

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Rakutsüklist sõltuvate ostsillaatorite ekspressiooni reguleerimine sünteetilise
transkriptsioonifaktori abil *Saccharomyces cerevisiae*'s

Magistritöö

30 EAP

Kristel Alman

Juhendajad PhD Rait Kivi

Prof. Mart Loog

TARTU 2020

INFOLEHT

Rakutsüklist sõltuvate ostsillaatorite ekspressiooni reguleerimine sünteetilise transkriptsioonifaktori abil *Saccharomyces cerevisiae*'s

Rakutsükli faaside vaheldumine on kontrollitud läbi tsükliin-Cdk1-Cks1 ning APC/C komplekside. Kompleksis olevatel valkudel on erinevad funktsioonid: Cdk1 fosforüülib oma substraatidel spetsiifilisi aminohappelisi järjestusi – fosfodegroneid, Cks1 seob fosforüülitud treoniine ning erinevate faaside tsükliinid ning APC/C kompleks tunnevad ära erinevaid seondumismotiive.

Substraatidel komplekside poolt äratuntavaid spetsiifilisi aminohappelisi motiive on võimalik kasutada sünteetilises bioloogias moodulitena. Taoliste moodulite kasutamine võimaldab luua ortogonaalsed rakutsüklist sõltuvad ostsilleeruvad sünteetilised transkriptsioonifaktorid, mida on võimalik kasutada näieteks rakuvabrikutes erinevate geenide regulatsioonis.

Märksõnad: degron, fosforüülimine, kinaas, rakutsükkel, transkriptsioonifaktor

CERCS kood: P310 (Proteiinid, ensüümid)

Regulation of expression in cell cycle dependent oscillators via synthetic transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*'s

Cell cycle phase alternation is controlled through cyclin-Cdk1-Cks1 and APC/C complexes. The proteins in the complex have different functions: Cdk1 phosphorylates specific amino acid sequences on its substrates - phosphodegrons, Cks1 binds phosphorylated threonines. Cyclins of different phases, and the APC/C complex recognize different binding motifs on substrates.

Specific amino acid motifs recognized by the complexes on substrates can be used as modules in synthetic biology. The use of such modules makes it possible to create orthogonal cell cycle-dependent oscillating synthetic transcription factors that can be used, for example in the regulation of various genes in cell factories.

Key words: degron, phosphorylation, kinase, cell cycle, transcription factor

CERCS research code: P310 (Proteins, enzymology)

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	6
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. PAGARIPÄRMI RAKUTSÜKKEL	8
1.2. TSÜKLIIN-CDK1-CKS1 KOMPLEKSID	9
1.3. CDK1 INHIBIITORID.....	13
1.4. TSÜKLIIN-CDK-CKS KOMPLEKSIDE SUBSTRAATSPETSIIFILISUS	15
1.5. VALKUDE DEGRADATSIOON PÄRMIS.....	16
1.6. VALKUDE DEGRADATSIOON FOSFODEGRONITE ABIL	21
1.7. SÜNTEETILISED OSTSILAATORID	23
1.8. SÜNTEETILISED TRANSKRIPTSIOONIFAKTORID	24
2. EKSPERIMENTAALOSA	26
2.1. TÖÖ PRAKTIILISE OSA EESMÄRGID.....	26
2.2. MATERJALID JA METOODIKA	26
2.2.1. DEGRONITE DISAIN.....	26
2.2.1.1. SIC1	26
2.2.1.1.1. SIC1[1-215].....	26
2.2.1.1.2. SIC1[1-117].....	26
2.2.1.1.3. FAR1+CLB5	27
2.2.1.1.4. FAR1[1-393] + CLB5[1-133] KOMBINATSIOONID	27

2.2.1.1.5.	FAR1[1-150] + CLB5[1-133] KOMBINATSIOONID	27
2.2.2.	KASUTATUD PLASMIIDID, TÜVED, SÖÖTMED, LAHUSED	27
2.2.3.	FLUORESTSENTSMARKERITEGA PÄRMITÜVE KONSTRUEERIMINE	28
2.2.3.1.	PCR.....	28
2.2.3.2.	RESTRIKTSIOON	29
2.2.3.3.	LIGATSIOON	29
2.2.3.4.	TRANSFORMATSIOON <i>E. COLI</i> DH5A RAKKODESSE	29
2.2.3.5.	PLASMIIDIDE ERALDAMINE <i>E. COLI</i> DH5A RAKKODEST.....	29
2.2.3.6.	SELEKTIIVSUSMARKERI VÄLJA VAHETAMINE.....	30
2.2.3.7.	RESTRIKTSIOON PÄRMI TRANSFORMEERIMISEKS	30
2.2.3.8.	PÄRMI TRANSFORMEERIMINE	30
2.2.3.9.	CDK1 SENSORI TRANSFORMATSIOON	31
2.2.3.10.	PÄRMI TRANSFORMEERIMINE	31
2.2.4.	PCR SIC1 DEGRONI AMPLIFITSEERIMISEKS	31
2.2.5.	PCR FAR1 DEGRONI AMPLIFITSEERIMISEKS.....	32
2.2.6.	PCR CLB5 TSÜKLIINI AMPLIFITSEERIMISEKS.....	33
2.2.7.	PCR FAR1+CLB5 KOKKULIITMISEKS	34
2.2.8.	INSERTIDE KLONEERIMINE TRANSKRIPTSIOONIFAKTORIGA PLASMIIDI 35	
2.2.9.	TRANSFORMATSIOON PÄRMI	35
2.2.10.	FACS	36
2.2.11.	MIKROSKOOPIA	36
2.3.	TULEMUSED JA ARUTELU	37

2.3.1. SÜNTEETILISI TRANSKRIPTSIOONIFAKTOREID SISALDAVATE PÄRMITÜVEDE DISAINIMINE JA TESTIMINE	37
2.3.2. OSTSILLAATORITE DISAINIMINE	38
2.3.3. OSTSILLAATORITE ANALÜÜS <i>IN VIVO</i> MIKROSKOOPIAS	41
2.3.3.1. SIC1[1-215]+TRANSKRIPTSIOONIFAKTOR	42
2.3.3.2. SIC1[1-117]+TRANSKRIPTSIOONIFAKTOR	44
2.3.3.3. FAR1[1-393]+CLB5[1-133]+TRANSKRIPTSIOONIFAKTOR.....	47
2.3.3.4. FAR1[1-150]+CLB5[1-133]+TRANSKRIPTSIOONIFAKTOR.....	49
2.4 TULEVIKU PERSPEKTIIVID.....	52
KOKKUVÕTE	53
SUMMARY	54
TÄNUSÕNAD	55
KASUTATUD ALLIKAD	56
LISAD	63
LISA 1: TÖÖS KASUTATUD PRAIMERID	63
LISA 2: AMINOHAPPEJÄRJESTUSED DEGRONI KAUPA.....	64
SIC1[1-215].....	64
SIC1[1-117].....	65
FAR1[1-393]+CLB5[1-133] KOMBINATSIOONID	65
FAR1[1-150]+CLB5[1-133] KOMBINATSIOONID	67
LISA 3: TRANSKRIPTSIOONIFAKTORIT SISALDAV PLASMIID	69
LISA 4: FLUORESTSENTSMARKEREID SISALDAVAD PLASMIIDID	70
LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS	72

KASUTATUD LÜHENDID

APC/C – anafaasi viiv kompleks/tsüklosoom (i.k. *anaphase promoting complex/cyclosome*)

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

CKI – tsükliinsõltuva kinaasi inhibiitor (i.k. *cyclin-dependent kinase inhibitor*)

Cks1 – tsükliinsõltuva kinaasi subühik 1 (i.k. *cyclin-dependent kinase subunit 1*)

Clb – B-tüüpi tsükliin

Cln – G1-faasi tsükliin

D-box – (i.k. *destruction box*), APC/C aktivaatorit siduv motiiv

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

Far1 – (i.k. *Factor ARrest 1*), Cdk1 inhibiitor

eGFP - eukarüootne roheliselt fluorestseeruv valk (i.k. *eukaryotic green fluorescent protein*)

MBF – transkriptsiooni kompleks, mis reguleerib transkriptsiooni G1/S üleminekul

SBF – transkriptsiooni kompleks, mis alustab G1/S üleminekul transkriptsiooni

SCF – Skp1-Cullin-1-F-box valk kompleks (i.k. *Skp1-Cullin-1-F-box complex*)

Sic1 – Cdk1 substraadi inhibiitor 1 (i.k. *Substrate Inhibitor of Cdk 1*)

ssDNA – üheaahelaline lõhe sperma DNA (i.k. *salmon sperm DNA*)

SISSEJUHATUS

Rakutsükkel on protsess, mille käigus rakk läbib tütarakkudeks jagunemise käigus hulga täpselt reguleeritud etappe. Pagaripärmis on peamiseks rakutsükli regulaatoriks tsükliinsõltuv kinaas Cdk1, mis moodustab koos Cks1 fosfoadapteri ning erinevates rakufaasides ekspresseeritavate tsükliinidega aktiivse kompleksi. Kokku on pagaripärmis 9 tsükliini, mis mõjutavad tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleksi substraatspetsiifilisust. Need ekspresseeruvad ostsilleeruvate lainetena läbi kogu rakutsükli.

Tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleksi mõju substraatidele on reguleeritud läbi spetsiifiliste motiivide, mille abil on võimalik kompleksil seonduda ning substraatvalk fosforüülida. Osasid fosforüülitud substraatide motiive – degroneid - tunnevad ära SCF kompleksid, mis saadavad valgu proteosoomi lagundamiseks.

Kombineerides tsükliin-Cdk1-Cks1 ning APC/C omaseid erinevaid seondumismotiive, on võimalik luua uudsete degradatsiooniprofiilidega sünteetilisi ostsillaatoreid. Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli disainida ning testida erinevate ostsillatsioonimustritega sünteetilisi transkriptsioonifaktoreid, lisades sünteetilisele transkriptsioonifaktor LexA-le tsükliin-Cdk1-Cks1 ning APC/C kompleksidele poolt äratuntavaid degnomotiive. Töös on kasutatud kahe Cdk1 inhibiitori - Sic1 ning Far1 – fosfodegroneid, milles muteeriti erinevaid seondumismotiive rakutsüklist sõltuva valkude ekspressiooniprofiili muutmiseks. Hilises M- ja G1-faasides degradatsiooni moduleerimiseks lisati Far1 konstruktidele APC/C spetsiifiline degnon Clb5 N-terminusest. Muutusi ekspressioonis jälgiti *in vivo* fluorestsentsmikroskoopia abil.

Uue degradatsiooniprofiiliga sünteetilisi ostsillaatoreid on võimalik tulevikus kasutada rakuvabrikute loomisel, et reguleerida valkude ekspressiooni, vältimaks toksiliste vaheproduktide akumulierumist rakkudes.

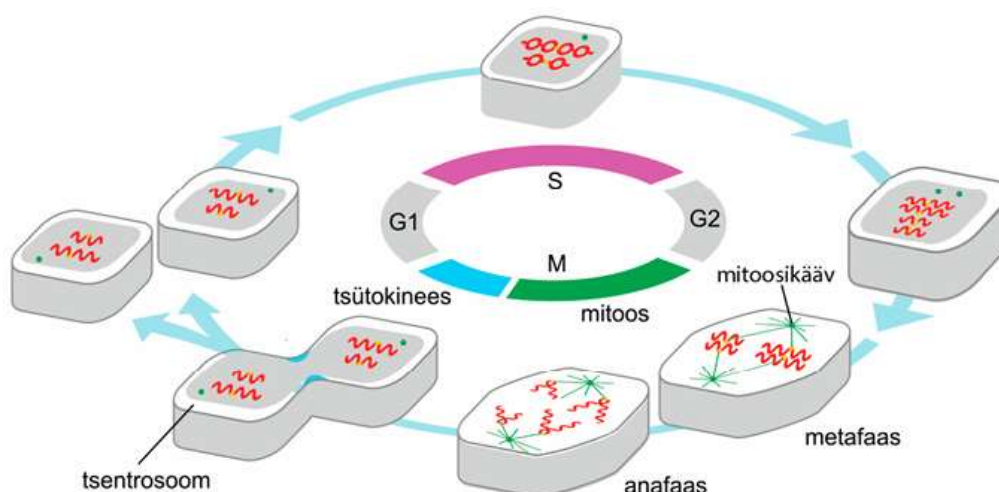
Käesolev magistritöö on valminud Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi molekulaarse süsteemibioloogia laboris.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Pagaripärmi rakutsükkel

Pagaripärm ehk *Saccharomyces cerevisiae* on üks enim uuritud mudelorganismidest. Laboris mudelorganismidena kasutatavad pärmitüvede abil on võimalik uurida mitmeid rakus toimivaid mehhanisme, sealhulgas rakutsükli ning selle regulatsiooni. Rakutsükli põhiliseks eesmärgiks on luua kaks identse pärilikkusinfo tütarraku (Morgan, 2007).

Rakutsükkel jaguneb kaheks põhifaasiks, mida eraldavad kaks vahepealset faasi. Põhifaasideks on sünteesifaas ehk S-faas, kus toimub DNA replikatsioon, ning jagunemisfaas ehk M-faas, kus kromosoomid lahknevad ning need jaotatakse kahe tekkiva tütarraku vahel. Vahefaasid on vastavalt G1 ja G2, millest esimene eelneb S-faasile, ning teine eraldab S- ja M-faasi (joonis 1). Alternatiivselt võib seda nimetada G2/M-faasiks, kuna nende üleminekut on keeruline paika panna.



Joonis 1. Rakutsükkel jaguneb kahte põhifaasi, milleks on sünteesifaas S ning mitoosifaas M, ning neid eraldavasse kahte vahefaasi G1 ning G2. M-faas jaguneb veel kaheks: mitoos ning tsütokinees (Kõivomägi ja Loog, 2018).

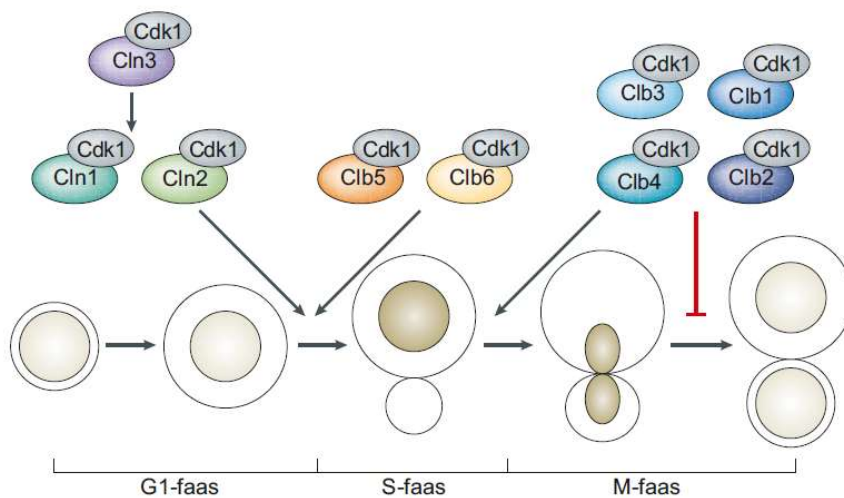
M-faas jaguneb kaheks suuremaks protsessiks, millest esimene on mitoos. Mitoos jaguneb viieks etapiks, mille jooksul toimub tuuma jagunemine: profaas, prometafaas, metafaas, anafaas ning telofaas. Profaasis toimub sõsarkromatiidide kondenseerumine ning mitoosikävi formeerumine, prometafaasis kinnituvad mitoosikävi kinetohoori mikrotuubulid kromosoomide külge, metafaasis segregeeritakse kromosoomid ning toimub ka kromosoomide joondamine ekvaatorile, anafaasis toimub kinetohoorsete mikrotorukete lühenemine ning tsentrosoomide liikumine poolustele, telofaasis tuumamembraani fragmentide koondumine

kromosoomide ümber ja kontraktiilise rõnga formeerumine. Mitoosile järgneb tsütokinees, kus toimub tsütoplasma jagunemine ning tekkinud kahe raku eraldamine (Kõivomägi ja Loog, 2018).

Rakutsükli kontrollpunktides kontrollitakse läbi erinevate signaalide raku valmisolekut järgmisesse faasi edenemiseks. Kolm olulisemat kontrollpunkti on Start-punkt ehk G1/S-faasi kontrollpunkt, mitoosi alustamine ning metafaasi-anafaasi üleminek. Start punktis alustab rakk jagunemiseks sobilikel tingimustel DNA replikatsiooni. G2/M üleminekul kontrollitakse DNA kahjustusi ning replikatsiooni lõpetamist, et liikuda edasi mitoosi. Metafaasist anafaasi minekuks kontrollitakse käävi moodustumist sõsarkromatiidide eraldamiseks (Morgan, 2007).

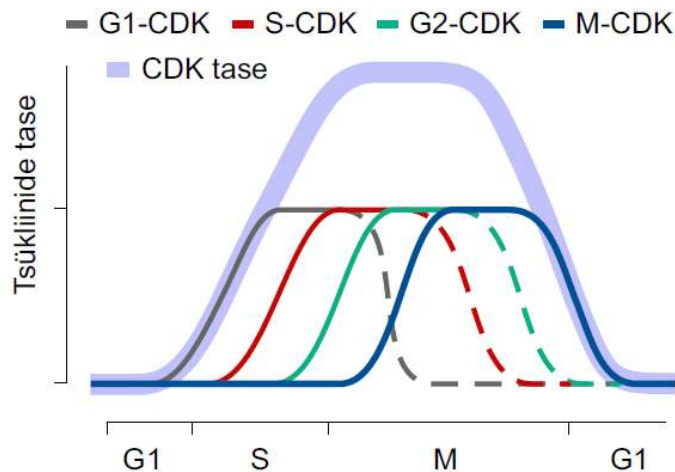
1.2. Tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleksid

Tsükliinid on kõikides eukarüootsetes rakkudes esinevad valgud, mis omavad tähtsat funktsiooni rakutsükli regulatsioonis (Heldt ja Piechulla, 2011). Rakutsükli jooksul võib erinevate tsükliinide tasemeid kujutada ostsilleeruvate ning osaliselt kattuvate lainetena (Kõivomägi et al., 2011a; Morgan, 2007). Pagaripärmis on leitud kahte tüüpi rakutsükliit reguleerivaid tsükliine: G1 tsükliinid ehk Cln-id ning B-tüüpi tsükliinid ehk Clb-id. G1 tsükliine on kolm, Cln1, Cln2 ja Cln3 (joonis 2). G1-faasi tsükliiniks on Cln3, ning Cln1 ja Cln2 loetakse G1/S-faasi tsükliinideks. B-tüüpi tsükliine on kuus: Clb1, Clb2, Clb3, Clb4, Clb5 ja Clb6. S-faasi tsükliinid on Clb5 ja Clb6, G2/M-faasi tsükliinid on Clb3 ja Clb4 ning M-faasi tsükliinideks on Clb1 ja Clb2 (joonis 2) (Bloom ja Cross, 2007; Nasmyth, 1996).



Joonis 2. Pärmiss leidub kaht tüüpi tsükliine: Cln ja Clb. Cln tsükliinid on ekspresseeritud G1 ning G1/S-faasis. Clb tsükliinid on ekspresseeritud S-faasist M-faasini, kus S-faasi tsükliinid on Clb5,6, G2/M-faasi tsükliinid on Clb3,4 ning M-faasi tsükliinid on Clb1,2 (kohandatud Bloom ja Cross, 2007).

Tsükliinsõltuvad kinaasid (Cdk) kuuluvad proteiinkinaaside hulka, mis katalüüsivad ATP fosfaatrühmade kovalentset sidumist substraatvalkude seriini või treoniini kõrvalahelatele. Fosforüülides võib muutuda substraadi ensümaatilise aktiivsus, konformatsioon või selle interaktsioon teiste valkudega, samuti ka asukoht rakus (Harashima et al., 2013; Morgan, 2007). Kuna Cdk-d fosforüülivad substraatides leiduvaid seriine ja treoniine, nimetatakse neid seriin-treoniinkinaasideks (Bloom ja Cross, 2007). Pagaripärmi Cdc28 ehk Cdk1 on tsükliinsõltuv kinaas, mida nimetatakse ka rakutsükli keskseks regulaatoriks (Mendenhall ja Hodge, 1998). Cdk1 tase on rakus konstantne ning liias võrreldes tsükliinidega (joonis 3) (Mathiasen ja Lisby, 2014).

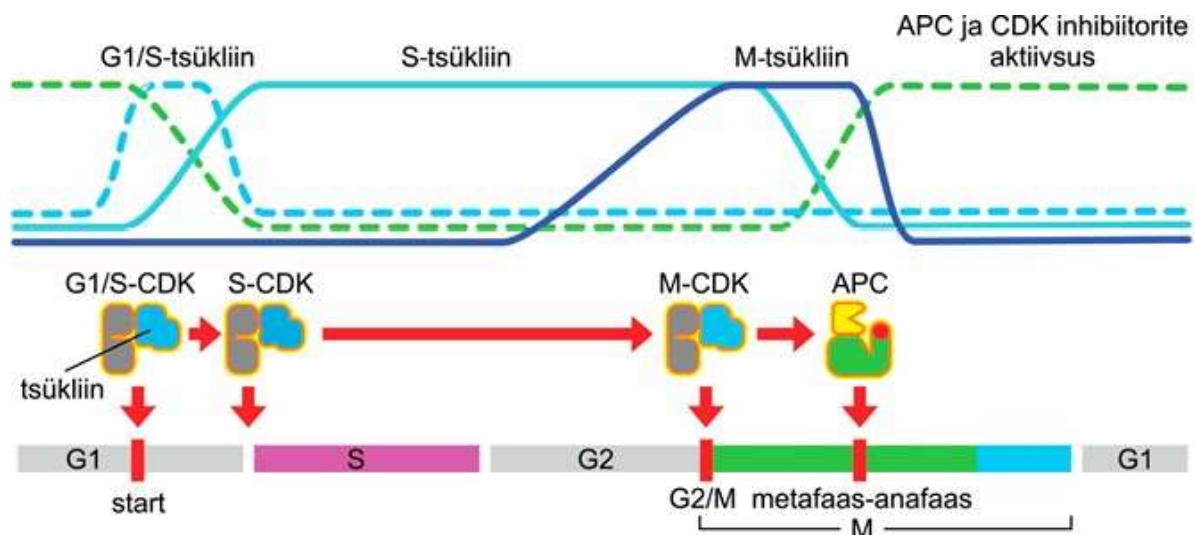


Joonis 3. Tsükliinide tase ostsilleerub rakutsüklist sõltuvalt, ent Cdk1 tase on nendega võrreldes alati liias (kohandatud Örd et al., 2019a).

Tsükliinsõltuva kinaasi subühik 1 (Cks1) on fosfoadaptorvalk, mis on kompleksis Cdk1-ga. Cks1-s leiduv katioonne tasku seob osaliselt fosforüülitud valke paremini Cdk1 kompleksi külge (McGrath et al., 2013).

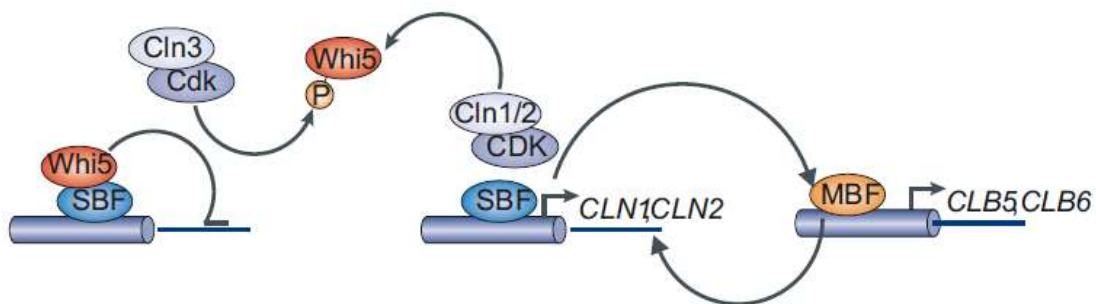
Tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleksi tekkimiseks ning kinaasi aktiveerimiseks on vajalik Cdk1 seondumine tsükliiniga (Egan ja Solomon, 1998; Mendenhall ja Hodge, 1998). Aktiveerimisel muutub Cdk1 aktiivsaiidi konformatsioon substraatide fosforüülimiseks sobilikuks (Holt, 2012). Tsükliin-Cdk1-Cks1 sõltuv substraatide multifosforüülimine ehk mitme saidi fosforüülimine on kontrollitud fosforüülitavate saitide kaugusest, seriinide ja treoniinide vaheldumisest fosfoakseptoritena ning tsükliinide seondumismotiivide paigutusest (Kõivomägi et al., 2013).

Rakutsükli alustamiseks Start-punkti on vajalik G1/S- ja S-faasi tsükliinidega seotud tsükliin-Cdk1-Cks1 komplekside tekkimine (joonis 6). Selle tulemusena fosforüülitakse valke, mis lükkavad käima näiteks DNA replikatsiooni ja käävi polaarkeha duplikatsiooni. M-faasi tsükliin-Cdk1-Cks1 komplekside aktiveerimine viib raku mitoosi. Spindli moodustamiseks vajalike valkude fosforüülimise tulemina siseneb rakk metafaasi. M-faasi tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleksid aktiveerivad APC/C-d, mis põhjustab läbi negatiivse tagasiside tsükliinide proteolüütilise lagundamise ja mille tõttu saavad sõsarkromatiidid eralduda. Tsükliinide lagundamine põhjustab Cdk inaktiveerimise ning fosfataasid defosforüülivad Cdk substraadid. Spindleid eraldavate valkude defosforüülimisel eraldatakse spindlid, mis lõpetab mitoosi ning algatab tsütokineesi (Morgan, 2007).



Joonis 4. Rakutsükli Start-punktis aktiveeritakse G1/S-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid ning S-faasi minekuks S-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid. S-faasi tsükliin-Cdk1 komplekside aktiivsus püsib kõrge läbi S- ja G2-faaside ning viib M-faasi tsükliin-Cdk1 komplekside aktiveerimiseni. M-faasi tsükliin-Cdk1 komplekside aktiveerimine aktiveerib ka APC/C kompleksi, mis viib omakorda S-faasi tsükliin-Cdk1 ning M-faasi tsükliin-Cdk1 komplekside lagundamiseni (Kõivomägi ja Loog, 2018).

G1-faasis sõltub Cln3-Cdk1-Cks1 komplekside tase soodsatest keskkonningimustest. Headel tingimustel tõuseb kompleksi tase piisavalt kõrgeks ja fosforüülib Whi5. Whi5 on rakutsükli initsiatsioonil transkriptsiooniks vajaliku SBF(Swi4/Swi6) kompleksi inhibiitor, mis dissotseerub fosforüülimise tagajärjel SBF kompleksilt ning kompleks muutub aktiivseks. SBF seondub CLN1 ja CLN2 promooteritele, aktiveerides nende geenide transkriptsiooni (joonis 5). SBF vabastamisel aktiveeritakse ka MBF transkriptsioonifaktor, mis loob positiivse tagasisideahela Cln1 ja Cln2 transkriptsiooniks, mis on vajalikud G1/S-faasi üleminekuks. Cln2-Cdk1-Cks1 kompleks fosforüülib dissotseerunud Whi5 ning Whi5 viiakse tuumast välja (Bertoli et al., 2013; Bhaduri et al., 2015; Doncic et al., 2011). MBF aktiveerib ka Clb5/6 transkriptsiooni (Atay et al., 2016).



Joonis 5. Cln3-Cdk1 kompleksi aktiveerimine soodsatel tingimustel põhjustab Whi5 fosforüülimise. Whi5 on SBF transkriptsioonifaktori inhibiitor ning Whi5 fosforüülimise tulemusena aktiveeritakse SBF. SBF seondub CLN1 ja CLN2 promootoritele, aktiveerides CLN1 ja CLN2 transkriptsiooni. SBF aktiveerimine aktiveerib ka MBF transkriptsioonifaktori ning sellega CLB5 ja CLB6 geenide transkriptsiooni. Samuti loob MBF aktiveerimine positiivse tagasiside CLN1 ja CLN2 transkriptsiooniks (kohandatud Bertoli et al., 2013).

1.3. Cdk1 inhibiitorid

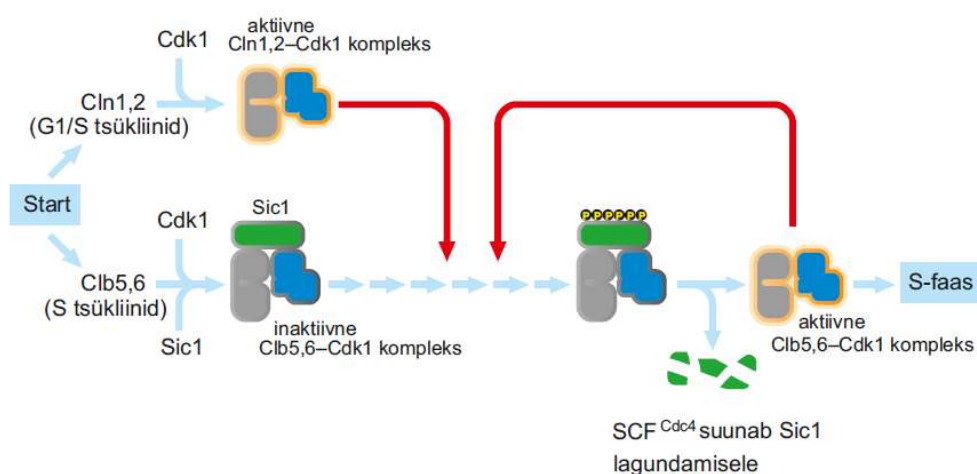
Geeniekspressiooni uuringud on näidanud, et rakutsükli jooksul on ligi 800-1200 geeni, mille transkriptsioon muutub rakutsükli vältel ehk võivad olla rakutsüklis sõltuvad või seda reguleerivad. Tsükliinide ja tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleksi transkriptsiooniliste regulaatorite põhilistes võrgustikes on ära toodud 27 geeni, millest 10 kodeerivad transkriptsioonifaktori valke ning 17, mis kodeerivad tsükliine ja tsükliin-Cdk1-Cks1 regulaatoreid (Cosentino et al., 2011).

Tsükliin-Cdk1-Cks1 regulaatorite alla kuuluvad näiteks CKI-d ehk tsükliinsõltuva kinaasi inhibiitorid. CKI-de funktsiooniks on tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleksidega seondumine ning nende inaktiveerimine. CKI seandumisel kompleksiga muutub Cdk aktiivsaiidi struktuur, mis blokeerib substraadi seondumist aktiivsaiiti. Rakkudes on enim levinud G1/S- ja S-faasi tsükliin-Cdk1 komplekside inhibiitorid (Alberts, 2015).

Cdk substraadi inhibiitor 1 (Sic1) on B-tüüpi CKI, kuna mõjutab eelkõige B-tüüpi tsükliine, olles ekspresseeritud hilisest M-faasist hilise G1-faasini. Mitoosifaasis inaktiveerib Sic1 mitootilisi tsükliin-Cdk1-Cks1 komplekse ning G1-faasis hoiab ära varajase S-faasi tsükliin-CDK-de aktiveerimise, võimaldades õigeaegset S-faasi sisenemist (Barberis, 2012; Lengronne ja Schwob, 2002; Schwob et al., 1994). Sic1 aktiivsus sõltub Cln-ide aktiivsusest ning Cdc34

ubikvitiini-konjugeerivast ensüümist ning Sic1 fosforüülimine ja lagundamine viib raku Start punktis replikatsioonini (Schneider et al., 1996).

Sic1 transkribeerimiseks on vajalik Swi5 transkriptsioonifaktori seondumine Sic1 promooterile (Knapp et al., 1996). Swi5 tuumaimporti inhibeerivad Clb-Cdk1-Cks1 kompleksid, olles negatiivseks regulaatoriks Swi5-le. Cdc14 on fosfataas, mis defosforüülib nii Swi5 kui Sic1, aktiveerides Swi5 tuumaimpordi ning sellega sihtmärkgeenide transkriptsiooni. Fosforüülimine saadab Sic1 degradeerimisse ning aktiveerib S-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid (joonis 6). G1/S- ning S-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid inhibeerivad G1- ja S-faasis Swi5 ning Sic1 akumulatsiooni rakus (Barberis, 2012; Visintin et al., 1998).



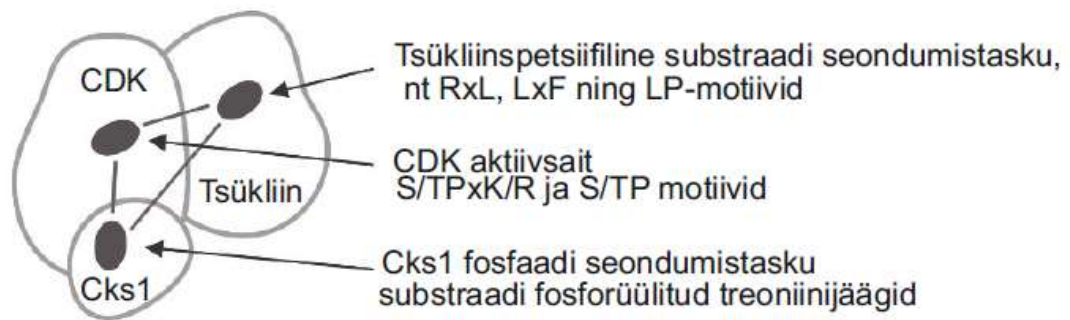
Joonis 6. Start-punktis aktiveeritakse G1/S- ja S-tsükliinide tootmine, mis moodustavad kompleksi Cdk1-ga. Sic1 seondumine inaktiveerib S-faasi tsükliin-Cdk1 komplekside aktiivsust. SCF^{Cdc4} tunneb ära fosforüülitud Sic1 ning suunab inhibiitori lagundamisse. Aktiivsed G1/S- ja S-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid inhibeerivad Sic1 kogunemist rakus (kohandatud Morgan, 2007).

Far1 valk on Cdk1 inhibiitor, mis aretib paardumisferomoonide juuresolekul rakutsükli G1-faasis ning soodustab paardumisgeenide transkriptsiooni. Rakutsükli arestimine toimub läbi G1-tsükliin Cln2 inhibeerimise (Chang ja Herskowitz, 1990). B-tüüpi tsükliinid reguleerivad Far1 taset rakus (Doncic ja Skotheim, 2013). Cln-Cdk1-Cks1 kompleks fosforüülib Far1 ning see lagundatakse läbi ubikvitiin-sõltuva proteolüüsi (Peter ja Herskowitz, 1994; Peter et al., 1993). Valku lagundatakse aktiivselt Start-punktist mitoosist väljumiseni ning on rakus lagundamata kujul vaid G1-faasis (Henchoz et al., 1997).

1.4. Tsükliin-CDK-Cks komplekside substraatspetsiifilisus

Valkude globulaarseid domeene on peetud põhiliseks valk-valk interaktsioonide vahendajaks (Davey et al., 2011). Viimasel paarikümnel aastal on valkudes leitud mitteglobulaarseid alasid, milles asuvad funktsionaalsed lühikesed 3-10 aminohapet pikad motiivid. Need on enamasti paigutunud väljaulatuvatesse lingudesse, et interakteeruda teiste valkudega ning on erinevate liikide seas tugevalt konserveerunud. Selliste lühikeste motiivide alla kuuluvad näiteks fosforüülimissaidid, lokalisatsioonisignaalid ja seondumisalad. Oma madala afiinsuse tõttu on need võimelised kiiresti kohanema ning vaid üks mutatsioon motiivis võib seondumist takistada (Davey et al., 2015; Neduva ja Russell, 2005; Puntervoll et al., 2003).

Cdk1 fosforüülimissaidi optimaalne konsensusmotiiv substraadil on [S/T]Px[K/R], kus S/T on fosforüülitav seriin või treoniin, P on proliin, x on suvaline aminohape ja K/R positsioonil positiivselt laetud aminohapetest kas lüsiin või arginiin (joonis 7). Fosforüülitavale aminohappele järgnev proliin muudab peptiidahela konformatsiooni fosforüülimiseks sobivasse asendisse ning on võimeline moodustama vesiniksideme kinaasiga. Proliinist +2 positsioonis aminohape ei seonu kinaasiga, ent pikk alifaatne aminohape positiivselt laetud kõrvalahelaga tõstab oluliselt substraadi fosforüülimise tõhusust, luues samuti vesiniksideme (Brown et al., 1999; Kõivomägi ja Loog, 2011; Kõivomägi et al., 2011a). Minimaalseks motiiviks loetakse [S/T]P motiivi, kus seriinile või treoniinile järgneb proliin. Sic1 järjestuses paikneb kokku 10 fosforüülimissaiti, millest 3 moodustuvad konsensusmotiivid ning 7 minimaalmotiivid. T48 positsiooni fosforüülimissait pole klassikalise motiiviga sait, ent on osaks disfosfodegronist (Kõivomägi et al., 2011a).



Joonis 7. Tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleks tunneb substraadil ära erinevaid motiive, millega lagundamise spetsiifilisust reguleerida. Erinevad tsükliinid tunnevad ära erinevaid seondumismotiive substraadil, näiteks RxL, LxF ning LP-motiivid. CDK konsensusmotiiviks substraadidel on S/TPxK/R, minimaalmotiiviks sellest S/TP. Fosfoadapter Cks1 seondub substraadil fosforüülitud treoniinijäägiga (kohandatud Kõivomägi et al., 2013)

Cdk1-tsükliin komplekside substraatspetsiifilisus toimib läbi spetsiifiliste valk-valk interaktsioonide. S-faasi tsükliinidel nagu Clb5 on hüdrofoobne tasku, millega on võimalik substraadidel ära tunda RxL järjestust ehk Cy motiivi, kus R on arginiin, x suvaline aminohape ning L on lüsiin (Wilmes et al., 2004). G1-tüüpi tsükliinide substraadidel on avastatud LLPP motiiv – LxxPΦxΦ, kus L on leutsiin, x suvaline aminohape, P on proliin ning Φ on hüdrofoobne aminohape (Bhaduri ja Pryciak, 2011; Kõivomägi et al., 2011b). M-faasi tsükliinide Clb1,2 substraadidel on leitud LxF motiiv, kus L on leutsiin, x suvaline aminohape ning F on fenüülalaniin, mis on leitud näiteks Cdc6-1 (Örd et al., 2019b).

Fosfoadapter Cks1 seondub substraadil kindlates positsioonides eelnevalt fosforüülitud treoniinidega, aga mitte seriinidega (Kõivomägi et al., 2013; McGrath et al., 2013; Tyanova et al., 2013). Sic1 valgus on leitud kolm saiti, mis käituvad multifosforüülimisel praimimissaitidena, seondudes Cks1-ga: T5, T33 ning T45, Far1 valgus puhul seondub Cks1 306. positsioonis oleva treoniiniga (Kõivomägi et al., 2011b; Valk et al., 2013).

1.5. Valkude degradatsioon pärmis

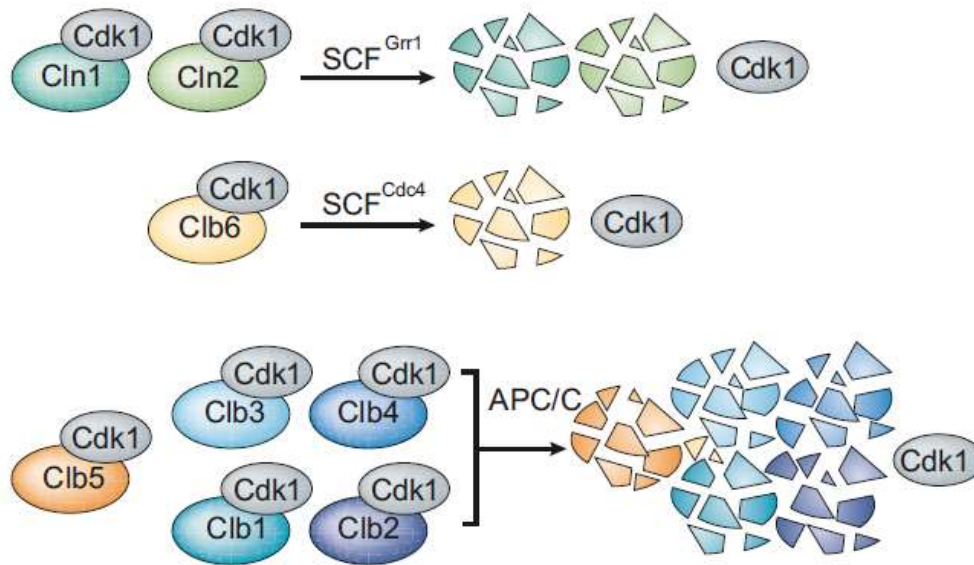
Rakutsükliit reguleeritakse läbi valkude selektiivse ja õigeaegse lagundamise (Teixeira ja Reed, 2013). Ubikvitiin-proteasoom-vahendatud proteolüüsil on võimalik valke lagundada mitte-

lūsosomaalselt (Pagano, 1997). Ubikvitineerimine aitab läbi spetsiifilise valkude äratundmise kontrollida substraatide funktsiooni, paiknemist ning stabiilsust (Teixeira ja Reed, 2013).

Proteosoom leidub eukarüootsete rakkude tuumas ning tsütoplasmas, jagunedes rakus laiali rakutsüklist sõltuvalt (Baumeister et al., 1998). Ubikvitineeritud substraate tunneb ära 26S proteasoom, kus toimub proteolüüs (Teixeira ja Reed, 2013). 26S proteasoom koosneb kesksest 20S kompleksist, millest ühel või mõlemal pool paiknevad 19S kompleksid. 19S kompleksid vastutavad ubikvitineeritud valkude äratundmise eest ning muudavad valgu 20S kompleksile lagundamiseks sobivaks (Baumeister et al., 1998).

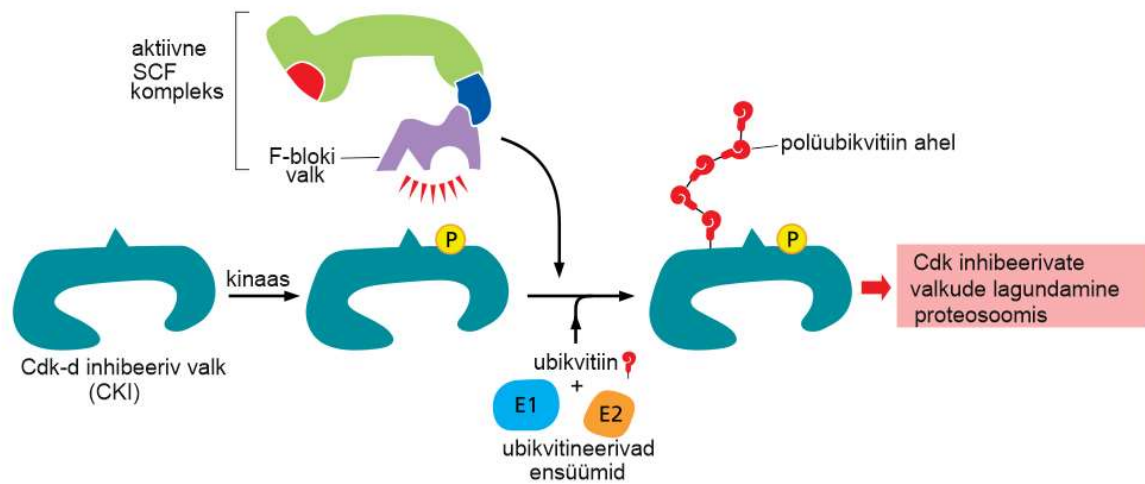
Ubikvitiin on väike (6 kDa) ning kõrgelt konserveerunud valk, mis liidetakse läbi ensümaatiliste reaktsioonide kaskaadi kovalentse sidemega substraadi külge (Teixeira ja Reed, 2013). Ubikvitineerimise esimeses etapis liidetakse ubikvitiin ATP-st sõltuvalt tioester sidemega ubikvitiini-aktiveeriva ensüümi (E1) külge. Aktiveeritud ubikvitiin liidetakse ubikvitiini-konjugeeriva ensüümi (E2) tsüsteiini jäägi külge, ning kas koostöös ubikvitiinligaasiga (E3) või ilma liidetakse ubikvitiin sihtmärk valgu lüsiini jäägiga. Ubikvitiinligaasid võimaldavad täpsemat substraatide äratundmist läbi spetsiifiliste motiivide (Pagano, 1997; Page ja Hieter, 1999; Teixeira ja Reed, 2013).

SCF (i.k *Skp1-Cullin-1-F-box*) ja APC/C (i. k *anaphase promoting complex/cyclosome*) kompleksid on rakutsükli regulatsioonis tähtsad ubikvitiinligaasid (E3), mis koosnevad mitmest subühikust ning on evolutsiooniliselt konserveerunud (Toda et al., 1999). SCF ja APC/C kompleksid tunnevad ära rakutsükli olulisi valke, muuhulgas ka tsükliine. SCF kompleks tunneb ära Cln1-3 ning Clb6 tsükliine, APC/C Clb1-5 tsükliine, saates nad proteosoomi lagundamisse (joonis 8) (Bloom ja Cross, 2007).



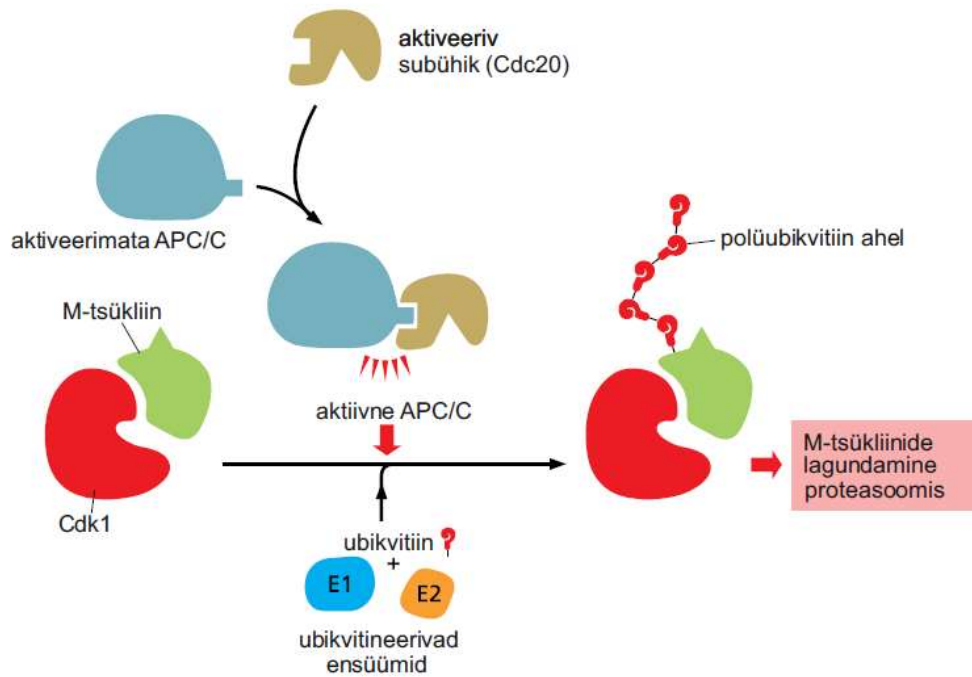
Joonis 8. SCF^{Grr1} suunab lagundamisesse Cln1 ja Cln2 tsükliinid, SCF^{Cdc4} Clb6 tsükliini ning mõlemad kompleksid suudavad lagundamisesse saata Cln3 tsükliini. Ülejäänud Clb1-5 tsükliine tunneb ära APC/C kompleks (kohandatud Bloom ja Cross, 2007).

SCF kompleks koosneb kolmest osast: Skp1, Cullin-1 ja F-boxi valgust. Skp1 seondub Cdc4-s oleva F-boxi motiiviga. F-boxi valgud jagunevad kahte peamisesse klassi: WD-40 kordusi sisaldavad valgud nagu Cdc4 ning leutsiini-rikkad kordusjärjestused nagu Skp2 ja Grr1. Sic1 valgu lagundamisel koosneb täpsem kompleks Skp1, Cdc53 ja Cdc4 valkudest ehk SCF^{Cdc4} ning E2 ensüümina osaleb Cdc34. On näidatud, et S-faasi sisenemiseks on oluline SKP1, CDC53 ja CDC4 geenide ekspressioon ning kompleksi poolt toimuv Sic1 valgu lagundamine (joonis 9) (Skowyra et al., 1997). SCF^{Cdc4} tunneb ära Clb6 tsükliine, SCF^{Grr1} Cln1 ja Cln2 tsükliine ning Cln3 tunnevad ära mõlemad kompleksid (Landry et al., 2012).



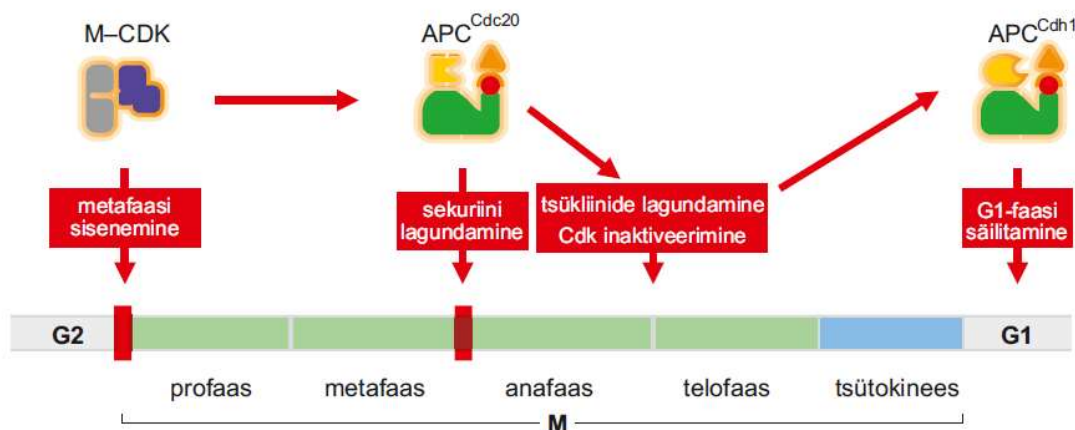
Joonis 9. CKI-sid, nagu näiteks Sic1 ja Far1 fosforüülib Cdk1 kinaas. Fosforüülitud valku tunneb ära SCF kompleksis olev F-boxi valk, mis koostöös E1 ning E2 ubikvitineerivate ensüümidega ubikvitineerib CKI ning valk saadetakse lagundamisesse proteosoomi (kohandatud Alberts, 2015).

APC/C on samuti mitmest subühikust koosnev ubikvitiinligaas, mille eesmärgiks rakutsüklis on mitootiliste tsükliinide lagundamine ning sõsarkromatiidide eraldamine (Ciosk et al., 1998). Pagaripärmi APC/C kompleksis arvatakse olevat vähemalt 12 subühikut. Kompleks vajab aktiveerivat subühikut, näiteks Cdc20 või Cdh1. Ka need subühikud sisaldavad WD-40 kordusi nagu SCF kompleksi Cdc4 valk. Cdc20 on oluline sõsarkromatiidide lahknemist takistava sekuriini lagundamiseks. Mitootiliste Cdk1 komplekside tase stimuleerib kompleksi aktiivsust ning sõsarkromatiidide lahknemisel lagundatakse tsükliinid ning Cdk1 inaktiveeritakse (joonis 10) (Alberts, 2015; Irniger ja Nasmyth, 1997; Morgan, 2007, 1999).



Joonis 10. APC/C kompleksi aktiveerib aktiveeriv subühik, Cdc20 või Cdh1. M-tsükliinide lagundamise puhul aktiveerib Cdc20 APC/C kompleksi, mis tunneb ära M-faasi tsükliin-Cdk1 komplekse. Koos E1 ning E2 ensüümidega ubikvitineeritakse tsükliin ning saadetakse lagundamisesse (kohandatud Alberts, 2015).

APC/C^{Cdh1} on aktiivsus tõuseb anafaasi alguses ning kompleksi aktiveerimiseks on vajalik APC/C^{Cdc20} substraatide lagundamine. Kompleksi aktiivsus langeb S-faasi alguseks. APC/C^{Cdc20} on aktiivne G2-faasi lõpust G1-faasi alguseni (joonis 11). Cdc20 tunneb ära D-boxi ja ABBA motiive, Cdh1 nii D-boxi motiive kui KEN-boxi motiive. Spindli moodustumise kontrollpunkt kontrollib APC/C^{Cdc20} aktiivsust, spindli paiknemise kontrollpunktis reguleerib Cdc14 fosfataas APC/C^{Cdh1} kompleksi moodustumist läbi Cdh1 defosforüülimise (Castro et al., 2005; Irniger, 2002; Lu et al., 2015).



Joonis 11. Mitoosifaasi olulisteks kompleksideks on M-faasi tsükliin-Cdk1 kompleks ning kaks APC/C kompleksi, mis erinevad teineteisest aktiveeriva subühiku poolest. M-faasi tsükliin-Cdk1 komplekside eesmärgiks on raku metafaasi sisenemine ning kompleksid on aktiivsed alates G2-faasi lõpust. APC/C aktiveerivateks subühikuteks on Cdc20 ning Cdh1. Cdc20 on kompleksis aktiivne kogu mitoosi vältel, Cdh1 hilisest mitoosist S-faasi alguseni. APC/C^{Cdc20} kompleksi töö on lagundada sekuriin ning mitooti tsükliinid ja inaktiveerida Cdk1. APC/C^{Cdh1} lagundab APC/C^{Cdc20} komplekse ning S-faasi tsükliinid ja aitab rakul püsida G1-faasis (kohandatud Morgan, 2007).

APC/C tunneb töös kasutatava Clb5 N-terminuses ära erinevaid motiive, näiteks D-boxi, KEN boxi ning ABBA motiivi. D-boxi minimaalne konsensusmotiiv on RxxL, täielik konsensusmotiivi järjestus on RxxLxxxx[N/D/E], on APC/C^{Cdc20} ja APC/C^{Cdh1} substraadiks, kus R on arginiin, x suvaline aminohape, N on asparagiin, D aspartaat ning E glutamaat (King et al., 1996). KEN box koosneb lüsiinist, glutamaadist ning asparagiinist ning on APC/C^{Cdh1} substraat (Pfleger ja Kirschner, 2000). ABBA motiiv Clb5-s on APC/C^{Cdc20} substraat, mille konsensusmotiiv on FX[I/L/V][F/H/Y]X[D/E], kus F on fenüülalaniin, X suvaline aminohape, I on isoleutsiin, L on leutsiin, V on valiin, H on histidiin, Y on türosiin, D on aspartaat ning E on glutamaat (Di Fiore et al., 2015; Lu et al., 2015). Cdc20 sisaldab ka ise KEN-boxi, mis teeb ta Cdh1-le substraadiks (Pfleger ja Kirschner, 2000).

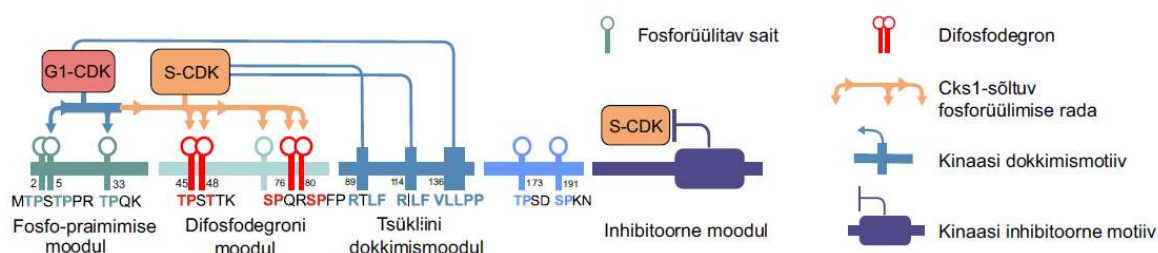
1.6. Valkude degradatsioon fosfodegronite abil

Degronid ehk degradatsiooni signaalid on lühikesed järjestusmotiivid valkudes, mida tunnevad ära ubikvitiinligaasid. Degronite abil on võimalik valkude eluiga *in vivo* lühemaks teha (Varshavsky, 1991, 2019). Degroneid sisaldavad sünteetilised süsteemid aitavad kontrollida

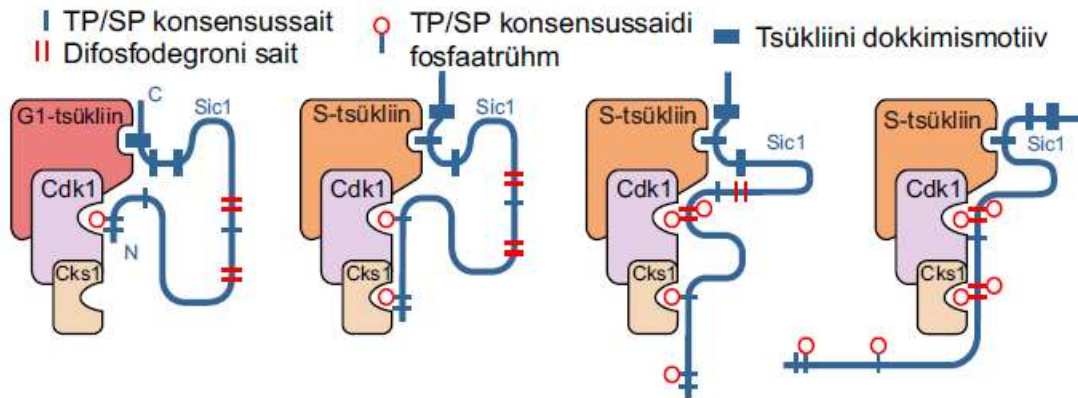
valguekspressiooni, reguleerides erineva tasemega valkude lagundamise profiile (Chassin et al., 2019).

Fosfodegiron on lühike lineaarne motiiv, mida aktiveeritakse ühe või enama fosfaatrühma lisamisega ning mida tunneb ära SCF^{Cdc4} kompleks (Holt, 2012). Difosfodegironid koosnevad kahest 2-3 aminohappe kaugusel olevast fosforüülitud saidist (Valk et al., 2014).

Sic1 valgus on avastatud kaks difosfodegironit, mis asuvad positsioonides Thr45 ja Thr48 ning Ser76 ja Ser80, mida fosforüülivad S-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid (joonis 12). Sic1 puhul algab multifosforüülimine G1-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksidega N-terminaalsetest Thr2, Thr5 ning Thr33 saitidest (joonis 13) (Kõivomägi et al., 2013).



Joonis 12. Joonisel on toodud Sic1 regulatsiooni olulisemad aminohappejärjestused ning protsessid. Sic1 lagundamisesse suunamine toimub multifosforüülimise teel, kus osalevad G1-faasi ning S-faasi tsükliinid. Cdk1 tunneb ära Sic1 valgul 10 Cdk1-siduvat motiivi, mille minimaalmotiiviks on S/TP. Protsessi vahendab Cks1, mis seob fosforüülitud treoniine. Samuti on olulised tsükliinspetsiifilised dokkimismotiivid, mida tunnevad ära erinevate faaside tsükliinid, nagu RxL ning LP motiiv. C-terminaalselt paiknev inhibitoorne moodul inhibeerib S-faasi tsükliin-Cdk1 komplekside aktiivsust (kohandatud Venta et al., 2020)



Joonis 13. Sic1 multifosforüülimine toimub läbi tsükliin-Cdk1-Cks1 komplekside. Joonisel on toodud Sic1 N-terminaalne osa ehk 215 esimest aminohapet, kust on eemaldatud C-terminaalne inhibitoorne domeen. Skeemil on toodud teadaolevad spetsiifilised seondumismotiivid selles regioonis, mida tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleksid ära tunnevad ning fosforüülivad (kohandatud Venta et al., 2020)

Far1 valgus on samuti leitud difosfodegron, mille seriinid asuvad positsioonides 87 ning 91, mida eraldavad proliinid (Henchoz et al., 1997; Valk et al., 2013). Kuigi Ser91 pole klassikaline konsensusmotiiv, kuna seriinile ei järgne proliini, aitab Clb5-l olev seondumismotiiv saiti fosforüüvida (Valk et al., 2013).

1.7. Sünteetilised ostsillaatorid

Ostsillatsioon on levinud erinevates bioloogilistes süsteemides. Tuntumate ostsillatsiooni protsesside alla kuuluvad näiteks kaltsiumilained, pärmil glükolüüs, ööpäevane rütm taimede puhul ning rakutsükkel. Metaboliitsete ostsillaatorite puhul sõltub ostsillatsioon näiteks erinevatest süsinikuallikatest (Patnaik, 2003).

Ostsillaatorid on alati millestki sõltuvad, mistõttu on võimalik neid reguleerida. Muutes rakus juba eksisteerivaid omavahelisi suhteid, on võimalik kontrollida ka neist sõltuvat ostsillatsiooni. Rakutsükli puhul on seega eesmärgiks muuta rakutsükli kontrollelemente. Kuna rakutsükli regulatsioonil on suur roll ka fosforüülimisel ning erinevatel seondumismotiividel, annab neid kasutada ka ostsilleerumise esilekutsumisel (Yang ja Ferrell, 2013).

Ostsilleerumise reguleerimisel on oluline roll positiivsel ja negatiivsel tagasisidel, reaktsioonide kineetika, ajalise komponendi ning valkude ekspressiooni mõjutamisel. Sünteetilise bioloogia abil on võimalik luua uue funktsionaalsusega kontrollitavaid transkriptsiooni ning translatsiooni reguleerivaid mooduleid, mille abil on võimalik reguleerida

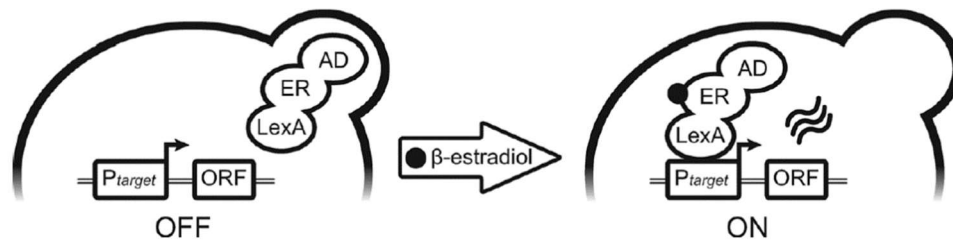
valkude ekspressiooni rakus, samuti kontrollida ajaliselt ekspresseerumist läbi faasispetsiifiliste seondumismotiivide lisamise (Novák ja Tyson, 2008).

Tsükliinide, Cdk1, Cks1 ning substraatide spetsiifilised seondumismotiivid loovad võimaluse fosforüülimise abil luua soovitud lüliteid, mida kasutada rakutsükli ostsillatsiooni robustsuse tõstmiseks (Kõivomägi ja Loog, 2011). Muutes seondumismotiive, on võimalik kontrollida ka erinevaid tasemeid valkude lagundamisel. Nõrgalt seonduvaid või mitte-seonduvaid valke on kehvem SCF ning APC/C kompleksidel lagundada, kuna äratundmismehhanismid ei tööta ning substraate ei saadeta lagundamisesse täisefektiivsusega (Yang ja Ferrell, 2013). Ubikvitiini lisamine sensorina sihtmärkvalgu külge võimaldab jälgida valgu taset rakus (Chassin et al., 2019).

1.8. Sünteetilised transkriptsioonifaktorid

Transkriptsiooni kontrollimine on samuti üks võimalusi ostsillaatorite loomisel. Sünteetilised transkriptsioonifaktorid on raku transkriptsioonisüsteemiga ortogonaalsed ehk ei häiri teiste transkriptsioonifaktorite tööd. Samuti on võimalik tagada sünteetiliste transkriptsioonifaktorite disainimisel suurem spetsiifilisus sihtmärkvalgu ekspressiooniks, reguleerides seondumist DNA ahelaga. Sünteetiliste süsteemide loomine annab võimaluse kasutada seondumisafiinsust, promooteri disaini ning valk-valk interaktsioone soovitud geenide ekspressiooni reguleerimiseks ülejäänud raku mehhanismidest sõltumatult. Sünteetiliste transkriptsioonisüsteemide kasutamine aitab potentsiaalselt luua rakkudes uusi ning sõltumatu regulatsiooniga tootmisradu ning reguleerida olemasolevaid valke, mida kasutada näiteks biosensorite või rakuvabrikute loomisel (Khalil et al., 2012).

Transkriptsiooni kontrollimiseks pagaripärmis on loodud ka östradiooliga indutseeritav sünteetiline transkriptsioonifaktor. β -östradioli induktorina kasutatav sünteetiline transkriptsioonifaktor LexA-ER-AD ehk LexA-TF koosneb bakteriaalsest LexA DNA-d siduvast valgust, inimese östrogeeni retseptorist ning aktiveerivast domeenist (joonis 14). Promooterina kasutatakse lexA boxidest koosnevaid süsteeme, mille tugevust on võimalik reguleerida boxide lisamise ning eemaldamisega. Erinevalt varasemalt loodud β -östradiooliga indutseeritavatest süsteemidest pole antud süsteem rakkudele toksiline, kuna seondumisel kasutatakse inimese östrogeeni retseptorit (Ottoz et al., 2014).



Joonis 14. β -östradioli lisamine keskkonda põhjustab seondumise ER ehk inimese östrogeeni retseptoriga transkriptsioonifaktoris. See aktiveerib transkriptsioonifaktori, mis seondub promooterile, aktiveerides geeniekspressiooni (Ottoz et al., 2014).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö praktilise osa eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on luua erinevate ostsillatsioonimustritega sünteetilisi transkriptsioonifaktoreid, mis kasutavad rakutsüklist sõltuvaid degroneid ning tsükliin-spetsiifilisi ning APC/C spetsiifilisi seondumismotiive, mis liidetakse LexA transkriptsioonifaktori N-terminusse. Samuti on vaja luua testsüsteem degradatsiooniprofiilide jälgimiseks rakkudes *in vivo*. Transkriptsioonifaktorite kaudse taseme mõõtmiseks jälgitakse transkriptsioonifaktorite kontrollitava ubikvitiin-eGFP (i.k. *eukaryotic green fluorescent protein*) kompleksi ekspressioonitaset fluorestsentsmikroskoopia abil.

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Degronite disain

Degronite disainimisel lähtuti laboris varasemalt konstrueeritud ning avaldatud motiividest ning rakutsükli erinevatele faasidele spetsiifiliste mutantide loomisest. Töös kasutati erinevaid kombinatsioone Sic1 ning Far1+Clb5 valkude mutantidest.

2.2.1.1. Sic1

Sic1 tüvede puhul kasutati kahte erineva pikkusega fragmenti: 1-215 aminohapet ning 1-117 aminohapet.

2.2.1.1.1. Sic1[1-215]

Sic1[1-215] tüvede disainimisel lähtuti Mihkel Ördi teadustöös (Örd et al., 2019a) avaldatud loodud mutantidest. Sic1[1-215] mutandil puudub inhibitoorne C-terminaalne domeen, ent sisaldab nelja tsükliini-siduvat motiivi (Hodge ja Mendenhall, 1999). Disainimiseks valiti neli erinevat fragmenti: metsiktüüpi degron (wt),alaniinimutatsioonidega degron (AP), T5S T33S Cks1 dokkimismotiivide fragment, mille tsükliini seondumismotiivid RxL olid muudetud AxA-deks (T5S T33S) ning T33 positsiooni järele neli aminohapet lisatud ning LxF seondumismotiive sisaldav fragment (T33(+4) + LxF). Järjestused on toodud LISAS 2.

2.2.1.1.2. Sic1[1-117]

Sic1[1-117] tüvede loomiseks eemaldati lisaks inhibitoorsele C-terminaalsele domeenile lisaks aminohapped alates kolmandast tsükliini-siduvast motiivist. Fragmentid loodi Sic1[1-215] fragmentide põhjal: metsiktüüpi degroni (wt),alaniinimutatsioonidega degroni (AP), T5S T33S koos AxA motiividega (T5S T33S) ning T33(+4) mutant, kus teine seondumismotiiv on LxF, ent kolmas RxL (T33(+4) + LxF2 RxL3). Järjestused on toodud LISAS 2.

2.2.1.1.3. Far1+Clb5

Far1+Clb5 mutantide puhul kasutati erinevaid kombinatsioone metsiktüübi ja alaniini mutantidest. Muteeritavateks piirkondadeks olid Far1 degron positsioonis 87-91 aminohape, milles muteeruti alaniini mutandi saamiseks S87 ning S91 positsioonis aminohapped alaniinideks. Clb5 puhul asuvad D-box ja ABBA motiiv positsioonides 56-62 ning 99-105. D-boxis muteeriti alaniini mutandi saamiseks positsioonid R56 ning L59 alaniinideks ning ABBA motiivis K99, R100 ning Y103 alaniinideks (LISA 2).

2.2.1.1.4. Far1[1-393] + Clb5[1-133] kombinatsioonid

Far1[1-393]+Clb5[1-133] kombinatsioone loodi töös neli: topelt-metsiktüüpi konstruktsioon (wt+wt), Far1 degroni alaniinimutandi konstruktsioon, kus Clb5 ei muteeritud (AP+wt), Clb5 D-boxi ning ABBA motiivi konstruktsioon, kus Far1 ei muteeritud (wt+Ala) ning topelt-alaniinimutandi konstruktsioon, kus muteeriti Far1 degron ning Clb5 D-box ja ABBA motiiv (AP+Ala).

2.2.1.1.5. Far1[1-150] + Clb5[1-133] kombinatsioonid

Far1[1-150]+Clb5[1-133] kombinatsioone loodi töös samuti neli: topelt-metsiktüüpi konstruktsioon (wt+wt), Far1 degroni alaniinimutandi konstruktsioon, kus Clb5 ei muteeritud (AP+wt), Clb5 D-boxi ning ABBA motiivi konstruktsioon, kus Far1 ei muteeritud (wt+Ala) ning topelt-alaniinimutandi konstruktsioon, kus muteeriti Far1 degron ning Clb5 D-box ja ABBA motiiv (AP+Ala).

2.2.2. Kasutatud plasmiidid, tüved, söötmed, lahused

Östradioliga indutseeritav LexA transkriptsioonifaktor saadi plasmiidist FRP880_PACT1(-1-520)-LexA-ER-haB112-TCYC1 (plasmiidikaart 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 Kait Kaarel Pussi ja Ervin Valgu 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 I [5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 mM EDTA, 100 mM liitiumatsetaat], lahus II [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 bar1:HISG (leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15) (phi+), David O.Morgan'i labor, California Ülikool].

Pärmikultuure kasvatati YPD (i.k. *yeast extract-peptone-dextrose*) vedelsöötmes [10 g/l pärmiekstrakti (Formedium), 20 g/l peptooni (Formedium), 20 g/l glükoosi (Fischer Scientific)] ning defineeritud koostisega sünteetilisi CSM (i.k. *complete supplement mixture*) ning selektiivsöötmeid, mis olid pärit firmast Formedium.

2.2.3. Fluorestsentsmarkeritega pärmitüve konstrueerimine

2.2.3.1. PCR

PCR segu koostis: 10 ng DNA template'i pNC1124 (UBI-Y-dK-GFP*) (Houser et al., 2012), 0,3 µM pärisuuna praimer, 0,3 µM vastassuuna praimer, 1x HF puhver, 250 µM dNTP segu, 1 ühik Phusion DNA polümeraasi, ddH₂O kuni 50 µl. Kasutati *Aeris Esco Thermal Cycler* termotsüklerit järgneva programmiga.

Tabel 1. Termotsükkleri programm pLexA–ubikvitiin-eGFP fragmendi amplifitseerimiseks

Temperatuur	Aeg
98°C	20 sek
98°C	10 sek
50°C	10 sek
72°C	30 sek
72°C	5 min
15°C	∞

Tsükliit korratakse 35 korda

Pärisuuna praimerina kasutati fragmendi puhul UBI4-BcuI-F praimerit, mille järjestus on LISA 1 all. Vastassuuna praimerina kasutati fragmendi puhul GFP-XhoI-R praimerit, mis on samuti LISAS 1.

Saadud fragmendi kontrollimiseks lisati PCR segule 6x DNA laadimisvärvi (Thermo Fischer) foreesivärvina, viies foreesivärvi lõppkontsentratsioon 1x-ni ning produktide lahutamiseks kasutati geelelektroforeesil Atlas ClearSight DNA Staini (Bioatlas) sisaldavat (0,5 mg/ml) 1%

geeli 1x TAE puhvris. Produktide sobivust kontrolliti UV valgusega 254 nm lainepikkusel ning õige suurusega fragment lõigati välja ning puhastati *FavorPrep GEL/PCR Purification Kit* abil vastavalt tootjapoolsetele juhistele.

2.2.3.2. Restriksioon

Restriksioonides on kasutatud Thermo Scientific Fast Digest restriктаase. Restriksioonisegusse võeti 40 µl geelist puhastatud PCR produkti, 0,5 µl BcuI FastDigest restriктаasi, 0,5 µl XhoI FastDigest restriктаasi, 4,6 µl 10x FastDigest Green puhvrit ja ddH₂O mahuni 46 µl.

Vektori saamiseks lõigati LexA promooterit(koosneb neljast lexA boxist), ubikvitiini, N-degronit ning ebastabiilset GFP fluorofoori sisaldavat plasmidi FRP793 (Ottoz et al., 2014) samuti BcuI ja XhoI restriктаasidega, segusse võeti 2 µl plasmidi, 0,5 µl kumbagi restriктаasi, 2 µl 10x FastDigest Green puhvrit ja ddH₂O mahuni 20 µl.

Reaktsioonisegusid inkubeeriti 30 min temperatuuril 37 °C. Restriksioonis saadud produktid lahutati geelelektroforeesiga ja puhastati eespool kirjeldatud viisil.

2.2.3.3. Ligatsioon

Lõigatud PCR produktid lüüsi LexA promooterit sisaldava plasmiidiga 1:1 molaarses 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 ddH₂O. Ligatsioonireaktsioone inkubeeriti toatemperatuuril 1 tund.

2.2.3.4. 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 45 sekundit. Seejärel inkubeeriti segu taas 2 minutit jääl. Segule lisati 500 µl LB (Luria Bertani) söödet ning saadud segu inkubeeriti 50 minutit 37°C loksutil. Inkubatsioonijärgselt tsentrifugeeriti rakukultuur alla 2 minuti jooksul 6000 pöörat minutit juures. Eemaldati 400 µl supernatanti, allesjäänud segu suspendeeriti ühtlustamiseks ning külvati karbenitsilliin (Fisher Scientific, sisaldus 100 µg/ml) selektiivsusega LB agariga Petri tassile. Tasse inkubeeriti üleöö 37°C juures.

2.2.3.5. Plasmiidide eraldamine *E. coli* DH5α rakkudest

Plasmiidide eraldamiseks DH5α rakkudest pandi kolooniatest võetud rakud kasvama 5 ml LB vedelsöötmesse, kuhu on lisatud 100 µg/ml kohta karbenitsilliini (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).

2.2.3.6. Selektiivsusmarkeri välja vahetamine

FRP793-s sisalduva URA3 selektiivsusmarkeri välja vahetamiseks oli vajalik kloneerimine pRS304 vektorisse (TRP1). Promooter ubikvitiini, N-degroni ning ebastabiilse GFP fluorofooriga lõigati eelnevalt saadud plasmiidist (2.2.3.5.) välja NotI ja KpnI restriiktaaside abil. Samu restriiktaase kasutati ka pRS304 plasmidi puhul eelpool toodud protokolliga järgides, mahuga 20 µl.

Saadud produktid eraldati geelelektroforeesil, puhastati ning ligeeriti 1:1 molaarses suhtes eelnevalt toodud protokolliga alusel.

Transformatsioon *E. coli* DH5α rakkudesse ning plasmidi puhastamine toimusid eelpool kirjeldatud viisil.

2.2.3.7. Restriksioon pärmi transformeerimiseks

Pärmi transformeerimiseks lõigati plasmidi (2.2.3.6) lineariseerimiseks HindIII (Thermo Scientific Fast Digest) restriiktaasiga, et neid homoloogilise rekombinatsiooni abil pärmi genoomi integreerida. Reaktsioonisegusse võeti 1 µg plasmidi, 0,5 µl HindIII restriiktaasi, 2 µl 10x FastDigest puhvrit ning ddH₂O mahuni 20 µl.

2.2.3.8. Pärmi transformeerimine

Pärmitüve DOM0090 kasvatati üleöö YPD vedelsöötmes kuni optiline tihedus oli OD₆₀₀ (i.k. *optical density*) = 0,6. Pärmirakkude kogumiseks tsentrifuugiti segu 3500 pööret/minutis juures 1 minut ning võeti üles 1 ml ddH₂O. Vesilahuses rakud tsentrifuugiti uuesti samade parameetrite juures ning eemaldati tekkinud supernatant. Rakke pesti läbi kaks korda lahusega I (koostis toodud üleval), vahepeal rakke tsentrifuugides vastavalt varasemalt kirjeldatud parameetritele ning supernatanti eraldades. Saadud rakusademele lisati kahekordses sademe mahus I PL lahust ning inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Samal ajal kuumutati 10 minutit 100°C juures *Salmon Sperm* DNAd (ssDNA, Sigma) ning peale kuumutamist hoiti jääl. Transformatsiooniks segati kokku 10 µl restriksioonisegu (2.2.3.7.), 10 µl ssDNAd ja 100 µl pärmirakke. Lisati ka 700 µl lahust II ning 48 µl DMSO (dimetüülsulfoksiid) lahust. Saadud transformatsioonisegu inkubeeriti 40 minutit 42°C termoblokis. Peale inkubatsiooni hoiti segu kaks minutit jääl ning tsentrifuugiti 6000 pööret/minutis 30 sekundit. Tsentrifugimise 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 histidiini selektiivsusega tardsöötmega plaadile klaaskuulide abil. Plaate inkubeeriti 30°C juures kolooniate tekkimiseni 2-3 päeva.

2.2.3.9. Cdk1 sensori transformatsioon

Cdk1 sensorit sisaldava plasmidi pMO363(saadud Mihkel Ördi käest) ja pRS306 lõikamiseks kasutati KpnI ja SacI restriktase eelnevat protokollit järgides, mahuga 20 µl.

Saadud produktid eraldati geelelektroforeesil, puhastati ning ligeeriti 1:1 molaarses suhtes eelnevalt toodud protokollit alusel.

Transformatsioon *E. coli* DH5α rakkudesse ning plasmidi puhastamine toimusid eelpool kirjeldatud viisil.

2.2.3.10. Pärimi transformeerimine

Transformeerimiseks lineariseeriti punktis 2.2.3.9. valmistatud Cdk1 sensorit ning mCherry fluorofoori sisaldavat plasmidi ApaI restriktasiga eelnevat protokollit järgides, mahuga 20 µl.

Lineariseeritud plasmid transformeeriti punktis 2.2.3.8. valmistatud pärmitüvesse, mis sisaldas LexA promooterit, ubikvitiini, N-degronit ning ebastabiilset GFP fluorofoori.

2.2.4. PCR Sic1 degroni amplifitseerimiseks

PCR-ide alusmaterjal pärines Mihkel Ördi käest saadud plasmidist DNA-st, mis on avaldatud varasemalt teadusartiklina (Örd et al., 2019a) ning aminohappe järjestused motiivide puhul on toodud LISA 2 all.

PCR segu koostis: 10 ng plasmidist DNA-d, 0,3 µM pärisuuna praimer, 0,3 µM vastassuuna praimer, 1x HF puhver, 250 µM dNTP segu, 1 ühik Phusion DNA polümeraasi, ddH₂O kuni 50 µl. Kasutati *Aeris Esco Thermal Cycler* termotsüklerit järgneva programmiga.

Tabel 2. Termotsükkleri programm Sic1 fragmentide amplifitseerimiseks

Fragment	1-215	1-117
Temperatuur	Aeg	
98°C	20 sek	
98°C	10 sek	
60°C	10 sek	
72°C	20 sek	11 sek
72°C	5 min	
15°C	∞	

Tsüklit korratakse 35 korda

Pärisuuna praimerina kasutati fragmentide puhul link-Sic1TP-F või link-Sic1SP-F praimerit, sõltuvalt Sic1 viiendas positsioonis olevast aminohapest, mille järjestus on LISA 1 all. Vastassuuna praimerina kasutati pikema 1-215 fragmendi puhul Sic1dC-XhoI-R praimerit ning lühema 1-117 fragmendi puhul Sic1-RxL3-XhoI-R praimerit, mis on samuti LISAS 1.

PCR-i produkte kontrolliti ning puhastati eelpool kirjeldatud viisil.

2.2.5. PCR Far1 degroni amplifitseerimiseks

PCR-ide alusmaterjal täispika metsiktüüpi ning fosfodegronialaniinimutandi Far1 ja 1-150 metsiktüüpi fragmendi amplifitseerimiseks pärinesid Ervin Valgu loodud plasmiidest DNA-st, mille põhjal loodi kolme erineva pikkusega Far1 fragmendid, kõigist nii fosfodegroni metsiktüüpi fragment kui fosfodegronialaniini mutatsioonidega fragment.

PCR-i segus olid suhted samad eelpool mainitud koostisega.

Tabel 3. Termotsükkleri programm Far1 fragmentide amplifitseerimiseks

Fragment	1-393	1-150
Temperatuur	Aeg	
98°C	20 sek	
98°C	10 sek	
60°C	10 sek	
72°C	36 sek	12 sek
72°C	5 min	
15°C	∞	

Tsüklit korratakse 35 korda

Pärisuuna praimerina kasutati fragmentide puhul Far1-SmaI-F praimerit, mille järjestus on LISA 1 all. Vastassuuna praimerina kasutati pikema 1-393 fragmendi puhul Far1[1-393]-R praimerit ning lühema 1-150 fragmendi puhul Far1_150_GA-EcoRI-R praimerit, mis on samuti LISAS 1.

PCR-i produkte kontrolliti ning puhastati eelpool kirjeldatud viisil.

2.2.6. PCR Clb5 tsükliini amplifitseerimiseks

PCR-ide alusmaterjal Clb5 tsükliini metsiktüüpi fragmendi amplifitseerimiseks pärines Ervin Valgu loodud plasmiidsest DNA-st ning alusmaterjal fosfodegronialaniinimutandi loomiseks Nele Kuusma loodud plasmiidsest DNA-st.

PCR-i segus olid suhted samad eelpool mainitud koostisega.

Tabel 4. Termotsükleri programm Clb5 fragmentide amplifitseerimiseks

Temperatuur	Aeg
98°C	20 sek
98°C	10 sek
50°C	10 sek
72°C	12 sek
72°C	5 min
15°C	∞

Tsüklit korratakse 35 korda

Pärisuuna praimerina kasutati mutantide puhul Far1[1-393]+Clb5[1-133]overlap_F praimerit ning vastassuuna praimerina Clb5-SalI-GA-R praimerit, mille järjestused on LISAS 1.

PCR-i produkte kontrolliti ning puhastati eelpool kirjeldatud viisil.

2.2.7. PCR Far1+Clb5 kokkuliitmiseks

Kokkuliitmise PCR-i algmaterjal pärines punktides 2.2.5 ning 2.2.6 valmistatud puhastatud PCR-i produktidest.

PCR segu koostis: 10 ng DNA-d Far1 fragmendiga, 10 ng DNA-d Clb5 fragmendiga, 0,3 µM pärisuuna praimer, 0,3 µM vastassuuna praimer, 1x HF puhver, 250 µM dNTP segu, 1 ühik Phusion DNA polümeraasi, ddH₂O kuni 50 µl.

Pärisuuna praimerina kasutati mutantide puhul Far1-SmaI-F praimerit ning vastassuuna praimerina Clb5-SalI-GA-R praimerit, mille järjestused on LISAS 1.

PCR-i produkte kontrolliti ning puhastati eelpool kirjeldatud viisil.

Tabel 5. Termotsükleri programm Far1 ning Clb5 fragmentide kokkuliitmiseks

Fragmendid	Far1[1-393]+Clb5	Far1[1-150]+Clb5
Temperatuur	Aeg	
98°C	30 sek	
50°C	30 sek	
72°C	5 min	
Oligonukleotiidide lisamine		
98°C	10 sek	
60°C	10 sek	
72°C	48 sek	30 sek
72°C	5 min	
15°C	∞	

Tsükliit korraldatakse 35 korda

2.2.8. Insertide klonerimine transkriptsioonifaktoriga plasmidi

Puhastatud PCR produkte ning transkriptsioonifaktoriga plasmidi FRP880 (Ottoz et al., 2014) lõigati SmaI ning EcoRI restriктаasidega eelnevat protokolliga järgides, mahuga vastavalt 46 µl ja 20 µl.

Saadud produktid eraldati geelelektroforeesil, puhastati ning ligeeriti transkriptsioonifaktoriga plasmidi 1:1 molaarses suhtes eelnevalt toodud protokolliga alusel.

Transformatsioon *E. coli* DH5α rakkudesse ning plasmidi puhastamine toimusid eelpool kirjeldatud viisil.

2.2.9. Transformatsioon pärmi

Transformeerimiseks lineariseeriti punktis 2.2.8. valmistatud inserti ning LexA transkriptsioonifaktorit sisaldavat plasmidi NheI restriктаasiga eelnevat protokolliga järgides, mahuga 20 µl.

Lineariseeritud plasmid transformeeriti punktis 2.2.3.10. valmistatud pärmitüvesse, mis sisaldas LexA promootorit, ubikvitiini, N-degronit ja ebastabiilset GFP fluorofoori ning Cdk1 sensorit ja mCherry fluorofoori.

2.2.10. FACS

Rakud kasvasid 12 h 200 µl mahus 2% glükoosiga CSM söötmes 30°C juures plaadiväristajal (850 RPM) 96 kambriga plaadil, kuni $OD_{600}=0,5$. Kõik kultuurid jagati kaheks uuele 96 kambriga plaadile mahus 100 µl kontroll ning 90 µl indutseeritavad kultuurid. Indutseeritavatele rakkudele lisati 100 nM östradiooli lahus, mahuga 10 µl, viies lõppmahu 100 µl-ni. Mõõtmist alustati 2 h peale indutsiooni.

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 10 000 rakuni 100 µl mahus, lugedes kiirusega 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.

FACS analüüsil oli võimalik kontrollida transformatsioonil saadud kolooniaid. Positiivsete kolooniate puhul tõusis östradiooli lisamisel eGFP tase rakkudes võrreldes sama tüve indutseerimata kontrolliga. Rakkudes olev mCherry fluorestsentsi olemasolu oli vajalik sensori olemasolu jälgimiseks.

2.2.11. Mikroskoopia

Katses kasutatud rakud kasvasid 12h 3 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* ultraheligeneraatoriga. Katseklaasile pipeteeriti 0,5 µl rakukultuurist ning asetati peale eelnevalt valmistatud 1,5% agarosgeel, mis oli kontrolliks. Katses kasutati ubikvitiin-eGFP kompleksi indutseerimiseks 10 nM östradiooliga (Sigma) 1,5% agarosgeeli, mis asetati katseklaasile samadest rakukultuuridest teise 0,5 µl kultuuri peale. Proovid suleti õhukindlatesse kambritesse.

Katses kasutati *Zeiss Axio Observer Z1* mikroskoopi vastavalt tootjapoolsetele juhistele. Faaskontrasti ning eGFP (i.k *green fluorescent protein*) kanalis mõõdeti rakke 15 ms jooksul, mCherry kanalis 750 ms jooksul. Rakke pildistati iga kolme minuti tagant 8h vältel.

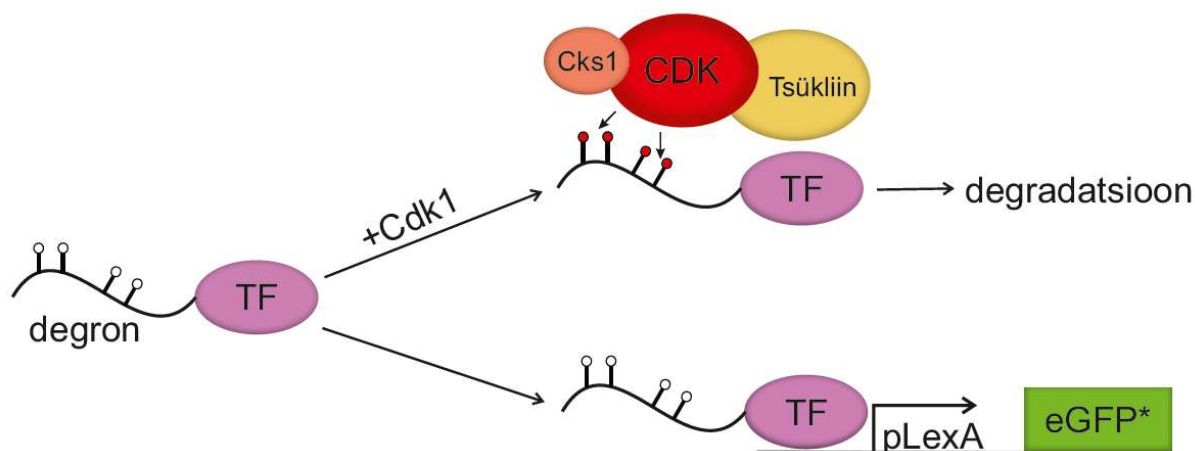
Eksperimendi jooksul salvestatud pilte analüüsiti programmiga MatLab (MathWorks) ja sellisele analüüsile spetsiaalse alamprogrammi (Doncic et al., 2013) abil.

2.3. TULEMUSED JA ARUTELU

2.3.1. Sünteetiliselt transkriptsioonifaktoreid sisaldavate pärmitüvede disainimine ja testimine

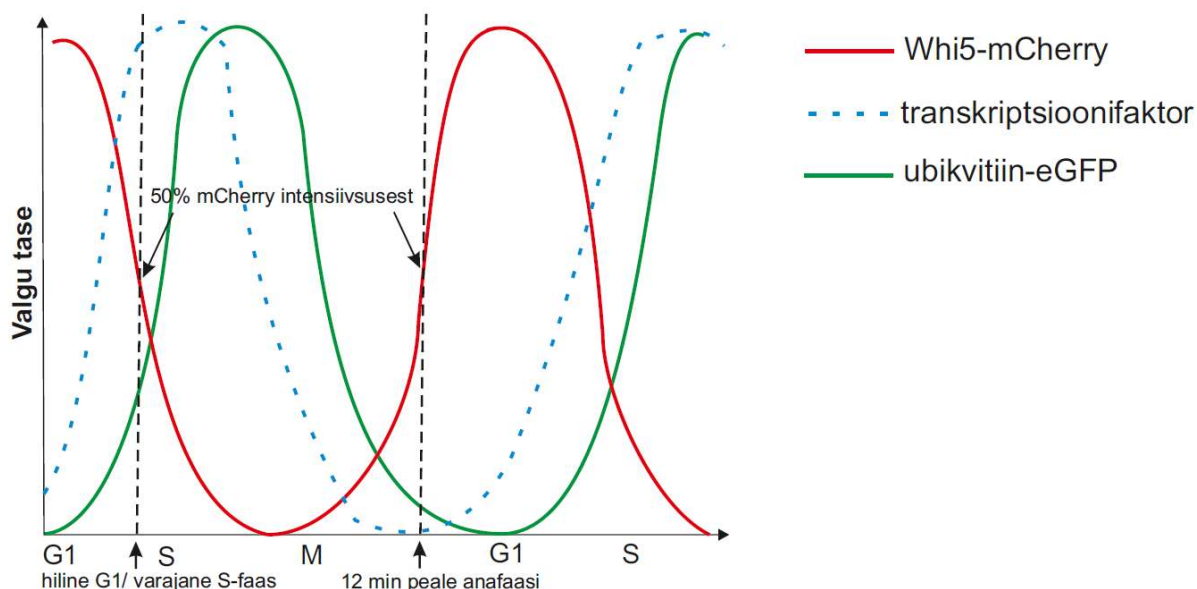
Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli luua erinevate ostsillatsioonimustritega sünteetiliselt transkriptsioonifaktoreid, kasutades selleks rakutsüklilist sõltuvaid degroneid, mis olid lisatud östradioli poolt aktiveeritava LexA transkriptsioonifaktori (TF) N-terminusse (joonis 17). Transkriptsioonifaktorite taset mõõdeti kaudselt nende poolt kontrollitava ubikvitiin-eGFP kompleksi ekspressioonitaseme abil fluorestsentsmikroskoopiaga.

Süsteemi algsel testimisel selgus, et eGFP valgustabiilsuse tõttu ei ole võimalik transkriptsioonifaktorite ostsilleerumist mõõta, kuna eGFP signaal ei muutunud rakutsüklilist sõltuvalt. Erinevatel andmetel varieerub eGFP poolestusaeg paarikümnest tunnist mõne päevani. Lahendusena vahetati eGFP välja ebastabiilse ubikvitiin-eGFP kompleksi vastu, mille poolestusaeg on ligikaudu 7 minutit (Houser et al., 2012).



Joonis 17. LexA transkriptsioonifaktori (TF) küljes olev degron fosforülitakse (tähistatud punaste ringidega) tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleksi poolt, mille tagajärjel degron-transkriptsioonifaktor kompleks lagundatakse. Kui tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleks transkriptsioonifaktori küljes olevaid fosforülitavaid degronisaite ega seondumismotiive ära ei tunne, seondub transkriptsioonifaktor östradioli promooteriga (pLexA), mis aktiveerib ebastabiilse eGFP ekspressiooni.

Mikroskoopia andmete analüüsimiseks oli vajalik rakkude sünkroniseerimine, milleks kasutati mCherryga märgistatud Cdk1 sensorit (joonis 18). Cdk1 sensor kujutab endast Whi5-mCherry kompleksi, mis sõltuvalt rakutsükli faasist liigub tuuma ja tsütoplasma vahel. Rakke sünkroniseeriti Cdk1 sensori tuuma sisenemise ning tuumast väljumise järgi, mis mikroskoopia andmetes väljendus vastavalt tuumas mCherry fluorestsentsi tekkimises ning kadumises.



Joonis 18. Töö seisukohast olulised ostsillatsioonid raku. Punasega on tähistatud Cdk1 sensori Whi5-mCherry signaali tase tuumas. Mustad punktiirjooned on rakutsükli faasides, kus mCherry tase tuumas on 50% oma maksimaalsest aktiivsusest ehk hilise G1-faasi või varajase S-faasi alguses (mCherry taseme langedes) või umbes 12 minutit peale raku anafaasi sisenemist (mCherry taseme kasvades). Sinise punktiirjoonega on toodud eeldatav rakutsüklist sõltuva transkriptsioonifaktori ostsilleerumine. Rohelise joonega on tähistatud transkriptsioonifaktori poolt reguleeritava ebastabiilse eGFP tase raku.

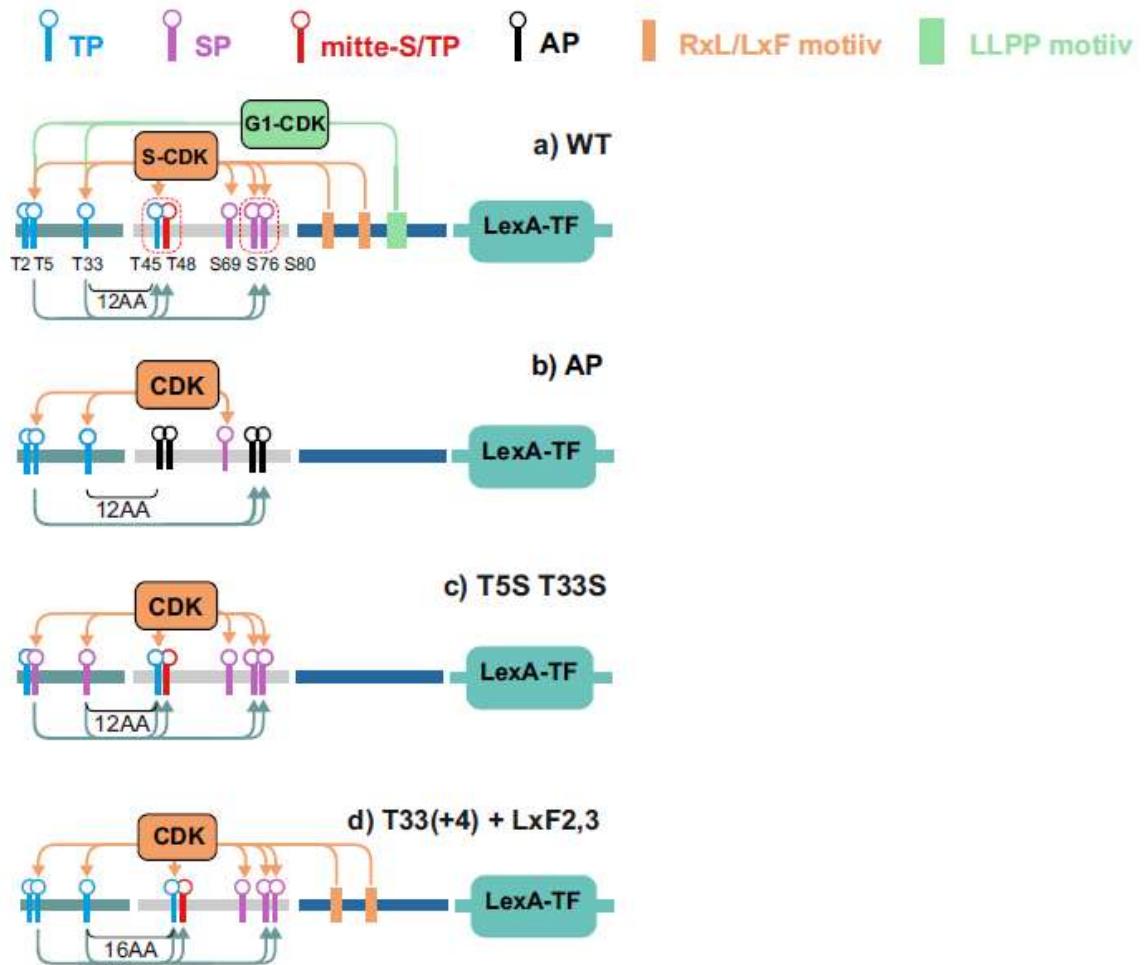
2.3.2. Ostsillaatorite disainimine

Fosfodegronite disainimisel lähtuti *S. cerevisiae* rakutsükli kontrollivate Cdk1 inhibiitorvalkudest Sic1 ning Far1.

Sic1 puhul pärinevad algsed degronid Mihkel Ördi artiklist (Örd et al., 2019a). Antud magistritöös on loodud kaks erineva pikkusega Sic1 baasil fragmenti, 215 ning 117 aminohapet, mis sisaldavad samu funktsionaalseid motiive. Järjestusest on eemaldatud Sic1 inhibitoorne domeen (Hodge ja Mendenhall, 1999). 1-117 fragmendi puhul on sisse jäetud neljast

dokkimismotiivist kolm, et luua võimalikult lühike valk süsteemi jaoks, mis sisaldaks sealjuures tähtsaid seondumismotiive.

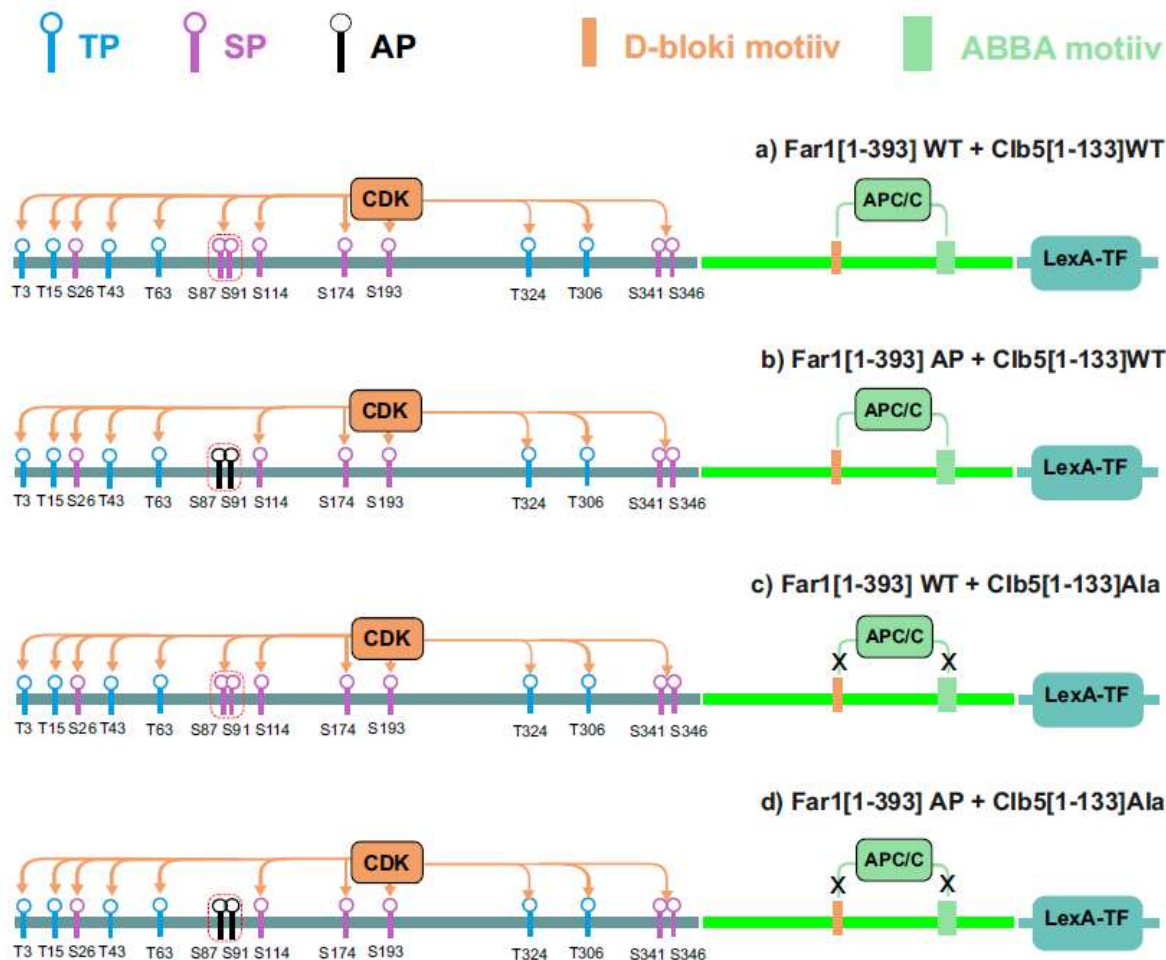
Sic1 fragmentide puhul loodi neli erinevat mutanti: metsiktüüpi (WT) fragment, mille järjestus säilis muteerumata kujul, sisaldades kõiki Cdk1-d siduvaid S/TP saite, nelja S-faasi tsükliinidele spetsiifilist RxL motiivi ning G1-tsükliinide spetsiifilist LLPP motiivi (joonis 19). Alaniinimutandi (AP) fragmendi puhul muteeriti mõlemad difosfodegroni (T45-T48 ning S76-S80) treoniinid ning seriinid alaniinideks, mida pole võimalik fosforüülida. Samuti muteeriti kõik neli RxL motiivi AxA motiivideks ning LLPP motiiv alaniinideks, raskendades tsükliinide seondumist. Cks1 seondumismutandi (T5S T33S) fragmendil muteeriti 5. ning 33. positsioonides olevad treoniinid seriinideks, mida fosfoadapter Cks1 siduda ei suuda. Samuti muteeriti RxL motiivid AxA motiivideks ning LLPP motiiv alaniinideks. Neljanda mutandi (T33(+4)+LxF2,3) fragmendil pikendati T33 ning T45 positsioonide vahelist suboptimaalset distantssi nelja aminohappe võrra 12-lt aminohappelt 16-le aminohappele. Samuti muteeriti teises ning kolmandas positsioonis olevad S-faasi spetsiifilised RxL seondumismotiivid Clb2 spetsiifilise LxF seondumismotiiviga.



Joonis 19. Sic1 mutantide fragmendid koos LexA transkriptsioonifaktoriga (LexA-TF). Joonisel on välja toodud fosfosaidid, mida tunnevad ära tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleksid. Samuti on näidatud tsükliinspetsiifilised motiivid positsioonides 2 ja 3 ning LLPP motiiv. Neljanda d) mutandi puhul on võrreldes eelmiste fragmentidega pikendatud T33 ning T45 vahelist suboptimaalset distantsi 12-lt 16-le aminohappele ning muteeritud 2. ning 3. RxL motiiv LxF-ideks (kohandatud Örd et al., 2019a).

Far1 algsed metsiktüüpi ning alaniinimutant (Far1[1-393]AP) ning metsiktüüpi (Far1[1-150]wt) fragmendiga plasmiidid ning metsiktüüpi Clb5 (Clb5[1-133]wt) fragmendiga plasmiid pärinevad Ervin Valgu käest (avaldamata andmed) ning Clb5 alaniinimutandi (Clb5[1-133]Ala) fragmendiga plasmiid Nele Kuusma käest (avaldamata andmed). Täispika 1-393 Far1 mutandi põhjal loodi 1-150 mutandid, millelt puudus C-terminaalne struktureeritud domeen.

Far1 alaniinimutantides on muteeritud difosfodegronis sisalduvad S87 ning S91 alaniinideks (joonis 20). Clb5 alaniinimutandi fragmendi puhul muteeriti D-box (i.k *destruction box*) motiivi ning ABBA motiivi. D-box motiivis muteeriti R56 ning L59 alaniinideks, ABBA motiivis K99, R100 ning Y103 alaniinideks (järjestused LISAS 2), mida APC/C ära ei tunne.



Joonis 20. Far1+Clb5 mutantide fragmendid koos LexA transkriptsioonifaktoriga (LexA-TF). Far1[1-393] fragment on toodud sinisega, kus on näha muteeritud SP saite difosfodegronis ning Cdk1 seandumissaite fragmendis. Clb5[1-133] fragment on toodud rohelisega, mis sisaldab D-box ning ABBA motiive, mille alaniinimutantide äratundmine APC/C poolt on raskendatud.

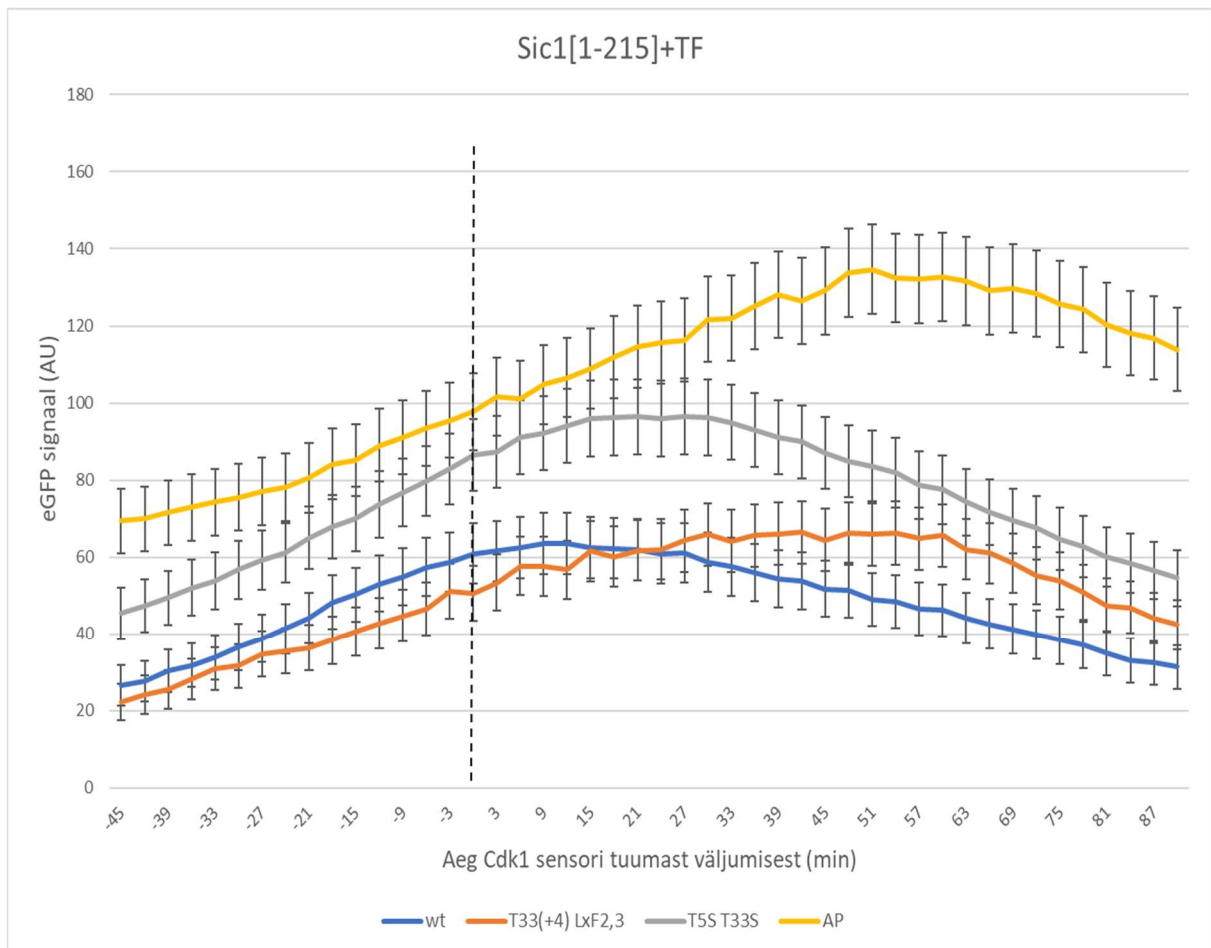
2.3.3. Ostsillaatorite analüüs *in vivo* mikroskoopias

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli disainida ning testida erinevate ostsillatsiooniprofiilidega sünteetilisi transkriptsioonifaktoreid, kasutades Cdk1 inhibiitorvalke Sic1 ning Far1, kus Far1 konstruktile oli liidetud APC/C spetsiifiline Clb5 tsükliin. Töö tulemusena valmis 16 sünteetilist transkriptsioonifaktorit, mida testiti fluorestsentsmikroskoopias.

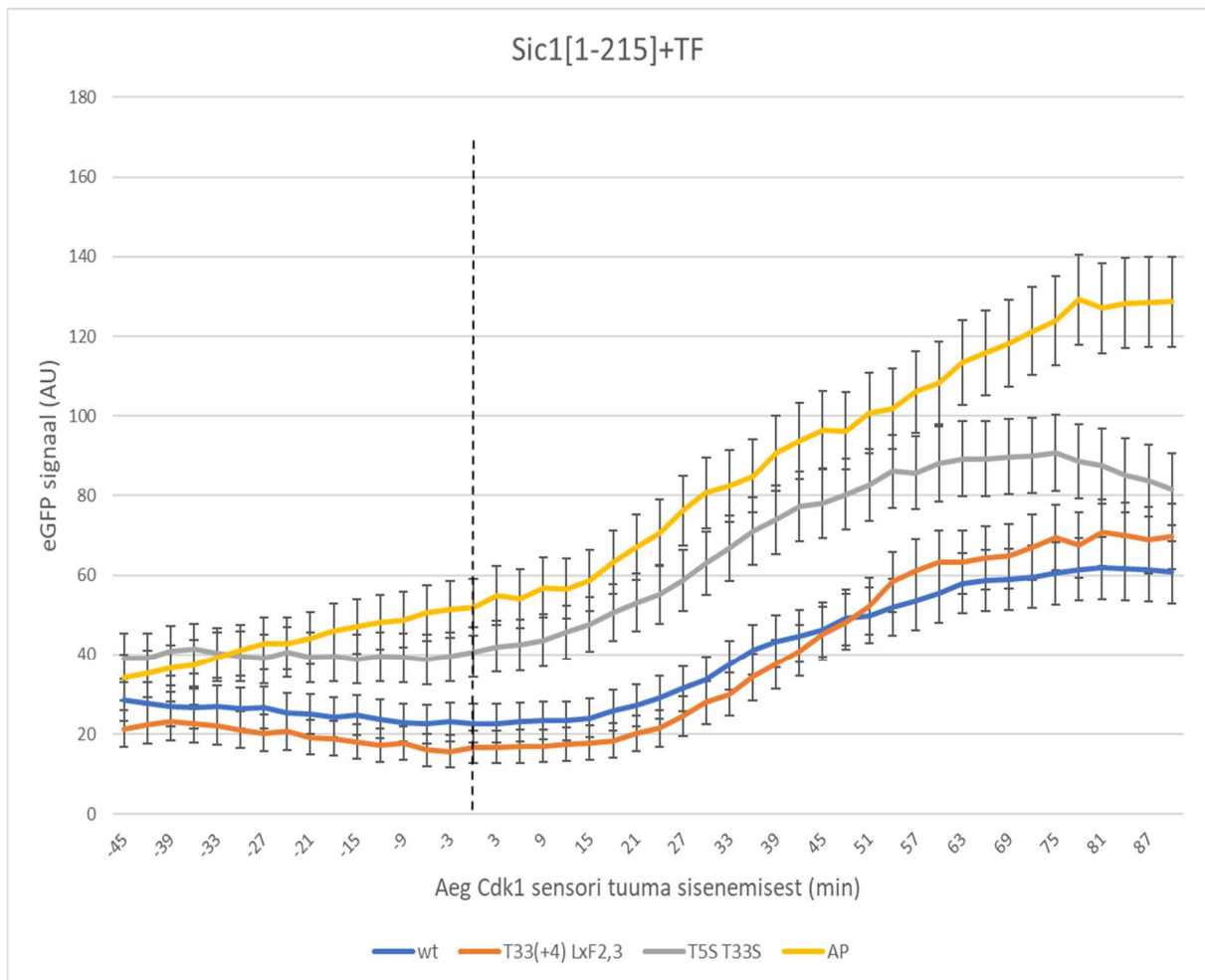
Mikroskoopia katsete tulemuste analüüsi jaoks on rakud sünkroniseeritud nii Cdk1 sensori tuuma sisenemise kui tuumast väljumise järgi. Graafikul on toodud ajapunktid alates -45 minutist ehk 45 minutit enne tuuma sisenemist või väljumist, mis on 0 ajapunktiks. Järgnevad 0-90 minuti ajapunktid, mis annab kokku pagaripärmi ühe rakutsükli. Kõikidest tulemustest on maha lahutatud taustana indutseerimata mutantide fluorestsents kontrollina.

2.3.3.1. Sic1[1-215]+transkriptsioonifaktor

Sic1 C-terminaalse inhibiitorita konstrukti mutantide puhul oli erinevusi näha kõigi nelja mutandi eGFP signaali võrdluses (joonis 21, 22). Ootuspäraselt oli fosfodegroni alaniinimutandiga (AP) tüvi kõige kõrgema eGFP signaaliga, mis viitab eGFP ekspressiooni kontrolliva transkriptsioonifaktori kõrgele tasemele. Kuna fosfodegronite fosforüülimine on alaniinimutandi puhul võimatu, on transkriptsioonifaktori lagundamine pärsitud, mis põhjustab valgu akumulereerumise rakus. Akumulatsiooni puhul on näha, et valgu tase ostsilleerub veidi, mis võib olla põhjustatud teistest teguritest, näiteks mõni senitundmata motiiv või rakutsükli käigus tekkivad raku suuruses tulenev eGFP lahjendusefekt. Võrreldes metsiktüüpi (wt) mutandiga oli eGFP tase kaks korda kõrgem ka Cks1 dokkimissaitide T5S T33S mutandis, kus lisaks Cks1 seondumist takistavatele T5S ja T33S mutatsioonidele olid kõik neli tsükliin-spetsiifilist seondumismotiivi asendatud alaniinidega. Cks1 on kompleksis Cdk1-ga ning see soodustab fosforüülitud treoniinidega seondumise substraadi multifosforüülimist. Seega seriinimutandi puhul neis positsioonides on raskendatud konstrukti sisalduva degroni fosforüülimine ja seega ka lagundamine. LxF mutandis, kus 33. positsioonis asuva treoniini järele oli lisatud neli aminohapet ehk suboptimaalset distantssi pikendatud 12 aminohappe pealt 16-le aminohappele ning 2. ja 3. positsioonis olevate S-faasi spetsiifiliste RxL seondumismotiivide asendamine Clb2 spetsiifiliste LxF motiividega (T33(+4) + LxF2,3) põhjustas valgu ligikaudu 50 minutit hilisema lagundamise. Tulemus oli põhjustatud tõenäoliselt LxF dokkimismotiivist, mis on spetsiifiline Clb2 tsükliinile, mis on rakus ekspresseeritud peamiselt M-faasis.



Joonis 21. EGFP signaali tugevus Sic1[1-215]+transkriptsioonifaktori ostsillaatorites sünkroniseerituna Cdk1 sensori tuumast väljumise järgi.



Joonis 22. EGFP signaali tugevus Sic1[1-215]+transkriptsioonifaktori ostsillaatorites sünkroniseerituna Cdk1 sensori tuuma sisenemise järgi.

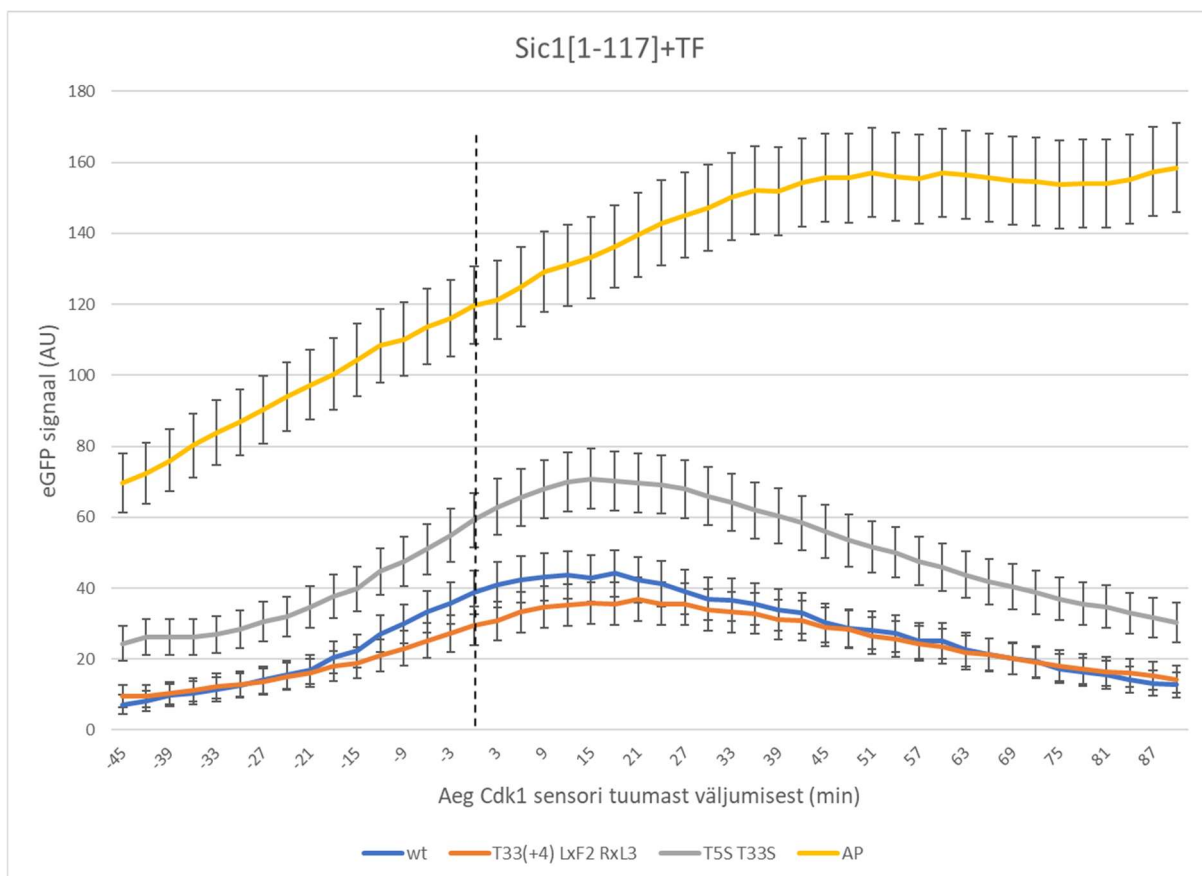
2.3.3.2. Sic1[1-117]+transkriptsioonifaktor

Lühemate Sic1[1-117] põhinevate mutantide võrdluses polnud erinevused sama profiiliga, nagu pikemate Sic1[1-215] mutantide puhul, ent sellegipoolest oli näha erinevusi valgu lagundamises (joonis 23, 24). Ka lühemate Sic1-l põhinevate konstruktide puhul oli kõige kõrgem eGFP signaal ootuspäraselt alaniinimutandi (AP) tüves, kus transkriptsioonifaktoriga seotud fosfodegron on muudetud mitte-fosforüülitavaks. Võrreldes pikema mutandiga oli näha ligi 20 ühikut kõrgemat eGFP taset, mille põhjus võib olla selles, et lühema konstrukti küljes oleva transkriptsioonifaktori ekspressioon on efektiivsem, samuti on võimalus, et transkriptsioonifaktori külge pandud konstrukti pikkus mõjutab transkriptsioonifaktori seondumist LexA promooterile. Samuti on näha lühema Sic1 alaniinimutandi puhul, et eGFP tase tõuseb olenemata rakutsükli faasist, mis tõttu toimub valgu akumulatsioon. Selle

järeldusena võib öelda, et Sic1 valgu pikkuse optimeerimine võimaldab samuti lagundamise efektiivsust kontrollida.

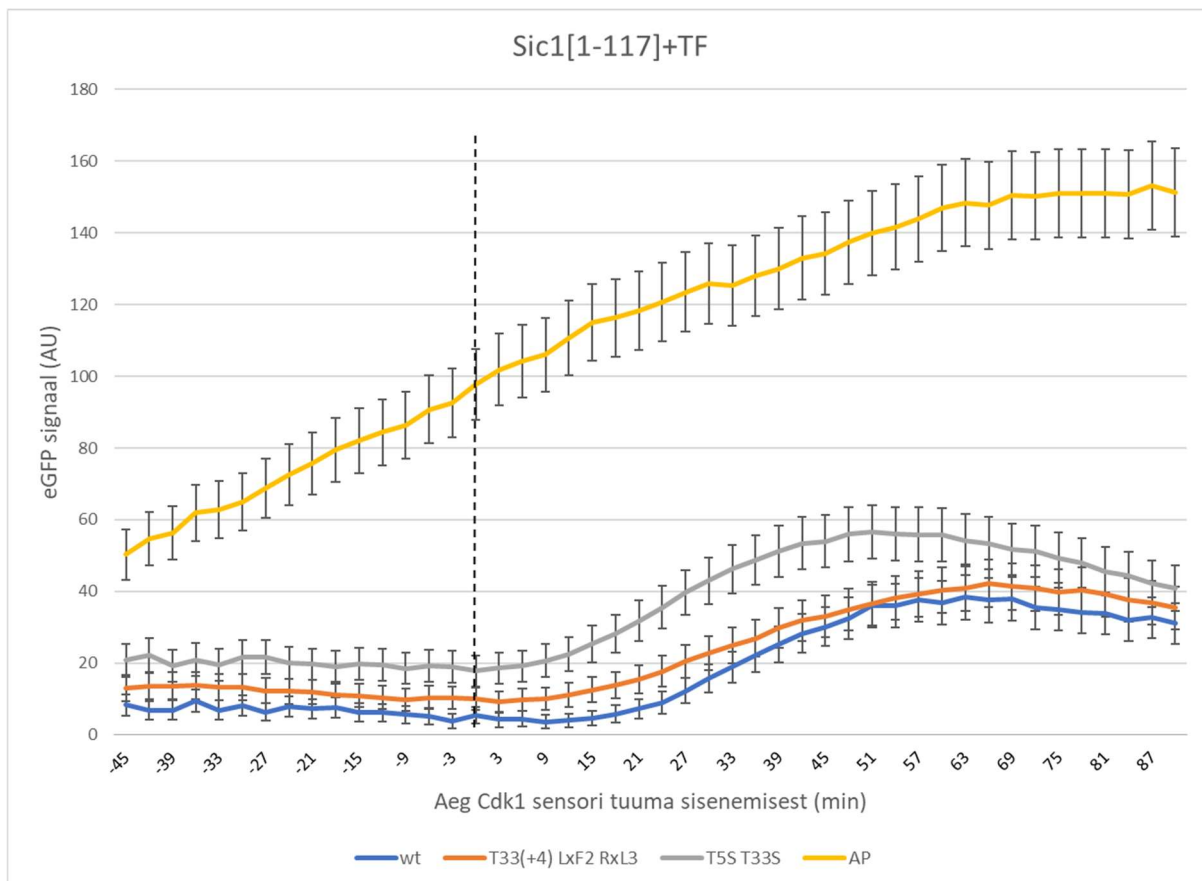
T33(+4) mutandil (T33(+4) + LxF2 RxL3) oli lühema Sic1[1-117] puhul kolmandaks tsükliin-spetsiifiliseks dokkimismotiiviks LxF asemel RxL, kuid teine motiiv jäi siiski LxF-iks ning esimene RxL-iks. See on põhjustanud muutuse ka lagundamise profiilis, kus transkriptsioonifaktori lagundamine võrreldes metsiktüüpi (wt) degroniga hilises G1 faasis on efektiivsem, ent anafaasis kehvem. Samuti on võimalik, et tasemed ostsilleerivad mutantide puhul veidi erinevalt, ent tasemete on vahed ligikaudu 5 ühikut või vähem, seega on profiilid siiski suhteliselt sarnased. Seevastu erinevus pikema Sic1 sarnase valguga on ligi kahekordne, mis tähendab, et nii pikkus kui kolmandas positsioonis asuv dokkimismotiiv on olulised lagundamise efektiivsuse kontrollimiseks. Cks1 fosfosaitide mõju profiilile on sarnane pikema Sic1 vastava mutandi profiilile, ent ka T5S T33S mutandi puhul on näha eGFP signaali madalamat taset kuni 20 ühikut.

Lühema metsiktüüpi (wt) mutandi puhul on samuti näha erinevust võrreldes pikema metsiktüüpi mutandiga, kus on samuti ligi kahekordne eGFP signaali tase, olles tõenäoliselt põhjustatud samuti positsioonides 118-215 leiduvatest aminohapetest. Kuna lühema mutandi puhul on lagundamine tunduvalt efektiivsem ningalaniinimutandi puhul tunduvalt kehvem, tundub 1-117 aminohapete järjestus olema lagundamiseks olulisem kui 118-215 aminohapete mõju. Antud fragmentide puhul on positsioonides 118-215 aminohapete mõju mutandile vaid pikkust arvestades ligi 20 ühikut, kuigi maksimaalsed fluorestsentsi signaalid küündivad 160 ühikuni, ehk vaid 1/8 lagundamise efektiivsusest.



Joonis 23. EGFP signaali tugevus Sic1[1-117]+transkriptsioonifaktori ostsillaatorites sünkroniseerituna Cdk1 sensori tuumast väljumise järgi.

Mutatsioonid Sic1 valgu Cks1 äratundmissaitides ning tsükliin-spetsiifiliste seondumismotiivide välja vahetamisel tekkinud ostsillatsiooniprofilid olid nii Sic1[1-117] kui Sic1[1-215] transkriptsioonifaktori puhul metsiktüüpi fragmendiga võrreldes küll veidi kõrgema taseme või ajaliselt nihkunud profiiliga, entalaniinimutandiga võrreldes madalamad, seda just Sic1[1-117] ostsillaatorite puhul.



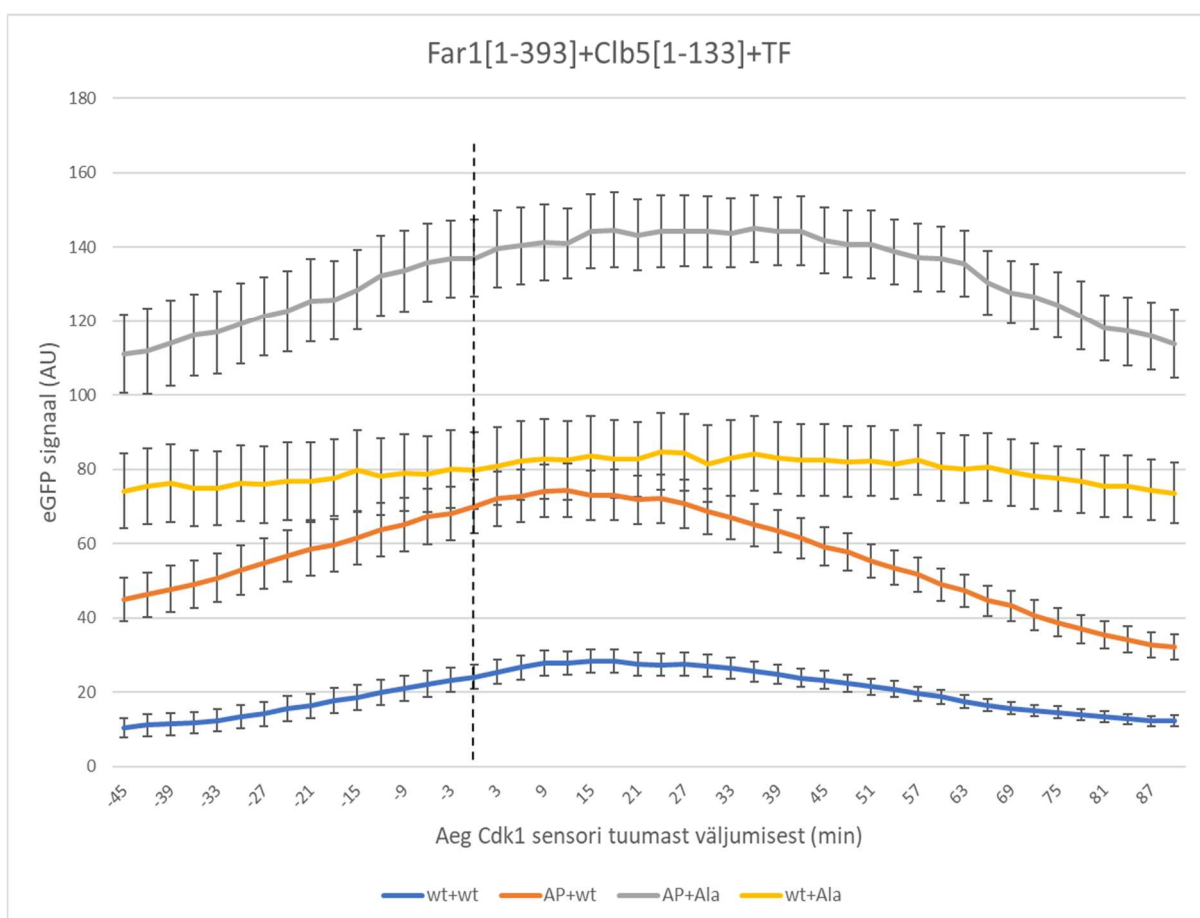
Joonis 24. EGFP signaali tugevus Sic1[1-117]+transkriptsioonifaktori ostsillaatorites sünkroniseerituna Cdk1 sensori tuuma sisenemise järgi.

2.3.3.3. Far1[1-393]+Clb5[1-133]+transkriptsioonifaktor

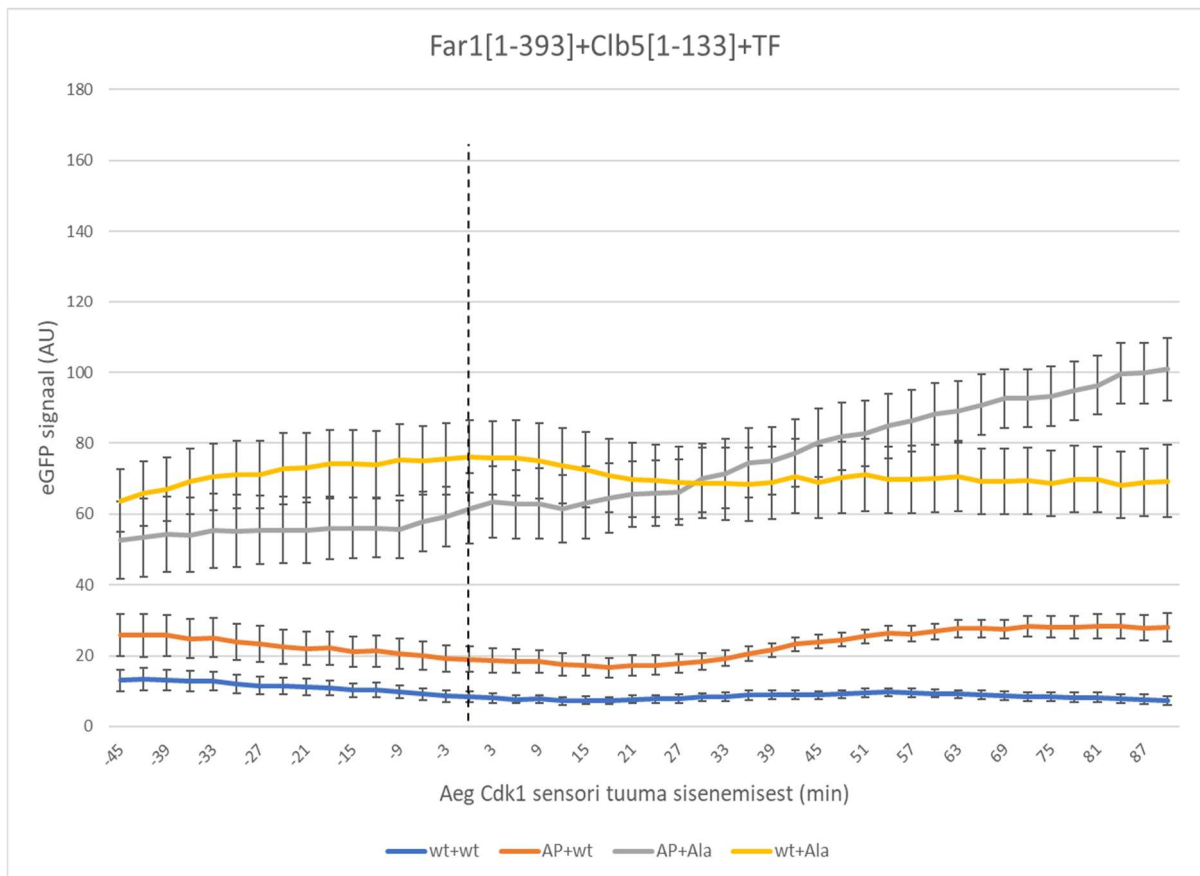
Sic1 baasil loodud fosfodegronitega transkriptsioonifaktorite testimine näitas, et rakutsüklil baseeruvaid ostsillaatoreid on võimalik luua. Sellest tulenevalt tekkis soov disainida ka ostsillaatoreid, mis kasutavad lisaks fosfodegronitele APC/C sõltuvaid degroneid. Selleks loodi degroni, mis sisaldas Far1 fosfodegronit koos Clb5 N-terminaalse APC/C-st sõltuva degroniga. Taolise degroni liitmine transkriptsioonifaktori külge andis Sic1 mutantidest erinevaid ekspressiooni profile ning kutsus esile eGFP tasemete suuremaid erinevusi (joonis 25, 26). Huvitava tulemusena Far1 degroni alaniinimutant koos Clb5 tsükliini seondumismotiivide alaniinimutandiga (AP+Ala) oli küll kõige kõrgema tasemega, ent andis siiski nõrgalt ostsilleeruva profiili. Far1 valgu metsiktüüpi konstrukt koos tsükliini alaniinimutandiga (wt+Ala) andis küll parema lagundamise võrreldes topelmutandiga, ent ei andnud ostsilleeruvat profiili.

Topelt metsiktüüpi (wt+wt) mutant oli nõrgalt ostsilleeruv ning andis kõige tugevama lagundamise, mis oli ootuspärane tulemus, kuna degnimotiivid olid muteerimata. Far1 degnoni muteerimine põhjustas metsiktüübiga üle kahe korra nõrgemat lagundamist ning kõige suuremat ostsilleerumist.

Ostsilleerumist mõjutas täispika Far1 valgu ja täispika Clb5 tsükliini mikroskoopia tulemuste põhjal tugevamini Far1 degnoni muteeruminealaniinideks ning valgu lagundamise efektiivsus on sõltuv Clb5 tsükliinist.



Joonis 25. EGFP signaali tugevus Far1[1-393]+Clb5[1-133]+transkriptsioonifaktori ostsillaatorites sünkroniseerituna Cdk1 sensori tuumast väljumise järgi.



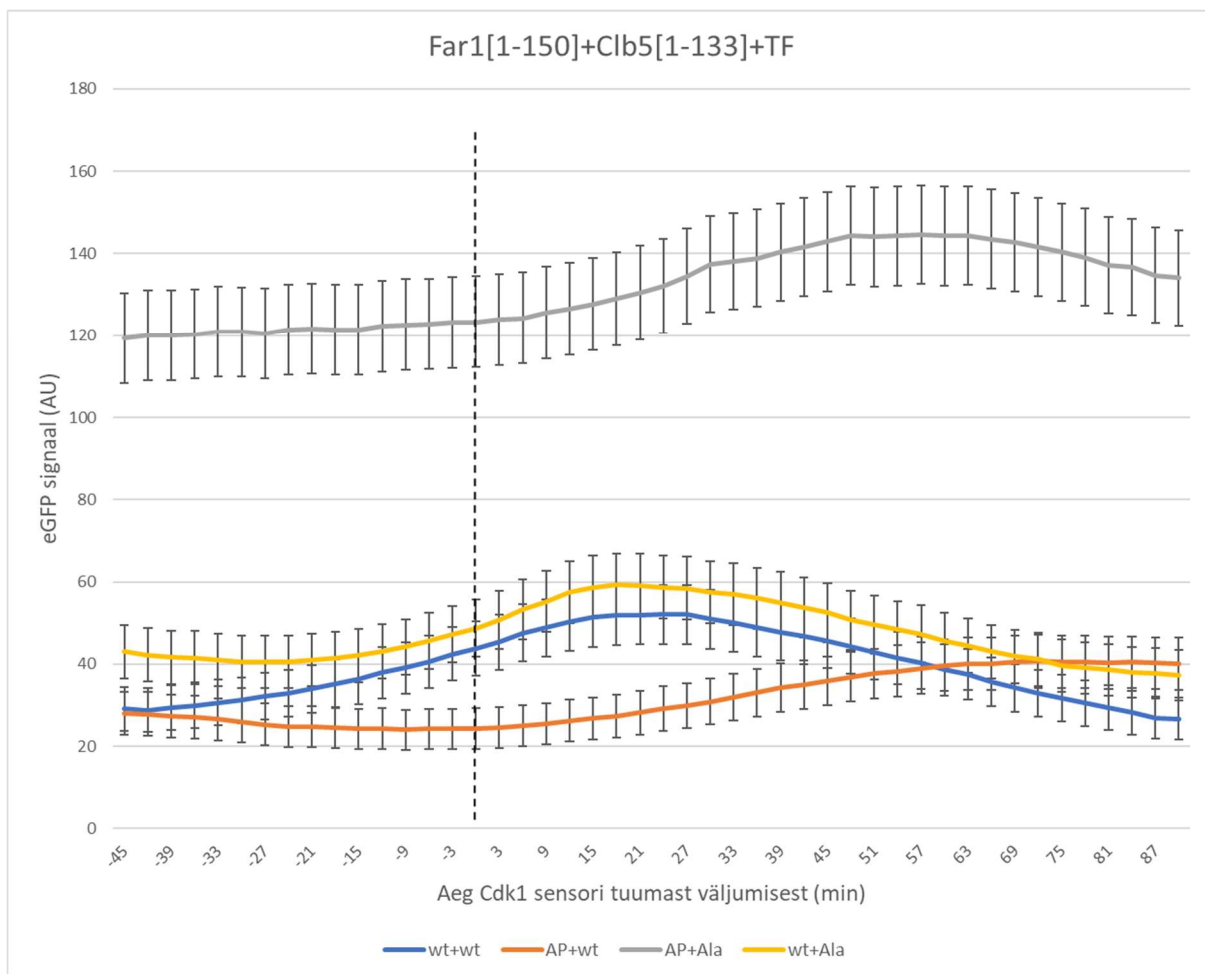
Joonis 26. EGFP signaali tugevus Far1[1-393]+Clb5[1-133]+transkriptsioonifaktori ostsillaatorites sünkroniseerituna Cdk1 sensori tuuma sisenemise järgi.

2.3.3.4. Far1[1-150]+Clb5[1-133]+transkriptsioonifaktor

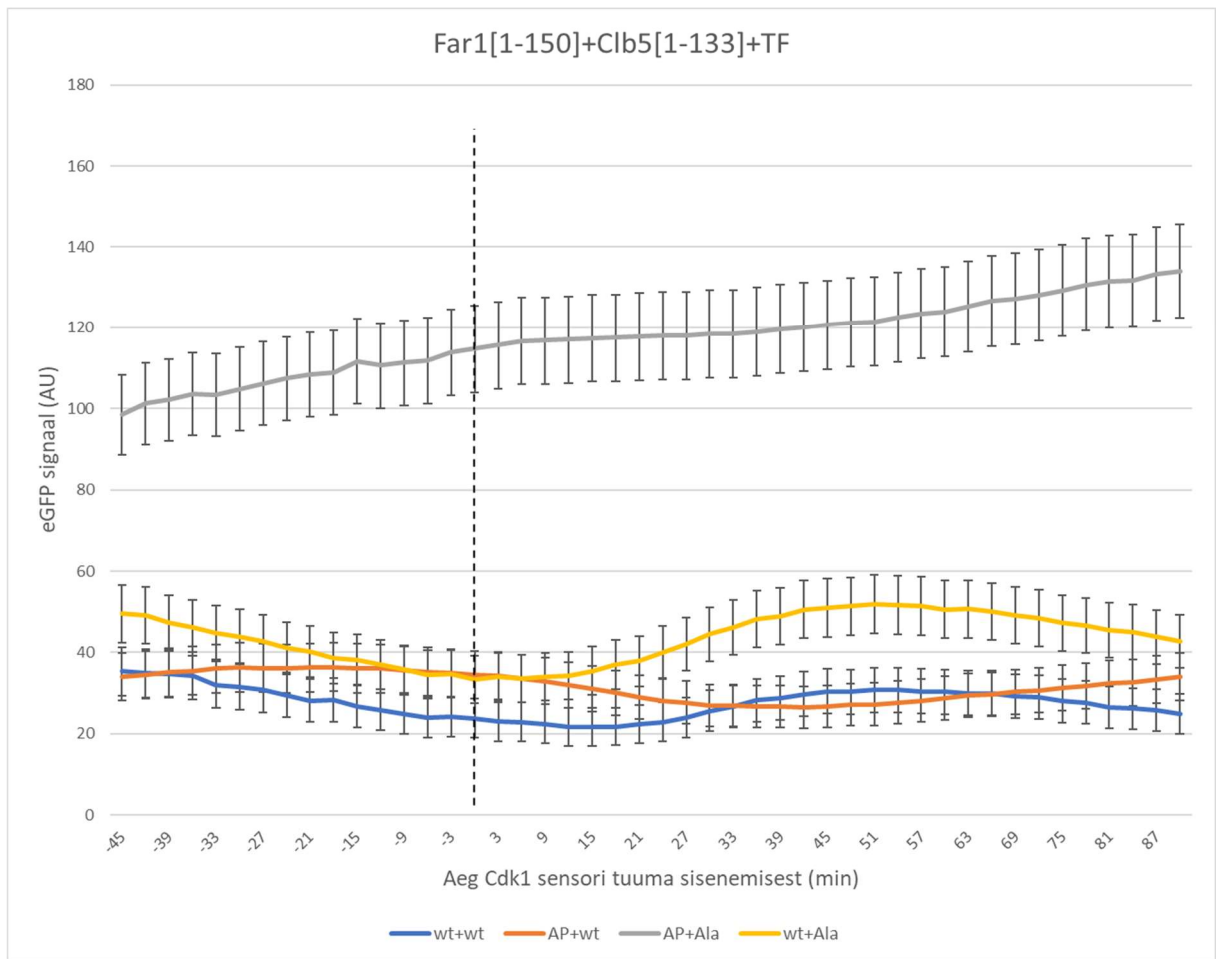
Far1+Clb5 mutantide puhul katsetati ka Far1 valgu lühemat fragmenti, mis koosnes Far1 150 esimesest N-terminaalsest aminohappest (Far1[1-150]+Clb5[1-133]), jättes välja C-terminaalse struktureeritud domeeni. Analüüsil selgus, et struktuurne domeen takistab osaliselt lagundamist ning C-terminuse välja jätmise põhjustab efektiivsemat lagundamist võrreldes täispika Far1-ga Far1 degroni alaniinimutantide puhul (joonis 27, 28). Metsiktüüpi topeltmutandi (wt+wt) ning tsükliini alaniinideks muteeritud seondumismutantide (wt+Ala) puhul oli märgata lagundamise vähenenud aktiivsust võrreldes täispikkade Far1 insertidega mutandiga ning vahe oli ligi kahekordne.

Kõikide Far1[1-150]+Clb5[1-133] mutantide puhul oli näha tugevamat ostsilleerumist võrreldes Far1[1-393]+Clb5[1-133] konstruktidega. Fosfodegroni muteerimine alaniinideks (AP+wt) tekitas lagundamisprofiilis võrreldes metsiktüüpi degroniga ajalise nihke ligi 1 tunni võrra. Clb5 tsükliini seondumismotiivide muteerumine (wt+Ala) andis sarnase profiili topelt metsiktüüpi (wt+wt) mutandile, ent lagundamine oli ligi 2 korda vähem efektiivne. Kõige

stabiilsem oli ootuspäraselt topelt alaniinimutant (AP+Ala), mille puhul oli näha kõige kehvemad lagundamist.



Joonis 27. EGFP signaali tugevus Far1[1-150]+Clb5[1-133]+transkriptsioonifaktori otsillaatorites sünkroniseerituna Cdk1 sensori tuumast väljumise järgi.



Joonis 28. EGFP signaali tugevus Far1[1-150]+Clb5[1-133]+transkriptsioonifaktori ostsillaatorites sünkroniseerituna Cdk1 sensori tuuma sisenemise järgi.

Far1+Clb5 konstruktid võrdluses andsid Far1[1-393]+Clb5[1-133] konstruktid varieeruvad profiilid võrreldes Far1[1-150]+Clb5 konstruktidega. EGFP ekspressiooni tase oli madalam Far1[1-150]AP+Clb5[1-133]wt ning Far1[1-150]wt+Clb5[1-133]Ala konstrukti puhul, mõjutades vähem topelt-metsiktüüpi mutandi konstrukte (wt+wt) ning topelt-alaniinimutandi (AP+Ala) konstrukte.

2.4 TULEVIKU PERSPEKTIIVID

Mikroskoopia tulemuste analüüs näitas erinevate loodud ostsillaatorite puhul erinevaid degradatsiooniprofiile, mida on võimalik kasutada tulevikus näiteks rakuvabrikute loomisel. Sellised sünteetilised ostsillaatorid aitavad reguleerida rakuvabrikutes sihtmärkvalkude tootmist, olles samaaegselt ortogonaalsed. Selles töös kasutatud indutseeritav transkriptsioonifaktor andis võimaluse jälgida valkude ekspressioonitaset östradioli induktori lisamisel.

Sünteetilisi transkriptsioonifaktoreid on võimalik tulevikus kasutada ka biosensorina biotehnoloogias. Nende abil on võimalik reguleerida näiteks toksiliste vaheühendite taset rakus valkude või kemikaalide tootmisel, ühendades seensorid tagasiside regulatiivsete radadega. Rakuvabrikute loomisel tuleb arvestada bioreaktoris rakule mõjuvat stressi, mis on põhjustatud vaheproduktide kuhjumisest ning välistest keskkonna signaalidest.

Vaheproduktide põhjustatud proteoomis esinevaid dünaamilisi muutusi on võimalik jälgida näiteks sünteetiliste kinaasisisenditega. Selliste kinaasisisenditega oleks võimalik allareguleerida stressist põhjustatud sihtmärkvalkude kuhjumist rakkudes, leevendades kahjulikku mõju rakule. Samuti on plaan tulevikus luua süsteem, mis suudab kasutada samaaegselt mitmeid sünteetilisi transkriptsioonifaktoreid ning kinaasisisendeid samaaegselt erinevate sihtmärkvalkude puhul.

KOKKUVÕTE

Pagaripärmi rakutsükli keskne regulaator on tsükliinsõltuv kinaas 1 ehk Cdk1. Cdk1 moodustab kompleksi tsükliini ning fosfoadapter Cks1-ga, mis tunnevad substraadil ära seandumiseks ning substraadi fosforüümimiseks vajalikke spetsiifilisi aminohappelisi järjestusi. Fosforüülitud substraadi tunneb ära SCF kompleks, saates substraadi proteolüütilisse lagundamisesse. Teine oluline rakutsükli regulaator on anafaasi viiv kompleks/tsükloosoom ehk APC/C, mis tunneb ära samuti kindlaid järjestusi substraadil ning saadab substraadi lagundamiseks proteasoomi.

Selliseid spetsiifilisi aminohappelisi järjestusi on võimalik kasutada sünteetilises bioloogias moodulitena. Selles magistritöös kasutati ära tsükliin-spetsiifilisi ning APC/C-spetsiifilisi seandumismotiive, Cdk1 fosforüümimissaite ja Cks1 seandumissaite substraadil. Konstruktid disainiti Cdk1 inhibiitorite Sic1 ning Far1 baasil, sealjuures Far1 järjestusele lisati C-terminaalselt Clb5 tsükliin, mis sisaldab APC/C poolt ära tuntavaid motiive.

Magistritöö eesmärgiks oli luua erinevate ostsillatsiooniprofiilidega sünteetilised transkriptsioonifaktorid. Selle saavutamiseks lisati LexA transkriptsioonifaktori (TF) N-terminusse Sic1 ning Far1+Clb5 konstruktid. TF-ide ostsillatsioone jälgiti selle kontrolli all oleva ubikvitiin-eGFP taseme kõikumise järgi rakus.

Töö käigus loodi testsüsteem sünteetiliste ostsillaatorite jälgimiseks ning disainiti ja testiti 16 erinevat sünteetilist ostsillaatorit, milles kombineeriti omavahel erinevaid Cdk1 fosforüümimissaite, Cks1 seandumismotiive ning tsükliin- ja APC/C spetsiifilisi aminohappelisi järjestusi.

Fluorestsentsmikroskoopia andmete analüüs andis ostsillatsiooniprofiilides varieeruvuse nii sarnase pikkusega konstruktide seas kui ka erinevate konstruktide vahel üleüldiselt. Kõige enam mõjutas ostsillatsiooni metsiktüüpi aminohappeliste järjestuste muutmine degnonis seandumisvõimetute alaniinidega. Cdk1 fosforüülitavateks saitideks on seriinid ning treoniinid, alaniine fosforüülida ei saa. Tsükliin- ja APC/C spetsiifilistes seandumismotiivide muteerimine alaniinideks tõi kaasa kehvema seandumise ning sellega kehvema lagundamise.

Tulevikus on võimalik magistritöös loodud sünteetilisi ostsillaatoreid kasutada rakuvabrikute loomisel ning biosensoritena bioloogilistes süsteemides.

SUMMARY

Rakutsüklist sõltuvate ostsillaatorite ekspressiooni reguleerimine sünteetilise transkriptsioonifaktori abil *Saccharomyces cerevisiae*'s

Kristel Alman

The main regulator in baker's yeast cell cycle is cyclin-dependent kinase 1 or Cdk1. Cdk1 forms a complex with cyclin and a phosphoadapter Cks1, all of which recognize specific amino acid motifs for binding and phosphorylation of the substrate. The phosphorylated substrate is recognized by the SCF complex, leading to proteolytic degradation of the substrate. Another important cell cycle regulator is the anaphase-leading complex/cyclosome, or APC/C, which also recognizes specific sequences on the substrate and sends the substrate to proteolytic degradation.

Specific amino acid motifs described above can be used as modules in synthetic biology. In this master's thesis, cyclin-specific and APC/C specific binding motifs, Cdk1 phosphorylation sites and Cks1 binding sites on the substrate were exploited. The selected constructs were non-inhibitory parts of Cdk1 inhibitors Sic1 and Far1, with the C-terminal Clb5 cyclin containing APC/C binding motifs added to the Far1 sequence.

The aim of the master's thesis was to create synthetic transcription factors with different oscillation profiles. For that, LexA transcription factor was added to the Sic1 and Far1+Clb5 constructs. LexA is an inducible transcription factor that is activated by the addition of β -estradiol to the environment. A ubiquitin-eGFP complex under LexA promoter to which the transcription factor binds was added to monitor the expression pattern of TF.

In this study, a test system for controlling synthetic oscillators was developed and 16 different synthetic oscillators were designed and tested, containing different Cdk1 phosphorylation sites, Cks1 binding motifs, and cyclin- and APC/C specific amino acid sequences combined.

Analysis of fluorescence microscopy data revealed variability in oscillation profiles both within constructs of similar length and between different constructs in general. Oscillation was most affected by alteration of wild-type amino acid sequences to alanines with lower binding capacity. Cdk1 phosphorylated sites are serines and threonines, and alanines cannot be phosphorylated. Mutation of cyclin and APC/C specific binding motifs to alanines resulted in poorer binding and degradation.

In the future, it will be possible to use the synthetic oscillators created in this master's thesis in the creation of cell factories and as biosensors in biological systems.

Tänuõnad

Soovin tänada oma juhendajaid Rait Kivi ning Mart Loogi juhendamise ning toetamise eest kogu projekti vältel. Tänan Mihkel Ördi, Ervin Valku ning Nele Kuusmad algkonstruktsioonide eest. Olen tänulik kogu Looglab seltskonnale hea seltskonna ning moraalse toe eest.

KASUTATUD ALLIKAD

Alberts, B. (2015). *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science, Taylor ja Francis Group).

Atay, O., Doncic, A., ja Skotheim, J.M. (2016). Switch-like Transitions Insulate Network Motifs to Modularize Biological Networks. *Cell Systems* 3, 121–132.

Barberis, M. (2012). Sic1 as a timer of Clb cyclin waves in the yeast cell cycle – design principle of not just an inhibitor. *The FEBS Journal* 279, 3386–3410.

Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., ja Seemüller, E. (1998). The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease. *Cell* 92, 367–380.

Bertoli, C., Skotheim, J.M., ja 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., ja Pryciak, P.M. (2011). Cyclin-Specific Docking Motifs Promote Phosphorylation of Yeast Signaling Proteins by G1/S Cdk Complexes. *Current Biology* 21, 1615–1623.

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

Bloom, J., ja Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 149–160.

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. *Nature Cell Biology* 1, 438–443.

Castro, A., Bernis, C., Vigneron, S., Labbé, J.-C., ja Lorca, T. (2005). The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* 24, 314–325.

Chang, F., ja Herskowitz, I. (1990). Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. *Cell* 63, 999–1011.

Chassin, H., Müller, M., Tigges, M., Scheller, L., Lang, M., ja Fussenegger, M. (2019). A modular degron library for synthetic circuits in mammalian cells. *Nature Communications* 10, 1–11.

Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M., ja Nasmyth, K. (1998). An ESP1/PDS1 Complex Regulates Loss of Sister Chromatid Cohesion at the Metaphase to Anaphase Transition in Yeast. *Cell* 93, 1067–1076.

- Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W., ja Koshland, D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* *10*, 3081–3093.
- Cosentino, C., Bates, D., ja Bates, D. (2011). *Feedback Control in Systems Biology* (CRC Press).
- Davey, N.E., Roey, K.V., Weatheritt, R.J., Toedt, G., Uyar, B., Altenberg, B., Budd, A., Diella, F., Dinkel, H., ja Gibson, T.J. (2011). Attributes of short linear motifs. *Mol. BioSyst.* *8*, 268–281.
- Davey, N.E., Cyert, M.S., ja Moses, A.M. (2015). Short linear motifs – ex nihilo evolution of protein regulation. *Cell Commun Signal* *13*.
- Di Fiore, B., Davey, N.E., Hagting, A., Izawa, D., Mansfeld, J., Gibson, T.J., ja Pines, J. (2015). The ABBA Motif Binds APC/C Activators and Is Shared by APC/C Substrates and Regulators. *Developmental Cell* *32*, 358–372.
- Doncic, A., ja Skotheim, J.M. (2013). Feedforward Regulation Ensures Stability and Rapid Reversibility of a Cellular State. *Molecular Cell* *50*, 856–868.
- Doncic, A., Falleur-Fettig, M., ja Skotheim, J.M. (2011). Distinct Interactions Select and Maintain a Specific Cell Fate. *Molecular 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.
- Egan, E.A., ja Solomon, M.J. (1998). Cyclin-Stimulated Binding of Cks Proteins to Cyclin-Dependent Kinases. *Mol Cell Biol* *18*, 3659–3667.
- Harashima, H., Dissmeyer, N., ja Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in Cell Biology* *23*, 345–356.
- Heldt, H.-W., ja Piechulla, B. (2011). 19 - Multiple signals regulate the growth and development of plant organs and enable their adaptation to environmental conditions. In *Plant Biochemistry (Fourth Edition)*, H.-W. Heldt, ja B. Piechulla, eds. (San Diego: Academic Press), p. 463.
- Henchoz, S., Chi, Y., Catarin, B., Herskowitz, I., Deshaies, R.J., ja Peter, M. (1997). Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast. *Genes Dev.* *11*, 3046–3060.

- Hodge, A., ja Mendenhall, M. (1999). The cyclin-dependent kinase inhibitory domain of the yeast Sic1 protein is contained within the C-terminal 70 amino acids. *Mol Gen Genet* 262, 55–64.
- Holt, L.J. (2012). Regulatory modules: Coupling protein stability to phosphoregulation during cell division. *FEBS Letters* 586, 2773–2777.
- Houser, J.R., Ford, E., Chatterjea, S.M., Maleri, S., Elston, T.C., ja Errede, B. (2012). An improved short-lived fluorescent protein transcriptional reporter for *S. cerevisiae*. *Yeast* 29, 519–530.
- Irniger, S. (2002). Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Letters* 532, 7–11.
- Irniger, S., ja Nasmyth, K. (1997). The anaphase-promoting complex is required in G1 arrested yeast cells to inhibit B-type cyclin accumulation and to prevent uncontrolled entry into S-phase. *Journal of Cell Science* 110, 1523–1531.
- Khalil, A.S., Lu, T.K., Bashor, C.J., Ramirez, C.L., Pyenson, N.C., Joung, J.K., ja Collins, J.J. (2012). A Synthetic Biology Framework for Programming Eukaryotic Transcription Functions. *Cell* 150, 647–658.
- King, R.W., Glotzer, M., ja Kirschner, M.W. (1996). Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Molecular Biology of the Cell* 7, 1343–1357.
- Knapp, D., Bhoite, L., Stillman, D.J., ja Nasmyth, K. (1996). The transcription factor Swi5 regulates expression of the cyclin kinase inhibitor p40(SIC1). *Molecular and Cellular Biology* 16, 5701–5707.
- Kõivomägi, M., ja Loog, M. (2011). Cdk1: A kinase with changing substrate specificity. *Cell Cycle* 10, 3625–3626.
- Kõivomägi, M., ja Loog, M. (2018). Rakutsükkel. In *Rakubioloogia*, (Tartu Ülikooli Kirjastus / University of Tartu Press), p.
- 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. *Molecular 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. *Nature Structural & Molecular Biology* *20*, 1415.
- Landry, B.D., Doyle, J.P., Toczyski, D.P., ja Benanti, J.A. (2012). F-Box Protein Specificity for G1 Cyclins Is Dictated by Subcellular Localization. *PLOS Genetics* *8*, e1002851.
- Lengronne, A., ja Schwob, E. (2002). The Yeast CDK Inhibitor Sic1 Prevents Genomic Instability by Promoting Replication Origin Licensing in Late G1. *Molecular Cell* *9*, 1067–1078.
- Lu, D., Girard, J., Li, W., Mizrak, A., ja Morgan, D. (2015). Quantitative framework for ordered degradation of APC/C substrates. *BMC Biology* *13*, 96.
- Mathiasen, D.P., ja Lisby, M. (2014). Cell cycle regulation of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* *38*, 172–184.
- 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. *Nature Structural & Molecular Biology* *20*, 1407–1414.
- Mendenhall, M.D., ja Hodge, A.E. (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 1191–1243.
- Morgan, D. (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control* (New Science Press).
- Morgan, D.O. (1999). Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nature Cell Biology* *1*, E47–E53.
- Nasmyth, K. (1996). At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends in Genetics* *12*, 405–412.
- Neduva, V., ja Russell, R.B. (2005). Linear motifs: Evolutionary interaction switches. *FEBS Letters* *579*, 3342–3345.
- Novák, B., ja Tyson, J.J. (2008). Design principles of biochemical oscillators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 981–991.

- Örd, M., Möll, K., Agerova, A., Kivi, R., Faustova, I., Venta, R., Valk, E., ja Loog, M. (2019a). Multisite phosphorylation code of CDK. *Nature Structural & Molecular Biology* 26, 649–658.
- Örd, M., Venta, R., Möll, K., Valk, E., ja Loog, M. (2019b). Cyclin-Specific Docking Mechanisms Reveal the Complexity of M-CDK Function in the Cell Cycle. *Molecular Cell* 75, 76–89.e3.
- Ottoz, D.S.M., Rudolf, F., ja Stelling, J. (2014). Inducible, tightly regulated and growth condition-independent transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 42, e130–e130.
- Pagano, M. (1997). Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *The FASEB Journal* 11, 1067–1075.
- Page, A.M., ja Hieter, P. (1999). The Anaphase-Promoting Complex: New Subunits and Regulators. *Annual Review of Biochemistry* 68, 583–609.
- Patnaik, P.R. (2003). Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*: an overview of mechanisms and models. *Biotechnology Advances* 21, 183–192.
- Peter, M., ja Herskowitz, I. (1994). Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* 265, 1228–1231.
- Peter, M., Gartner, A., Horecka, J., Ammerer, G., ja Herskowitz, I. (1993). FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell* 73, 747–760.
- Pfleger, C.M., ja Kirschner, M.W. (2000). The KEN box: An APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes and Development* 14, 655–665.
- Puntervoll, P., Linding, R., Gemünd, C., Chabanis-Davidson, S., Mattingsdal, M., Cameron, S., Martin, D.M.A., Ausiello, G., Brannetti, B., Costantini, A., et al. (2003). ELM server: a new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res* 31, 3625–3630.
- Schneider, B.L., Yang, Q.-H., ja Futcher, A.B. (1996). Linkage of Replication to Start by the Cdk Inhibitor Sic1. *Science* 272, 560–562.
- 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.

- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., ja Harper, J.W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* *91*, 209–219.
- Teixeira, L.K., ja Reed, S.I. (2013). Ubiquitin Ligases and Cell Cycle Control. *Annual Review of Biochemistry* *82*, 387–414.
- Toda, T., Ochotorena, I., ja Kominami, K. (1999). Two distinct ubiquitin-proteolysis pathways in the fission yeast cell cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* *354*, 1551–1557.
- Tyanova, S., Cox, J., Olsen, J., Mann, M., ja Frishman, D. (2013). Phosphorylation variation during the cell cycle scales with structural propensities of proteins. *PLoS Comput. Biol.* *9*, e1002842.
- Valk, E., Doncic, A., Koivomaegi, M., Venta, R., Iofik, A., Faustova, I., Kivi, R., Siibak, T., Balog, E., Rubin, S., et al. (2013). Mutually exclusive phosphorylation events control the decision between mating and cell cycle progression. pp. 66–66.
- Valk, E., Venta, R., Örd, M., Faustova, I., Kõivomägi, M., Loog, M., Kellogg, D., ja Lippincott-Schwartz, J. (2014). Multistep phosphorylation systems: tunable components of biological signaling circuits. *MBoC* *25*, 3456–3460.
- Varshavsky, A. (1991). Naming a targeting signal. *Cell* *64*, 13–15.
- Varshavsky, A. (2019). N-degron ja C-degron pathways of protein degradation. *PNAS* *116*, 358–366.
- Venta, R., Valk, E., Örd, M., Košik, O., Pääbo, K., Maljavin, A., Kivi, R., Faustova, I., Shtaida, N., Lepiku, M., et al. (2020). A processive phosphorylation circuit with multiple kinase inputs and mutually diversional routes controls G1/S decision. *Nature Communications* *11*, 1–14.
- Visintin, R., Craig, K., Hwang, E.S., Prinz, S., Tyers, M., ja Amon, A. (1998). The Phosphatase Cdc14 Triggers Mitotic Exit by Reversal of Cdk-Dependent Phosphorylation. *Molecular Cell* *2*, 709–718.
- Wilmes, G.M., Archambault, V., Austin, R.J., Jacobson, M.D., Bell, S.P., ja Cross, F.R. (2004). Interaction of the S-phase cyclin Clb5 with an “RXL” docking sequence in the initiator protein Orc6 provides an origin-localized replication control switch. *Genes Dev.* *18*, 981–991.

Yang, Q., ja Ferrell, J.E. (2013). The Cdk1–APC/C cell cycle oscillator circuit functions as a time-delayed, ultrasensitive switch. *Nature Cell Biology* 15, 519–525.

LISAD

LISA 1: Töös kasutatud praimerid

UBI4-BcuI-F	TTC TAT ACT AGT ATG CAG ATT TTC GTC AAG ACT TTG
GFP-XhoI-R	ATA TAT CTC GAG CTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC ATG
Link-Sic1TP-F	GTG TTT CAA GCT TGC AGG TGC TGG TGC TGG TGC TGG AGC AAT GAC TCC TTC CAC CCC ACC
Link-Sic1SP-F	GCA GGT GCT GGT GCT GGT GCT GGA GCA ATG TCT CCT TCC TCC CCA CCA AGG TCC AGA GGG
Sic1dC-XhoI-R	CCT GTC TCG AGT TAA CCC ACC CGC ACT GG
Sic1-RxL3-XhoI-R	CCT GTC TCG AGT TAC AAT ATC CTA TTT ACA CGA CCC AAT G
Far1-SmaI-F	ATC CCC CGG GAT GAA GAC ACC AAC AAG AGT TTC G
Far1_150_GA- EcoRI-R	TTC ATG AAT TCT GCT CCA GCA CCA GCA CCA GCA CCT GCC AAA GTA TCA CAC ATA GTT GTA GAA TCA GAA ATC
Far1[1-393]_R	CAC ACT GAC CAT AAC ATG TTC ACC
Far1[1-393]+Clb5[1- 113]overlap_F	GGT GAA CAT GTT ATG GTC AGT GTG ATG GGA GAG AAC CAC GAC C
Clb5-SalI-GA-R	AGC ACC AGC ACC AGC ACC TGC GTC GAC TCT GCG TTT TTT GTT CAC TAT CG

LISA 2: Aminohappejärjestused degroni kaupa

Sic1[1-215]

wt:

MTPSTPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPSQNLVPVTPSTTKSFKNAPLL
APPNSNMGMTSPFNGLTSPQRSPPFKSSVKRTLFQFESHNGTVREEQEPLGRVNRILF
PTQQNVDIDAAEEEEEGEVLLPPSRPTSARQLHLSLERDEFDQTHRKKIIKDVPGTSPD
KVITFELAKNWNNSPKNDARSQESEDEEDIINPVRVG

T5S T33S:

MSPSSPPRSRGTAYAAQPSGNTSSSALMQGQKSPQKPSQNLVPVTPSTTKSFKNAPLL
APPNSNMGMTSPRNGLTSPQRSPRPKSSVKATAFQFESHNGTVREEQEPLGRVNAIA
FPTQQNVDIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSAAQAHLSLERDEFDQTHRKKIIKDVPGT
SDKVITFELAKNWNNSPKNDARSQESEDEEDIINPVRVGPGLQEFGAGAGAGAGA

T33(+4) LxF2,3:

MTPSTPPRSRGTRYLAQPSGNTSSSALMQGQKTPQKPPQKPSQNLVPVTPSTTKSFKN
APLLAPPNSNMGMTSPRNGLTSPQRSPRPKSSVPEKLQFYESHNGTVREEQEPLGRP
EKLQFYTQQNVDIDAAKEEEEEGEAAAAASRPTSARQLHLSLERDEFDQTHRKKIIKD
VPGTSPDKVITFELAKNWNNSPKNDARSQESEDEEDIINPVRVGPGLQEFGAGAGAGA
GAGA

AP:

MSPSSPPRSRGTAYAAQPSGNTSSSALMQGQKSPQKPSQNLVPVAPSATKSFKNAPLL
APPNSNMGMTSPRNGLTAPQRAPRPKSSVKATAFQFESHNGTVREEQEPLGRVNAI
AFPTQQNVDIDAAEEEEEGEAAAAASRPTSAAQAHLSLERDEFDQTHRKKIIKDVPGT
PSDKVITFELAKNWNNSPKNDARSQESEDEEDIINPVRVGPGLQEFGAGAGAGAGA

degron

asendatav AH

asendatud R-ga +2 positsioonis

AxA/RxL/LxF

Sic1[1-117]

wt:

MTPS^TPPRSRGT^{RYL}AQPSGNTSSSALMQGQK^TTPQKPSQNLVPV^{TPST}TKSFKNAPLL
APPNSNMGMT^{SPFNGLTSPQRS}PFPKSSVK^{RTL}FQFESHNGTVREEQEPLGRVNR^{IL}

T5S T33S:

MSPS^SPPRSRGT^{AYA}AQPSGNTSSSALMQGQK^STPQKPSQNLVPV^{TPST}TKSFKNAPLL
APPNSNMGMT^{SPRNGLTSPQRS}PRPKSSVK^{ATA}FQFESHNGTVREEQEPLGRVNR^{AIA}

T33(+4) LxF2 RxL3:

MTPS^TPPRSRGT^{AYA}AQPSGNTSSSALMQGQK^TTPQKPPQKPSQNLVPV^{TPST}TKSFKN
APLLAPPNSNMGMT^{SPRNGLTSPQRS}PRPKSSV^{PEKLQFY}ESHNGTVREEQEPLGR^R
^{IL}

AP:

MTPS^TPPRSRGT^{AYA}AQPSGNTSSSALMQGQK^TTPQKPSQNLVPV^{APSA}TKSFKNAPL
LAPPNSNMGMT^{SPRNGLTAPQRA}PRPKSSVK^{ATA}FQFESHNGTVREEQEPLGRVNR^{IA}

Far1[1-393]+Clb5[1-133] kombinatsioonid

wt+wt:

MKTPTRVSFEKKIHTPPSGDRDAERSPPKKFLRGLSGKVFRKTPEFKKQQMPTFGYIE
ESQFTPNLGLMMSKRGNIKPLNLSKPI^{SPPPS}LKKTAGSVASGFSKTGQLSALQSPVN
ITSSNKYNIKATNLTTSLRESISDSTTMCDTLSDINLTVMDEDYRIDGDSYEEEDSPTF
MISLERNIKKCNSQFSPKRYIGEKCCLICEESISSTFTGEKVVESTCSHTSHYNCYLMLFE
TLYFQGGKFPECKICGEVSKPKDKDIVPEMVSKLLTGAGAHDDGPSSNMQQQWIDLKT
ARSFTGEFPQFTPQEQLIRTADISCDGFRTPLRSNSNQFEAVSYLDSPFNLSPFVNKMA
TDPFDLSDDEKLDCCDEIDESAAEVWFSKTGGEHVMVSV^{MGENHDHEQSIKRNSMI}
^{YNENERQLCNSNLKILQNKRALSKNDSSSKQQVQDSKP}^{RRALTDV}^{PVNNNPLSQNKR}
^{IVAGSKAAKVRREENIRPIVSAVQ}^{KRQIYND}^{RTAAEQEEEEEEGEDDDAASIVNKKR}
^R

AP+wt:

MKTPTRVSFEKKIHTPPSGDRDAERSPPKKFLRGLSGKVFRKTPEFKKQQMPTFGYIE
ESQFTPNLGLMMSKRGNIPKPLNLSKPIA**PPPA**LKKTAGSVASGFSGKTGQLSALQSPV
NITSSNKYNIKATNLTTSLRESISDSTTMCDTSLDINLTVMDDEDYRIDGDSYYEEDSP
TFMISLERNIKKCNSQFSPKRYIGEKCLICEESISSTFTGEKVVESTCSHTSHYNCYLML
FETLYFQGGKFPECKICGEVSKPKDKDIVPEMVSKLLTGAGAHDDGPSSNMQQQWIDL
KTARSFTGEFPQFTPQEQLIRTADISCDGFRTPRLSNSNQFEAVSYLDSPFLNSPFVNK
MATDPPFDLSDDEKLDCDDEIDESAAEVWFSKTGGEHVMVSV**MGENHDHEQSIKRN**
SMIYNENERQLCNSNLKILQNKRALSKNDSSSKQQVQDSKPRRALTDVPVNNNPLSQ
NKRIVAGSKAAKVRREENIRPIVSAVQKRQIYNDRTAAEQEEEEEEGEDDDAASIVN
KKRR

AP+ala:

MKTPTRVSFEKKIHTPPSGDRDAERSPPKKFLRGLSGKVFRKTPEFKKQQMPTFGYIE
ESQFTPNLGLMMSKRGNIPKPLNLSKPI**SPPPS**LKKTAGSVASGFSGKTGQLSALQSPVN
ITSSNKYNIKATNLTTSLRESISDSTTMCDTSLDINLTVMDDEDYRIDGDSYYEEDSPTF
MISLERNIKKCNSQFSPKRYIGEKCLICEESISSTFTGEKVVESTCSHTSHYNCYLMLFE
TLYFQGGKFPECKICGEVSKPKDKDIVPEMVSKLLTGAGAHDDGPSSNMQQQWIDLKT
ARSFTGEFPQFTPQEQLIRTADISCDGFRTPRLSNSNQFEAVSYLDSPFLNSPFVNKMA
TTDPPFDLSDDEKLDCDDEIDESAAEVWFSKTGGEHVMVSV**MGENHDHEQSIKRN**SMI
YNENERQLCNSNLKILQNKRALSKNDSSSKQQVQDSKPARAATDV**PVNNNPLSQNK**
RIVAGSKAAKVRREENIRPIVSAVQAAQIANDRTAAEQEEEEEEGEDDDAASIVNKK
RR

wt+ala:

MKTPTRVSFEKKIHTPPSGDRDAERSPPKKFLRGLSGKVFRKTPEFKKQQMPTFGYIE
ESQFTPNLGLMMSKRGNIPKPLNLSKPIA**PPPA**LKKTAGSVASGFSGKTGQLSALQSPV
NITSSNKYNIKATNLTTSLRESISDSTTMCDTSLDINLTVMDDEDYRIDGDSYYEEDSP
TFMISLERNIKKCNSQFSPKRYIGEKCLICEESISSTFTGEKVVESTCSHTSHYNCYLML
FETLYFQGGKFPECKICGEVSKPKDKDIVPEMVSKLLTGAGAHDDGPSSNMQQQWIDL
KTARSFTGEFPQFTPQEQLIRTADISCDGFRTPRLSNSNQFEAVSYLDSPFLNSPFVNK
MATDPPFDLSDDEKLDCDDEIDESAAEVWFSKTGGEHVMVSV**MGENHDHEQSIKRN**

SMIYNENERQLCNSNLKILQNKRALSKNDSSSKQQVQDSKPARAATDVPVNNNPLSQ
NKRIVAGSKAAKVRREENIRPIVSAVQAAQIANDRTAAEQEEEEEEGEDDDAASIVN
KKRR

D-box

ABBA motif

->A

Degron

Clb5

Far1[1-150]+Clb5[1-133] kombinatsioonid

Wt+wt

MKTPTRVSFEKKIHTPPSGDRDAERSPPKKFLRGLSGKVFRKTPEFKKQQMPTFGYIE
ESQFTPNLGLMMSKRGNIPKPLNLSKPI~~SPPPS~~LKKTAGSVASGFSKTGQLSALQSPVN
ITSSNKYNIKATNLTTSLRESISDSTTMCDTLMGENHDHEQSIKRNSMIYNENERQLC
NSNLKILQNKRALSKNDSSSKQQVQDSKPRRALTDVPVNNNPLSQNKRIVAGSKAAK
VRREENIRPIVSAVQKRQIYNDRTAAEQEEEEEEGEDDDAASIVNKKRR

AP+wt

MKTPTRVSFEKKIHTPPSGDRDAERSPPKKFLRGLSGKVFRKTPEFKKQQMPTFGYIE
ESQFTPNLGLMMSKRGNIPKPLNLSKPIA~~PPPA~~LKKTAGSVASGFSKTGQLSALQSPV
NITSSNKYNIKATNLTTSLRESISDSTTMCDTLMGENHDHEQSIKRNSMIYNENERQL
CNSNLKILQNKRALSKNDSSSKQQVQDSKPRRALTDVPVNNNPLSQNKRIVAGSKAA
KVRREENIRPIVSAVQKRQIYNDRTAAEQEEEEEEGEDDDAASIVNKKRR

AP+ala

MKTPTRVSFEKKIHTPPSGDRDAERSPPKKFLRGLSGKVFRKTPEFKKQQMPTFGYIE
ESQFTPNLGLMMSKRGNIPKPLNLSKPIA~~PPPA~~LKKTAGSVASGFSKTGQLSALQSPV
NITSSNKYNIKATNLTTSLRESISDSTTMCDTLMGENHDHEQSIKRNSMIYNENERQL
CNSNLKILQNKRALSKNDSSSKQQVQDSKPARAATDVPVNNNPLSQNKRIVAGSKAA
KVRREENIRPIVSAVQAAQIANDRTAAEQEEEEEEGEDDDAASIVNKKRR

Wt+ala

MKTPTRVSFEKKIHTPPSGDRDAERSPPKKFLRGLSGKVFRKTPEFKKQQMPTFGYIE
ESQFTPNLGLMMSKRGNIPKPLNLSKPI**SPPPS**LKKTAGSVASGFSKTGQLSALQSPVN
ITSSNKYNIKATNLTTSLLRESISDSTTMCDTL**MGENHDHEQSIKRNSMIYNENERQLC**
NSNLKILQNKRALSKNDSSSKQQVQDSKPARAA**TDV****PVNNNPLSQNKRIVAGSKAA**
KVRREENIRPIVSAVQAAQI**ANDRTAAEQEEEEEEGEDDDAASIVNKKRR**

D-box

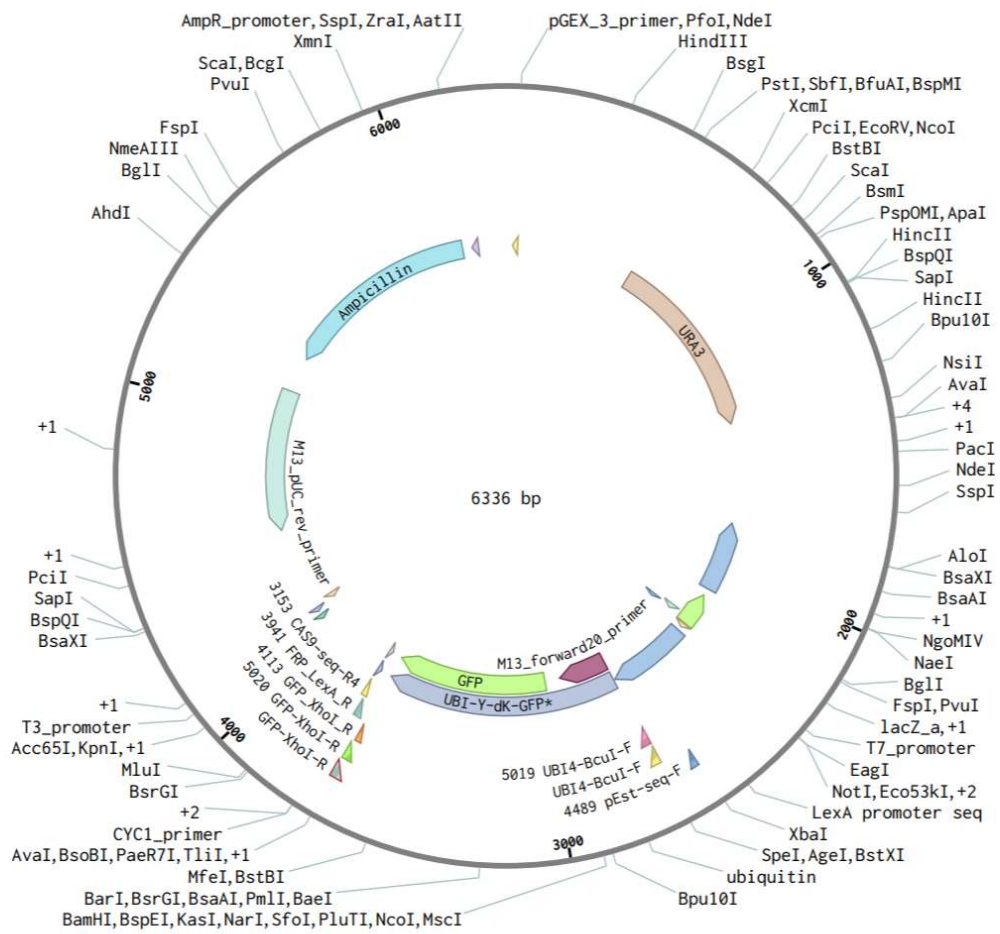
ABBA motif

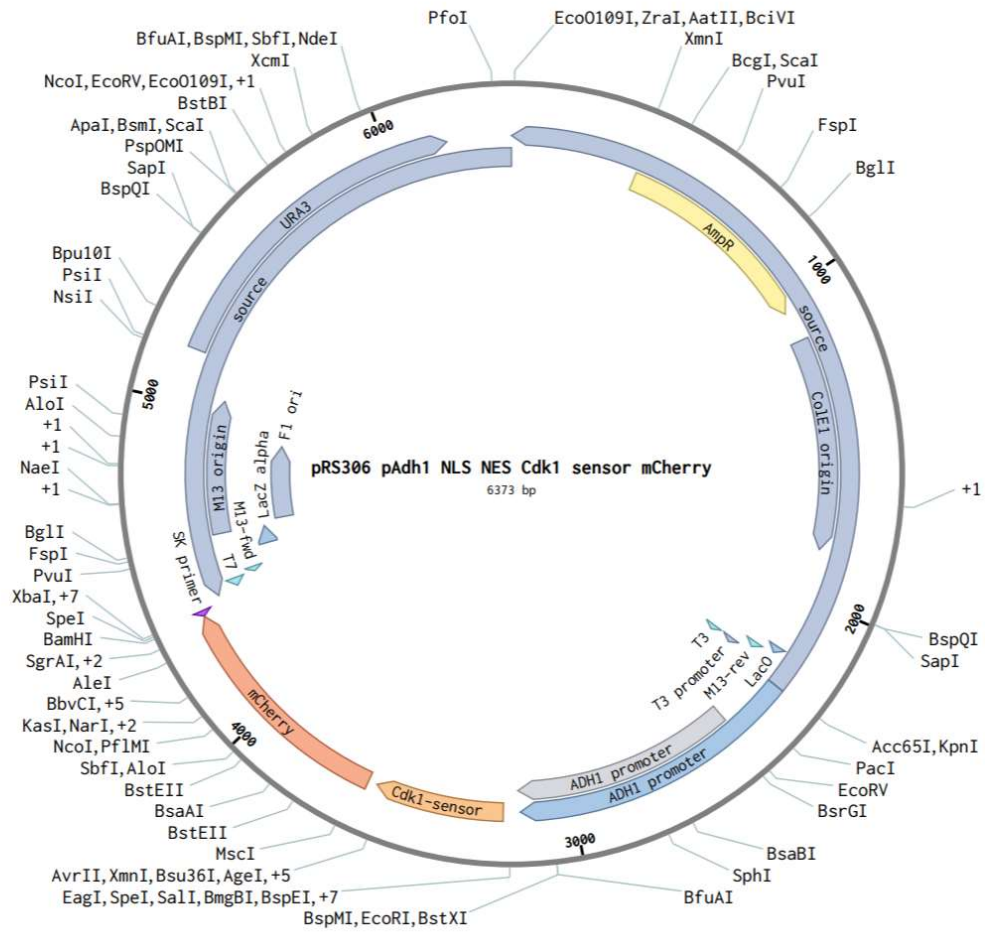
->A

Degron

Clb5

LISA 4: Fluorestsentsmarkereid sisaldavad plasmiidid





Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristel Alman,

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

Rakutsüklilist sõltuvate ostsillaatorite ekspressiooni reguleerimine sünteetilise transkriptsioonifaktori abil *Saccharomyces cerevisiae*'s

mille juhendajad on PhD Rait Kivi ning prof. Mart Loog,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **11.06.2025** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

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

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

Kristel Alman

11.06.2020