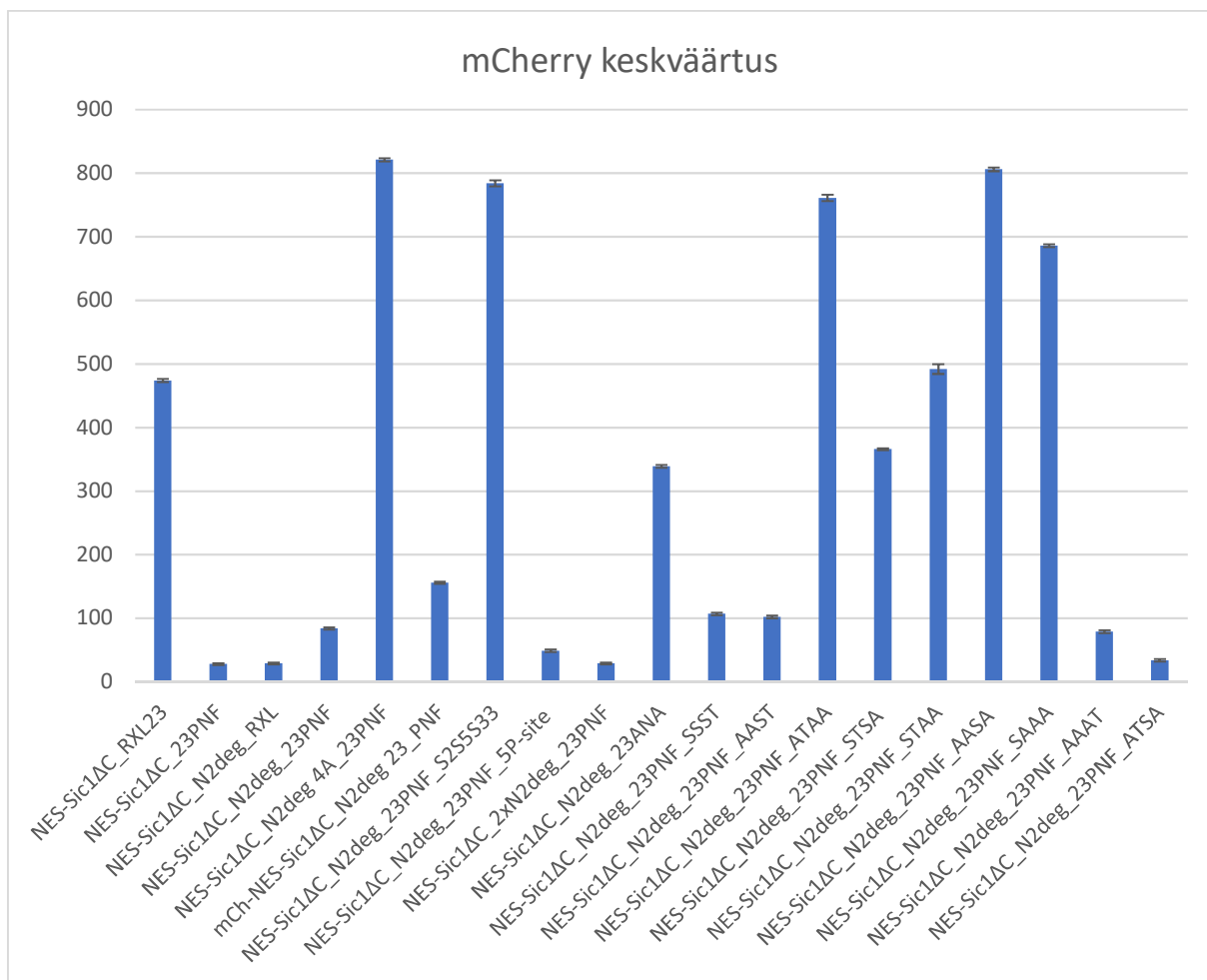


SSC – i.k *side scatter*

FSC – i.k *forward scatter*

Piltidel on näha R1 filtri valimit, millest uuriti mCherry ja eGFP positiivseid rakke. Üleval toodud FACSi katse on östradioliga indutseeritud Cln2 degran 23 PNF. Alumine on ilma indutseerimata sama mutant.

LISA 5: mCherry keskvärtused – DOM0090 fluorestsents



FACSigga mõõdetud mCherry tasemed rakkudes. Degroni mutantide mCherry taseme keskvärtuste võrdlus, millest on maha lahutatud DOM0090 tüve autofluorestsents. „+“ ja „-“ tähistavad vastavalt östradiooliga indutseeritud ja indutseerimata proove.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristel Alman

(sünnikuupäev: 03.04.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Sic1 baasil loodud sünteetiliste degronite fosfosaitide iseloomustamine *Saccharomyces cerevisiae*’s“

mille juhendaja on Rait Kivi.

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace’i kaudu alates **28.05.2023** 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