

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

Mihkel Örd

**G1-faasi tsükliinist sõltuva kinaasi kompleksi Cln2-Cdk1  
substraatide valiku mehhanismid**

Magistritöö (30 EAP)

Molekulaar- ja rakubioloogia eriala

Juhendaja prof. Mart Loog

TARTU 2016



## **Infoleht**

### **G1-faasi tsükliinist sõltuva kinaasi kompleksi Cln2-Cdk1 substraatide valiku mehhanismid**

*Saccharomyces cerevisiae* Cdk1 reguleerib erinevate valkude fosforüleerimise kaudu kogu rakutsükli toimimist. Eri aegadel seondub Cdk1 erinevate tsükliinidega. Mitmed Cdk1 substraadid on enim fosforüleeritud G1-faasis, mil Cdk1 on kompleksis tsükliiniga Cln2. Käesolevas töös uuriti, mis mehhanismid võimaldavad Cln2-spetsiifilist fosforüleerimist. Esmalt leiti, et mitmete Cln2-Cdk1 substraatide fosforüleerimine ei vaja varem kirjeldatud LP-seondumist. Substraatide Sli15, Bud2 ja Rtt109 uurimisel selgus, et Cln2-Cdk1-vahendatud fosforüleerimist soodustavad lüsiini- või arginiinijääkide rikkad seondumismotiivid (KR-motiiv), millest tugevaima mõjuga on  $\alpha$ -heeliksid, milles on vähemalt kolm positiivselt laetud aminohappejääki järjestikku heeliksi ühel küljel. Lisaks leiti Cln2 mutandid, millel on vähenenud spetsiifiline aktiivsus, ning näidati LP- ja KR-motiivide osalust polariseeritud kasvus. Veel näidati, et Cln2-Cdk1 reguleerib Sli15 paiknemist KR-seondumise abil.

Märksõnad: rakutsükkel, tsükliinist sõltuv kinaas, fosforüleerimine

CERCS kood: P310 (Proteiinid, ensüümid)

### **Abstract**

#### **Substrate recognition mechanisms of G1-phase cyclin-dependent kinase complex Cln2-Cdk1**

Cyclin-dependent kinases (CDK) are central regulators of cell cycle. During cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* Cdk1 is activated by different cyclins. Several Cdk1 targets are specifically phosphorylated in G1-phase by Cln2-Cdk1 complex. This work shows that a novel substrate docking interaction governs the phosphorylation specificity of a group of Cln2-Cdk1 targets. The novel docking motif was determined as a lysine- or arginine-rich sequence (KR motif) that is found in substrates either as a linear motif or as an  $\alpha$ -helix with sequential basic amino acids on one side of the helix. Cln2 mutants specifically defective in either LP or KR interaction were identified and KR-dependent phosphorylation of 10 Cln2-Cdk1 substrates was shown. KR docking mediates Cln2 function in polarized growth and in regulation of Sli15 localization.

Key words: cell cycle, cyclin-dependent kinase, phosphorylation

CERCS: P310 (Proteins, enzymology)

# Sisukord

Kasutatud lühendid	6
Sissejuhatus	7
Kirjanduse ülevaade	8
1.1. Kinaasid kui rakuliste protsesside kesksed regulaatorid	8
1.2. Tsükliinist sõltuvad kinaasid <i>S. cerevisiae</i> mitoetilise rakutsükli regulatsioonis	8
1.2.1. G1-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid	10
1.2.1.1. G1-tsükliinid aktiveerivad rakutsükli G1/S ülemineku	11
1.2.1.2. Cln1- ja Cln2-Cdk1 inhibeerivad feromooni raja	13
1.2.1.3. Cln1- ja Cln2-Cdk1 aktiveerivad punga morfogeneesi	14
1.2.1.4. G1-tsükliinid osalevad käävi polaarkehade duplikatsioonis	15
1.2.1.5. Cln2-Cdk1 fosforüleerib Sli15 valku <i>in vitro</i>	15
1.3. Kinaaside substraatide äratundmismehhanismid	16
1.3.1. Tsükliinist sõltuvate kinaaside substraatide äratundmismehhanismid	16
1.3.1.1. Cdk1 aktiivtsentri spetsiifika	17
1.3.1.2. Fosfoadaptorvalk Cks1	18
1.3.1.3. Tsükliinide seondumine substraatvalkudega	19
2. Eksperimentaalosa	23
2.1. Töö eesmärgid	23
2.2. Materjal ja meetodika	23
2.2.1. Algtüved ja söötmed	23
2.2.2. DNA konstruktide tegemine	24
2.2.2.1. Konstruktide tegemine polümeraasi ahelreaktsiooni abil	24
2.2.2.2. Konstruktide valmistamine oligonukleotiidi poolt suunatud mutageneesiga	25
2.2.2.3. <i>E. coli</i> transformatsioon	26
2.2.3. <i>S. cerevisiae</i> tüvede valmistamine	26
2.2.4. GST-Cln2-Cdk1 komplekside puhastamine	27
2.2.5. GST-märgisega substraatvalkude puhastamine	28
2.2.6. 6xHis-märgisega valkude puhastamine	29
2.2.7. Kinaaside aktiivsuse mõõtmine <i>in vitro</i>	29

2.2.8. <i>Western Blot</i>	31
2.2.9. Punga polariseeritud kasvu katse	32
2.2.10. Tilkkülvi katse	33
2.2.11. Elusraku mikroskoopia	33
2.3. Tulemused ja arutelu	34
2.3.1. Mitmete Cln2-Cdk1 substraatide fosforüleerimine toimub sõltumatult LP-interaktsioonist	34
2.3.2. Positiivselt laetud motiiv soodustab Sli15, Bud2 ja Rtt109 fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt	35
2.3.3. Vähenenud spetsiifilise aktiivsusega Cln2 mutantide kirjeldamine	41
2.3.4. KR-seondumine soodustab mitmete Cln2-Cdk1 substraatide fosforüleerimist	44
2.3.5. Cln2(lpd2) ja Cln2(krd1) tsükliinid toimivad G1/S ülemineku regulatsioonis sarnaselt metsiktüüpi Cln2 tsükliiniga	46
2.3.6. Cln2-Cdk1 osaleb pungumise regulatsioonis nii LP- kui ka KR-seondumise kaudu	48
2.3.7. Cln2-Cdk1 reguleerib Sli15 lokalisatsiooni KR-seondumise abil	50
2.3.8. KR-seondumismotiivi fosforüleerimine nõrgendab selle mõju Cln2-Cdk1-vahendatud fosforüleerimisele	53
Kokkuvõte	56
Kirjanduse loetelu	58
Kasutatud veebiaadressid	66
Lisad	67
Lisa 1. Kasutatud Cln2 mutandid.	67
Lisa 2. PKA fosforüleerimissaidid ennustuslikes Cln2 seondumismotiivides	68
Lisa 3. Kasutatud pärmitüved	68
Lisa 4. Kasutatud plasmiidid	68
Lisa 5. Katsetes kasutatud tüved ja plasmiidid	71
Lihtlitsents	72

## Kasutatud lühendid

2xYT – i.k *2x Yeast Extract Tryptone* (2x pärmiekstrakt, trüptoon)

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

DTT – ditiotreitol

GFP – i.k *Green Fluorescent Protein* (rohelistelt flourestseeruv valk)

GST – glutatioon-S-transferaas

KR-motiiv – lüsiini- ja arginiinijääkide rikas motiiv, mis soodustab Cln2-Cdk1 vahendatud fosforüleerimist

Krd – i.k *KR docking* (KR-seondumine)

LB sööde – Luria-Bertani sööde

LP-motiiv – leutsiini- ja proliinijääkide rikas motiiv, mis soodustab Cln1/2-Cdk1 vahendatud fosforüleerimist

Lpd – i.k *LP docking* (LP-seondumine)

MAP – i.k *Mitogen-Activated Protein* (mitogeeni poolt aktiveeritud valk)

MBF – Mbp1 ja Swi6 kompleks

OD<sub>600</sub> – i.k *Optical Density 600 nm* (optiline tihedus lainepikkusel 600 nm)

PEST-motiiv – proliinide, glutamaatide, seriinide ja treoniinide rikas motiiv

PKA – cAMP-sõltuv proteiinkinaas A

PMSF – i.k *phenylmethylsulfonyl fluoride* (fenüülmetüülsulfonüül fluoriid)

pRB – i.k *Retinoblastoma protein* (retinoblastoomi valk)

RxL-motiiv – aminohappeline motiiv, mis soodustab fosforüleerimist S-faasi tsükliin-CDK komplekside poolt

SBF – Swi4 ja Swi6 kompleks

SC – i.k *Synthetic Complete* (süntetiline täissööde)

SCF – i.k *Skp, Cullin, F-box*

SDS-PAA – SDS-polüakrüülamiid

ssDNA – *single-stranded DNA* (üheahelaline DNA)

TORC1 – i.k *Target Of Rapamycin Complex 1* (rapamütsiini märklaua kompleks)

Wt – i.k *wildtype* (metsiktüüpi)

YPD - i.k *Yeast Extract Peptone Dextrose* (pärmie ekstrakt, peptoon, glükoos)

## Sissejuhatus

Tsükliinist sõltuvad kinaasid (CDK-d) on proteiinkinaasid, mis valkude fosforüleerimise kaudu reguleerivad rakutsükliit. Pärnis *Saccharomyces cerevisiae* on rakutsükliit reguleerimise kesksel kohal Cdk1, mis on vajalik nii G1-, S- kui ka M-faasi läbimiseks. Cdk1 seondub erinevates rakutsükliit faasides erinevate tsükliinidega, mis annavad Cdk1 kompleksile funktsionaalse spetsiifilisuse, mõjutades kompleksi aktiivsust ning seondumist substraat- ja inhibiitorvalkudega. Rakutsükliit toimimiseks peab Cdk1 substraatide fosforüleerimine toimuma kindlas järjekorras ja seetõttu on oluline uurida, kuidas tsükliinid mõjutavad Cdk1 kompleksi substraatide valiku mehhanisme.

Rakutsükliit järjestikused tsükliinid tõstavad Cdk1 üldist aktiivsust ning varaste tsükliin-Cdk1 komplekside madalam aktiivsus võib olla vajalik välistamiseks hilisemate protsesside enneaegset käivitamist. Siiski on mitmed Cdk1 substraadid enim fosforüleeritud G1-faasis, kui Cdk1 on kompleksis tsükliinidega Cln1, Cln2 ja Cln3. Vastavad kompleksid aktiveerivad G1/S transkriptsiooniprogrammi, algatavad punga tekke ning osalevad käävi polaarkehade duplikatsioonil ja hilisemate tsükliin-Cdk1 komplekside inhibiitorvalgu lagundamisel. Cln2 seondumine substraatvalkudes olevate leutsiini- ja proliinijääkide rikaste motiividega (LP-motiiv) stimuleerib mitmete Cln2-Cdk1 substraatide fosforüleerimist. Samas ei ole selge, milline on LP-interaktsiooni olulisus suurema hulga Cln2-Cdk1 substraatide fosforüleerimisel. Varem on leitud üks Cln2-Cdk1 substraat, mis seondub kinaasikompleksiga mingi muu mehhanismi abil. Lisaks on leitud, et LP-seondumine ei ole hädavajalik Cln2-spetsiifiliste funktsioonide täitmiseks punga tekkel, mistõttu võib Cln2-Cdk1 kompleksil olla täiendav spetsiifilise fosforüleerimise mehhanism.

Käesoleva magistr töö kirjanduse osas antakse ülevaade kinaasist Cdk1, keskendudes G1-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksidele, ning Cdk1 substraatide valiku mehhanismidest. Eksperimentaalosa eesmärkideks on uurida LP-mehhanismi olulisust substraatide fosforüleerimisel, kirjeldada täiendav mehhanism Cdk1 substraatide Cln2-spetsiifiliseks fosforüleerimiseks, leida Cln2 mutandid, millel on vähenenud spetsiifiline aktiivsus ning uurida tsükliin-substraat seondumiste olulisust Cln2-Cdk1 kompleksi funktsioonide täitmisel *in vivo*.

## Kirjanduse ülevaade

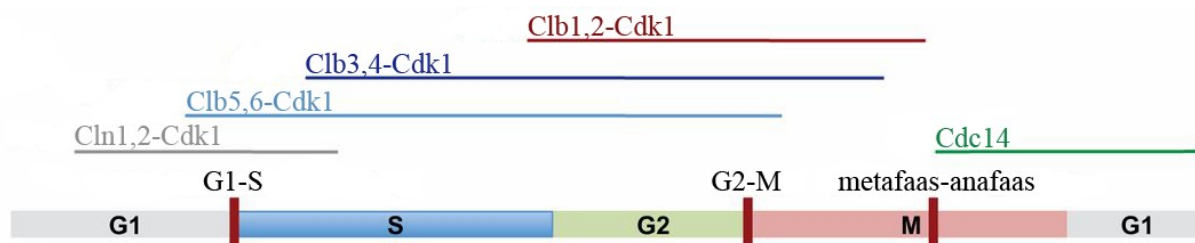
### 1.1. Kinaasid kui rakuliste protsesside kesksed regulaatorid

Rakud on võimelised kiiresti reageerima nii rakusiseste kui ka rakuväliste tingimuste muutustele. Valkude aktiivsuse ja funktsioonide kiire muutmine toimub läbi valkude post-translatsiooniliste modifikatsioonide, millest eukarüootides üks levinuim on fosforüleerimine (Cohen, 2002). Fosforüleerimine on pööratav modifikatsioon, võimaldades seeläbi dünaamilist regulatsiooni (Humphrey jt, 2015). Valkude fosforüleerimine võib reguleerida nende lokaliseerimist rakus, seondumist teiste valkude või nukleiinhapetega, stabiilsust ja ensümaatilist aktiivsust, mõjutades seeläbi rakkude metabolismi, transkriptsiooni ja translatsiooni, jagunemist, diferentseerumist ning mitmeid teisi protsesse (Mok jt, 2010). Pärmsis *Saccharomyces cerevisiae* on leitud üle 10000 erineva fosforüleeritud peptiidi, mis pärinevad rohkem kui 2000 valgult, mis on omakorda kolmandik kogu pagaripärmi proteoomist (Holt jt, 2009; Swaney jt, 2013). Valke fosforüleerivad proteiinkinaasid, millest enamik sisaldab homoloogilist 250–300 aminohappelist katalüütilist domääni (Hanks ja Hunter, 1995). Eukarüootsed proteiinkinaasid fosforüleerivad seriini-, treoniini- ja türosiinijääke ning nad on üks suurimatest homoloogiliste valkude perekondadest – umbes 2% eukarüootide geenidest kodeerivad proteiinkinaase (Manning jt, 2002). Selleks, et mõista, kuidas üks homoloogiliste valkude perekond suudab kontrollitult läbi viia kolmandiku proteoomi fosforüleerimise, on vaja uurida, mille alusel kinaasid oma substraate valivad.

### 1.2. Tsükliinist sõltuvad kinaasid *S. cerevisiae* mitootilise rakutsükli regulatsioonis

Tsükliinist sõltuvad kinaasid (i.k. *Cyclin-dependent Kinase* ehk CDK) on rakutsükli kesksed regulaatorid, mis on hädavajalikud nii rakutsükliga seotud transkriptsiooniprogrammi aktiveerimiseks, DNA replikatsiooniks, mitoosikäivi moodustumiseks kui ka kromosoomide lahknemiseks (Enserink ja Kolodner, 2010). Kuigi tsükliinist sõltuvaid kinaase on mitmeid, piisab kogu rakutsükli läbimiseks nii pärmides kui ka imetajarakkudes kinaasist Cdk1 (Santamaría jt, 2007). Evolutsiooni käigus on Cdk1 vähe muutunud – inimese Cdk1 valk on võimeline asendada pagaripärmi Cdk1 valku pärmirakkudes (Ninomiya-Tsuji jt, 1991). Pärmis *S. cerevisiae* *CDK1* geen kodeerib 298-aminohappelist valku, mis moodustab kinaasi katalüütilise domääni (Lörincz ja Reed, 1984). CDK-d seonduvad tsükliinidega, moodustades ensümaatilist aktiivset kompleksi. Tsükliini seondumine CDK-ga indutseerib kinaasi struktuuris konformatsioonilised muutused, mis võimaldavad substraatvalkudele ligipääsu

kinaasi katalüütilisse tsentrisse ning orienteerivad adenosiintrifosfaadi sobivalt  $\gamma$ -fosfaadi ülekandeks substraatvalgule (Jeffrey jt, 1995). Lisaks CDK aktiveerimisele annavad tsükliinid kompleksile funktsionaalse spetsiifilisuse, mõjutades kompleksi lokalisatsiooni ning seondumist substraatide ja inhibiitoritega (Quilis ja Igual, 2012). Cdk1 valgu tase on kogu rakutsükli vältel konstantne, kuid Cdk1 aktiivsus on reguleeritud tsükliinide taseme ostsilleerumisega (Nasmyth, 1993). Pagaripärmi Cdk1 moodustab rakutsükli jooksul kompleksi üheksa tsükliiniga (joonis 1). G1-faasis seonduvad Cdk1-ga tsükliinid Cln3, Cln1 ja Cln2 ning indutseerivad rakutsükli transkriptsiooniprogrammi, punga tekke ja käävi polaarkehade duplikatsiooni (Dirick jt, 1995). Rakutsükli S-faasis on aktiivsed Clb5-Cdk1 ja Clb6-Cdk1 kompleksid, mis algatavad DNA replikatsiooni (Schwob ja Nasmyth, 1993). S- ja G2-faasis seonduvad Cdk1 tsükliinidega Clb3 ja Clb4, mis osalevad mitoosikäävi regulatsioonis, ning mitootilisi protsesse reguleerivad Clb1- ja Clb2-Cdk1 kompleksid (Richardson jt, 1992). Tsütokineesi toimumiseks ja G1-faasi naasemiseks on vajalik Cdk1 aktiivsuse kadumine ja Cdk1 substraatide defosforüleerimine (Sullivan ja Morgan, 2007). Mitoosi anafaasis ubikvitinüleerib ubikvitiini ligaasi kompleks APC (i.k *Anaphase Promoting Complex*) mitootilised tsükliinid, mistõttu need tsükliinid lagundatakse ning Cdk1 aktiivsus kaob (Mendenhall ja Hodge, 1998). Üleminekul metafasiist anafaasi vabanev separaas algatab nii tütarkromatiidide lahknemise kui ka vabastab fosfataasi Cdc14 inhibitoorsest kompleksist, misjärel Cdc14 defosforüleerib Cdk1 substraadid (Visintin jt, 1999).



**Joonis 1. *S. cerevisiae* Cdk1 seonduvad rakutsükli eri etappides erinevate tsükliinidega.** (kohandatud Fisher jt, 2012).

Erinevate tsükliinide funktsioonid on osaliselt kattuvad, kusjuures üksikshaaval ei ole ühegi tsükliini deletsioon pagaripärmile letaalne (Richardson jt, 1989; Schwob ja Nasmyth, 1993; Richardson jt, 1992). Erinevate tsükliinide olulisus on mitootilises ja meiootilises rakutsükklis erinev. Näiteks mitootilises rakutsükklis on M-faasis kesksed tsükliinid Clb2 ja Clb3, kuid meioosis asendavad neid nende paralooigid Clb1 ja Clb4 (Dahmann ja Futcher, 1995).

CDK-de aktiivsuse regulatsioonis on olulisel kohal veel CDK fosforüleerimine, mis võib olla kas aktiveeriv või inhibeeriv, ja inhibiitorvalkude seondumine (Morgan, 1997).

## 1.2.1. G1-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid

Pärmis *S. cerevisiae* on kolm tsükliini (Cln1, Cln2, Cln3), mis moodustavad kinaasiga Cdk1 rakutsükli G1-faasis aktiivse kompleksi (Reed jt, 1989; Richardson jt, 1989). Tsükliinid Cln1 ja Cln2 on paraloogid ning nad on primaarjärjestuselt üsna sarnased (aminohappeline järjestus 57% identne) (Hadwiger jt, 1989). Cln3 ei ole aminohappeliselt järjestuselt aga tsükliinidega Cln1 ja Cln2 oluliselt sarnasem kui teiste tsükliinidega (Hadwiger jt, 1989b). Ükski neist kolmest tsükliini geenist ei ole hädavajalik, kuid kõigi kolme G1-tsükliini puudumisel peatub rakutsükkel G1-faasis (Richardson jt, 1989). Samas ei ole kõik kolme G1-tsükliini funktsioonid omavahel kattuvad (Dirick jt, 1995). Lisaks on nende tsükliinide aktiivsuse aeg rakutsükliks erinev – Cln3 ekspresseerub alates varasest G1-faasist, kuid Cln1 ja Cln2 ekspresseeruvad lühema perioodi jooksul hilises G1-faasis (Dirick ja Nasmyth, 1991; Tyers jt 1993). Ekspressiooniprofiili ja aminohappelise järjestuse alusel sarnaneb Cln3 imetajate tsükliiniga D1, kuid Cln1 ja Cln2 tsükliiniga E (Hatakeyama jt, 1994).

G1-faasi tsükliinid on väga ebastabiilsed isegi G1-faasis – nende eluiga on 5-10 minutit (Lanker jt, 1996; Schneider jt, 1998). Tsükliinidel Cln1, Cln2 ja Cln3 on peale struktuurse domääni veel 150–185 aminohappejäägi pikkune C-terminaalne mittestruktureeritud ala, mis põhjustab G1-tsükliinide ebastabiilsuse (Tyers jt, 1992; Salama jt, 1994). G1-faasi tsükliinide degradatsioon on reguleeritud nende C-terminaalse ala fosforüleerimisega (Lanker jt, 1996). Kõnealuste tsükliinide kõrgema struktuurita ala sisaldab ebastabiilsetele valkudele omaseid proliini-, glutamiinhappe-, seriini- ja treoniinijääkide rikkaid järjestusi (PEST-motiive), mille läheduses paiknevad Cdk1 fosforüleerimismotiivid. Fosforüleeritud PEST-motiividega seonduvad SCF (i.k. *Skp1-Cullin-F-box*) ubikvitiini ligaasi kompleksid, mis ubikvitinüleerimise kaudu suunavad G1-tsükliinid lagundamisele (Deshaies jt, 1995; Skowrya jt, 1997). Tsükliini Cln3 fosforüleerimine toimub peamiselt *cis*-mehhanismiga, nii et Cdk1 fosforüleerib endaga seondunud tsükliini C-terminaalset ala (Landry jt, 2012). Samas Cln2 fosforüleerimist viivad olulisel määral läbi teised Cln2-Cdk1 kompleksid (*trans*-mehhanism) (Lanker jt, 1996). Nii Cln2 valgu kui ka fosforüleerituse tase tõusevad G1-faasi jooksul (Miller ja Cross, 2001), mistõttu võib Cln2 piisava taseme saavutamisel iseenda taset degradatsiooni kaudu langetada (Lanker jt, 1996). Fosfataas Cdc55-PP2A defosforüleerib Cln2 valku ning hoiab seeläbi Cln2 valgu taset üleval (McCourt jt, 2013). Piisava toitainete kontsentratsiooni korral stimuleerib kinaas TORC1 (i.k. *Target Of Rapamycin Complex 1*) fosfataasi Cdc55-PP2A aktiivsust (Moreno-Torres jt, 2015), mis võib siduda G1-faasi kestvuse keskkonnatingimustega. G1-faasi tsükliinide proteolüütiline degradatsioon on vajalik rakutsükli normaalseks toimimiseks, kuna stabiliseeritud (ilma C-terminaalse alata) Cln3

tsükliini ekspresseerivates rakkudes lüheneb G1-faas ning seeläbi väheneb oluliselt rakkude suurus (Cross, 1988; Nash jt, 1988).

Tsükliinid Cln1 ja Cln3 paiknevad peamiselt rakutuumas, samas kui Cln2 on valdavalt tsütoplasmas (Edgington ja Futcher, 2001; Queralt ja Igual, 2004). Erinevalt tsükliinist Cln1 sisaldab Cln2 tuumaekspordi signaaljärjestust, mis põhjustab Cln2 kogunemise tsütoplasmasse (Quilis ja Igual, 2012). Lisaks Cln2 valgu degradatsioonile on ka Cln2 lokaliseerimine reguleeritud Cln2 C-terminaalse ala fosforüleerimise kaudu, kusjuures Cln2 fosforüleerimine Cdk1 poolt põhjustab Cln2 lokaliseerumise tsütoplasmasse (Edgington ja Futcher, 2001). Cln2 ekspressioonilaine alguses on Cln2 vähem fosforüleeritud ja paikneb peamiselt rakutuumas, kuid rakutsükli edenedes fosforüleerimine suureneb ja Cln2 koguneb tsütoplasmasse (Miller ja Cross, 2001). Seetõttu võib Cln2-Cdk1 kompleks esmalt fosforüleerida tuumas paiknevaid substraatvalke ja seejärel tsütoplasmaatilisi, võimaldades sündmuste ajalisi regulatsiooni.

G1-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid aktiveerivad rakutsükli G1/S transkriptsiooniprogrammi, inaktiveerivad B-tüüpi tsükliinide lagundamise ja Cdk1 inhibiitorivalgu Sic1 ning osalevad punga morfogeneesi regulatsioonis ja käävi polaarkehade duplikatsioonis (Dirick jt, 1995). Hilised G1-tsükliinid Cln1 ja Cln2 osalevad kõigis nimetatud protsessides, kuid Cln3-Cdk1 funktsioon piirdub rakutsükli G1/S transkriptsiooni aktiveerimisega (Dirick jt, 1995).

### **1.2.1.1. G1-tsükliinid aktiveerivad rakutsükli G1/S ülemineku**

*S. cerevisiae* rakutsükli esimene kontrollpunkt on üleminek G1-faasist S-faasi. Rakutsükkel peab olema koordineeritud keskkonnatingumustega ja raku suurusega ning vastav regulatsioon toimub valdavalt G1-faasis (Johnston jt, 1977). Lisaks on haploidsetel pärmirakkudel G1-faasis valik, kas paarduda vastaspaardumistüübist pärmirakuga, moodustades diploidi, või läbida mitootiline rakutsükkel (Hereford ja Hartwell, 1974). G1/S üleminek on pöördumatu – kui rakud on selle punkti läbinud, siis nad enne mitootilise rakutsükli läbimist enam toitainete puudusele või paardumisferomoonile ei reageeri (Hereford ja Hartwell, 1974). G1/S üleminek peab olema kindel ja kiire, kuna koordineerimata ja aeglane DNA replikatsiooni alustamine põhjustab genoomi ebastabiilsust (Lengronne ja Schwob, 2002). G1/S ülemineku toimumine on tagatud positiivse tagasisidega nii G1/S transkriptsiooni aktiveerimisel kui ka Clb-Cdk1 inhibiitori Sic1 lagundamisel (Skotheim jt, 2008, Kõivomägi jt, 2011a).

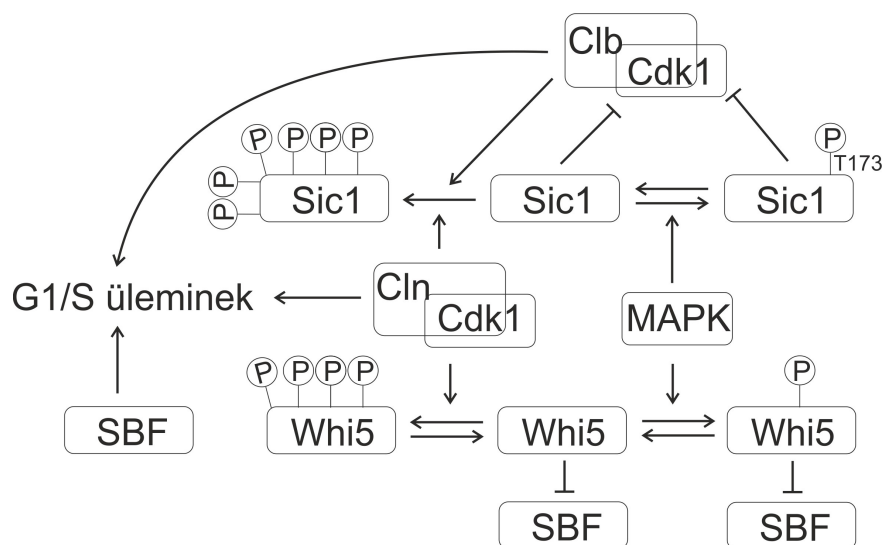
Tsükliinid kirjeldati esmalt kui valgud, mille tase muutub oluliselt rakutsükli jooksul (Evans jt, 1983). Tsükliini Cln3 puhul on aga nii valgu kui ka mRNA tase kogu rakutsükli jooksul

suhteliselt stabiilne ning seetõttu on Cln3 rakutsükli G1-faasis esimene tsükliin, mis aktiveerib kinaasi Cdk1 (Tyers jt, 1993). Cln3-Cdk1 aktiveerib omakorda *CLN1* ja *CLN2* geenide transkriptsiooni (Dirick ja Nasmyth, 1991). G1/S transkriptsiooniprogrammi aktiveerimiseks on vajalikud SBF (Swi4-Swi6 kompleks) ja MBF (Mbp1-Swi6 kompleks) transkriptsioonifaktorid (Dirick jt, 1992). Varases G1-faasis on SBF kompleks inhibeeritud Whi5 poolt, kuid kogunev Cln3-Cdk1 kompleks nõrgendab Whi5 seondumist SBF kompleksiga, aktiveerides osaliselt G1/S transkriptsioonilaine (de Bruin jt, 2004; Costanzo jt, 2004). SBF ja MBF transkriptsioonifaktorid aktiveerivad umbes 200 geeni, sealhulgas tsükliinide *CLN1*, *CLN2*, *CLB5* ja *CLB6*, transkriptsiooni (Ferrezuelo jt, 2010). G1/S transkriptsiooniprogrammi täielikuks aktiveerimiseks on vajalik Whi5 ja Swi6 valkude fosforüleerimine Cln1/Cln2-Cdk1 komplekside poolt (Skotheim jt, 2008). Whi5 fosforüleerimine Cln2-Cdk1 poolt põhjustab Whi5 eksportimise tuumast tsütoplasmasse, kusjuures on leitud, et kui ligikaudu 50% Whi5 valgust on tuumast väljunud, ei saa rakutsükkel enam G1-faasis peatuda ning rakk läbib rakutsükli ka tingimuste muutumisel (Doncic jt, 2011). Cln1 ja Cln2 stimuleerivad positiivse tagasisidega enda ekspressiooni, muutes G1/S ülemineku järsuks ja pöördumatuks (Skotheim jt, 2008).

Rakutsükli G1-faasis on Clb-Cdk1, kuid mitte Cln-Cdk1, komplekside aktiivsus inhibeeritud Sic1 poolt (Schwob jt, 1994). G1/S üleminekul Sic1 valk lagundatakse ning vabanenud Clb5/6-Cdk1 kompleksid algatavad DNA replikatsiooni (Schwob jt, 1994). Sic1 N-terminaalses alas paiknevad Cdk1 fosforüleerimismotiivid. Nende fosforüleerimisel moodustuvad degradatsioonimotiivid, millega seondub SCF ubikvitiini ligaasi kompleks, mis suunab Sic1 ubikvitiini poolt vahendatud proteolüütilisele lagundamisele (Feldman jt, 1997). Sic1 degradatsioonimotiivide täielikuks fosforüleerimiseks ja Sic1 efektiivseks lagundamiseks on vaja nii Cln-Cdk1 kui ka Clb-Cdk1 komplekside aktiivsust (Kõivomägi jt, 2011a). Sic1 inhibitsioonist vabanevad Clb-Cdk1 kompleksid fosforüleerivad omakorda Sic1 valku, kiirendades Sic1 lagundamist ja Clb-Cdk1 komplekside vabanemist (Kõivomägi jt, 2011a). Positiivne tagasiside Sic1 lagundamisel on vajalik, et G1/S üleminek oleks kiire ja pöördumatu (Venta jt, 2012).

Toitainete puudusel või muude stressitegurite korral peatub rakutsükkel G1-faasis (Johnston jt, 1977). Sic1 ja Whi5 fosforüleerimine võib põhjustada ka G1-faasi pikenemist (joonis 2). Toitainete piisava kontsentratsiooni korral stimuleerib TORC1 kinaas rakkude proliferatsiooni, soodustades *CLN3* mRNA translatsiooni ja destabiliseerides Sic1 valku (Barbet jt, 1996; Zinzalla jt, 2007). Seevastu stressi korral aktiveeritavad MAP (i.k *mitogen-activated protein kinase*) kinaasid Hog1 ja Slt2 fosforüleerivad Sic1 C-terminaalse

fosforüleerimissaidi T173, mis stabiliseerib Sic1 valgu, mistõttu Clb-Cdk1 kompleksid inhibeeritakse ja rakud jäävad G1-faasi (Escoté jt, 2004; Moreno-Torres jt, 2015). Põhjus, miks T173 fosforüleerimine stabiliseerib Sic1 valku, ei ole selge. Osmostressi korral aktiveeritav Hog1 fosforüleerib ka transkriptsiooni repressorit Whi5 ning põhjustab G1-tsükliinide ekspressioonitaseme languse (González-Novo jt, 2015). G1/S ülemineku regulatsioonis osaleb ka cAMP-sõltuv proteiinkinaas A (PKA), mis fosforüleerib Swi4 valku, inhibeerides *CLN1* ja *CLN2* geenide transkriptsiooni (Amigoni jt, 2015). Rakutsükliit stimuleeriv Cdk1 ja jagunemist aeglustavad stressikinaasid fosforüleerivad samu G1/S üleminekul osalevaid substraatvalke, kuid vastandlikud regulatsioonirajad eristuvad kinaaside spetsiifilisuse alusel.



**Joonis 2. G1/S ülemineku regulatsioon Sic1 ja Whi5 fosforüleerimise kaudu Cdk1 ja MAP kinaaside poolt.**

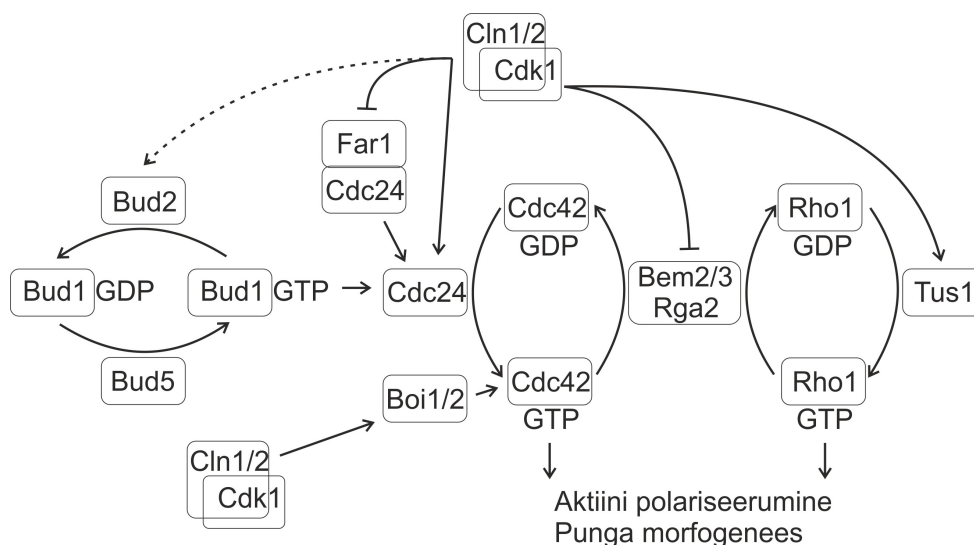
### 1.2.1.2. Cln1- ja Cln2-Cdk1 inhibeerivad feromooni raja

G1-faasis võivad haploidsed pärmid paarduda vastaspaardumistüübist pärmiga ning moodustada diploidse raku. Paardumisferomooni olemasolu korral aktiveerub MAP kinaaside kaskaad, mis peatab rakutsükli G1-faasis (Dohlman ja Thorner, 2001). Aktiveeritav MAP kinaas Fus3 fosforüleerib Far1 valku, mille fosforüleeritud vorm on Cln-Cdk1 komplekside inhibiitor (Gartner jt, 1998). Feromooni puudumisel fosforüleerivad Cln1- ja Cln2-Cdk1 kompleksid MAP kinaaside kaskaadi tugivalgu Ste5, mille tulemusena MAP kinaaside kaskaad katkeb (Strickfaden jt, 2007). Lisaks fosforüleerivad Cln1- ja Cln2-Cdk1 Far1 valku, mis põhjustab Far1 degradatsiooni, ning Ste20 valku (Henchoz jt, 1997; Oehlen ja Cross, 1998). Feromooni signalisatsiooni inhibeerimine on omane tsükliinidele Cln1 ja Cln2, kuid mitte tsükliinile Cln3 (Oehlen ja Cross, 1994).

### 1.2.1.3. Cln1- ja Cln2-Cdk1 aktiveerivad punga morfogeneesi

G1-faasis kasvab rakk ühtlaselt igas suunas, kuid G1/S üleminekul suunatakse membraani kasvuks vajalikud sekretoorsed vesiikulid punkti, kuhu moodustub pung (Lew ja Reed, 1993). Vastavates protsessides osalevad nii Cln1/Cln2-Cdk1 kompleksid kui ka tsükliinist sõltuv kinaas Pho85 koos tsükliinidega Pcl1 ja Pcl2. Nimetatud tsükliinidel on redundantseid funktsioonid punga tekke regulatsioonis, kuid vähemalt ühe hilise G1-tsükliin-Cdk kompleksi aktiivsus on hädavajalik punga tekkeks, kusjuures selles olukorras ei ole Cln3 võimeline asendama tsükliine Cln1 ja Cln2 (Moffat ja Andrews, 2004). Punga tekkeks on vaja tsütoskeleti polariseerumist ning raku kasvu suunamist punga tekkekohta. Punga tekkega seotud morfoloogilised muutused on reguleeritud kolme GTPaasi – Bud1, Cdc42 ja Rho1 poolt, millest vähemalt Cdc42 ja Rho1 aktiivsust mõjutab Cln1/2-Cdk1 kompleks (Enserink ja Kolodner, 2010; joonis 3). Bud1 osaleb punga tekkekohta määramisel ning seondub Cdc42 GTPaasiga, pannes aluse polaarsuse tekkele (Kang jt, 2010). Tsükliin Cln2 seondub Bud1 GTPaasi aktiveeriva valguga Bud2 (Drees jt, 2001), kuid ei ole teada, kas ja kuidas Cdk1 reguleerib Bud1 aktiivsust. Cdc42 on aktiivne kompleksis GTP-ga ning Cdc42-GTP teket reguleerivad nii guaniin-nukleotiidi vahetusfaktor kui ka Cdc42 GTPaasset aktiivsust stimuleerivad valgud. Cdc42-GTP vormi tekkeks on vaja guaniin-nukleotiidi vahetusfaktori Cdc24 seondumist valguga Cdc42. Varases G1-faasis on Cdc42-GTP vormi teke inhibeeritud kahe mehhanismi kaudu: 1) Cdc24 on seondunud valguga Far1 ja paikneb rakutuumas (Shimada jt, 2000), 2) GTPaasi aktiveerivad valgud Bem2, Bem3 ja Rga2 põhjustavad Cdc42-GTP hüdrolyüüsi (Knaus jt, 2007; Sopko jt, 2007). Hilises G1-faasis fosforüleerib Cln1/2-Cdk1 kompleks Far1 valgu, põhjustades selle degradatsiooni, misjärel Cdc24 vabaneb ja lokaliseerub tsütoplasmasse punga tekkekohta, kus Cdc24 aktiveerib GTPaasi Cdc42 (Shimada jt, 2000). Lisaks fosforüleerivad Cln1/2-Cdk1 kompleksid Cdc42 GTPaasset aktiivsust stimuleerivaid valke, vähendades nende aktiivsust (Knaus jt, 2007; Sopko jt, 2007). Polariseeritud kasvuks on vaja ka Boi1 ja Boi2 valkude seondumist Cdc42 kompleksiga (Bender jt, 1996). Cln2-Cdk1 fosforüleerib Boi1 ja Boi2 valgud G1/S üleminekul ning vastav fosforüleerimine on vajalik nende valkude funktsioonide täitmiseks (McCusker jt, 2007). Cdk1 on vajalik ka punga kasvuks, kuna Cdk1 soodustab triatsüülglütseriidide metaboliseerimist membraanilipiidideks ning sekretoorsete vesiikulite liikumist punga (McCusker jt, 2007; Kurat jt, 2009). Vesiikulite transporti ja polaarsel kasvu koordineerib GTPaas Rho1 (Kono jt, 2008). Cln1/2-Cdk1 kompleksid aktiveerivad Rho1 guaniin-nukleotiidi vahetusfaktori Tus1 fosforüleerimise kaudu (Kono jt 2008). Cln2-Cdk1 kompleks stimuleerib punga tipusuunalist kasvu, mistõttu Cln2 üleekspressioon põhjustab pikliku punga

teket, samas Clb-Cdk1 kompleksid põhjustavad punga ühtlast kasvu kõigis suundades (Lew ja Reed, 1993).



**Joonis 3. Punga morfogeneesiga seotud GTPaasid on reguleeritud Cln1/2-Cdk1 poolt.** Joonis tehtud Enserink ja Kolodner, 2010 põhjal.

#### 1.2.1.4. G1-tsükliinid osalevad käävi polaarkehade duplikatsioonis

Kahepoolse mitoosikäävi moodustumiseks ja kromosoomide korrektseks lahkumiseks mitoosis peab eelnevalt toimuma loomades tsentrosoomi ja pagarijärms käävi polaarkehade duplikatsioon (Jaspersen ja Winey, 2004). Vastavad protsessid toimuvad G1-faasis ning nendes osalevad nii tsükliinist sõltuvad kinaasid kui ka kinaas Mps1 (Jaspersen ja Winey, 2004). Cdk1 aktiveerib käävi polaarkehade duplikatsiooni vähemalt kahe mehhanismi kaudu. Keskne valk polaarkehade duplikatsioonil on Spc42, mis fosforüleeritakse hilises G1-faasis nii Cdk1 kui ka Mps1 poolt (Jaspersen jt, 2004). Spc42 on Cln1/2-spetsiifiline Cdk1 substraat ning lisaks fosforüleerib Cdk1 ka kinaasi Mps1, stabiliseerides seda ning suurendades Spc42 fosforüleerimist ka Mps1 poolt (Jaspersen jt, 2004). Asendades metsiktüüpi *SPC42* geeni mutantsega, milles on Cdk1 fosforüleerimissaidid asendatudalaniinidega, tekivad 11% rakkudes monopolaarsed mitoosikäävid ning suureneb lühikeste käävide osakaal, mis viitab defektidele polaarkehade duplikatsioonil (Jaspersen jt, 2004). Samas ei ole kumbki nendest radadest hädavajalik käävi polaarkehade duplikatsiooniks (Jaspersen jt, 2004), mistõttu peab Cdk1 reguleerima protsessi veel täiendavate mehhanismide kaudu.

#### 1.2.1.5. Cln2-Cdk1 fosforüleerib Sli15 valku *in vitro*

*In vitro* kinaasikatsetega on näidatud, et Sli15 on Cln2-spetsiifiline Cdk1 substraat (Kõivomägi jt, 2011b). Sli15 moodustab kompleksi kinaasiga Ipl1 ning Sli15-Ipl1 kompleks reguleerib kromosoomide lahkumist, mitoosikäävi ning tsütokineesi (Kang jt, 2001). G1-

faasi rakkudes lokaliseerub Ipl punktina, mis võib tähendada seondumist kinetohooride või käävi polaarkedaga, või on seondunud mikrotoobulitega (Buvelot jt, 2003). S-faasi rakkudes paikneb Sli15-Ipl1 kompleks kinetohooridel ning anafaasis lokaliseerub mitoosikäävile (Buvelot jt, 2003). Sli15 sisaldab mikrotoobulitega seonduvat regiooni (positsioonides 227–559) (Kang jt, 2001), milles on kuus optimaalset Cdk1 fosforüleerimismotiivi ning nende fosforüleerimine takistab anafaasieelsetes rakkudes Sli15 seondumist mikrotoobulitega (Pereira ja Schiebel, 2003). Ei ole teada, kas Sli15 on Cln2-Cdk1 substraat ka rakkudes ning kas vastav fosforüleerimine mõjutab Sli15-Ipl1 lokalisatsiooni või aktiivsust.

### **1.3. Kinaaside substraatide äratundmismehhanismid**

Substraatide valik proteiinkinaaside poolt võib toimuda kolmel tasandil: 1) kinaasi aktiivtsenter interakteerub substraatvalgu fosforüleeritava aminohappejäägi läheduses olevate aminohappejääkide kõrvalrühmadega, 2) kinaas ja substraat seonduvad katalüütilisest tsentrist kaugemal paiknevate motiivide kaudu, 3) substraadi fosforüleerimine toimub kinaasi ja substraadi kolokalisatsiooni tõttu.

*In vitro* fosforüleerimiskatsed peptiidide raamatukogudega on andnud palju informatsiooni selle kohta, millised kinaasid milliseid peptiide fosforüleerivad (Mok jt, 2010). Mõnede kinaaside puhul on fosforüleeritav motiiv väga hästi defineeritav, samas mitmete kinaaside puhul ei ole fosforüleeritava aminohappejäägi läheduses ühtegi tugevat determinanti (Mok jt, 2010). Analüüsides mass-spektromeetriliselt leitud kinaas-substraat paare, jõudsid Joughin jt 2012. aastal järeldusele, et kinaaside substraadispetsiifilisust ei õnnestu seletada substraatvalkude aminohappelise järjestustega ning kinaaside substraatide ennustamiseks tuleks lähtuda valkude lokalisatsioonist ja funktsioonist, mitte aminohappelisest järjestusest. Joughin jt keskendusid kinaas-substraat paaride analüüsimisel aminohappelisele järjestusele substraadi fosforüleeritud aminohappejäägi läheduses, kuid paljude kinaaside puhul võivad distaalsed interaktsioonid substraatide äratundmises aktiivtsentri spetsiifilisusest olulisemad olla.

#### **1.3.1. Tsükliinist sõltuvate kinaaside substraatide äratundmismehhanismid**

*S. cerevisiae* Cdk1 fosforüleerib hinnanguliselt umbes 500 valku (Ubersax jt, 2003) ning vastavad fosforüleerimissündmused peavad toimuma ajaliselt reguleeritult. Muutusi CDK aktiivsuses on seostatud mitmete kasvajate tekkega (Malumbres ja Barbacid, 2009), mistõttu on oluline uurida, milliste mehhanismidega on tagatud CDK substraatide fosforüleerimise spetsiifilisus.

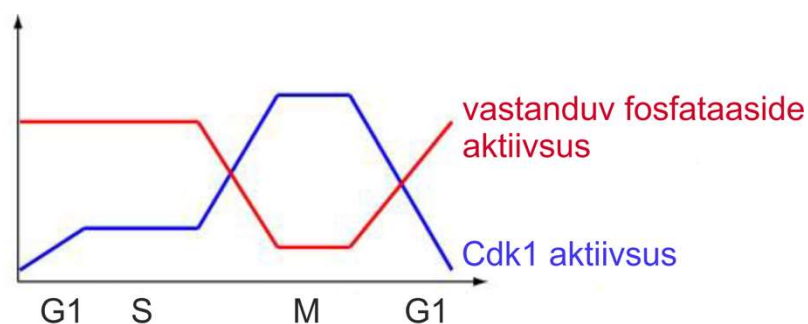
### 1.3.1.1. Cdk1 aktiivtsentri spetsiifika

CDK-d on proliini poolt suunatud seriini-treoniini kinaasid, mis tähendab, et kõige olulisem determinant fosforüleeritava seriini- või treoniinijäägi läheduses on +1 positsioonis olev proliinijääk (Songyang jt, 1994; Holmes ja Solomon, 1996). Lisaks on leitud, et fosforüleerimist kiirendab oluliselt fosforüleeritavast aminohappejäägist +3 positsioonis paiknev positiivselt laetud aminohappejääk (Songyang jt, 1994; Holmes ja Solomon, 1996). Selle alusel on defineeritud optimaalne CDK fosforüleerimismotiiv S/T-P-x-K/R ja väiksema efektiivsusega fosforüleeritav suboptimaalne S/T-P (S/T on fosforüleeritav seriini- või treoniinijääk, P on proliinijääk, x suvaline aminohappejääki ja K/R lüsiini- või arginiinijääki). Fosforüleeritavale aminohappejäägile järgnev proliinijääk muudab peptiidahela konformatsiooni, võimaldades sellega vesiniksidemete moodustumist peptiidi ja CDK vahel ning paigutades seriini- või treoniinijäägi fosfaatrühma ülekandeks sobivasse orientatsiooni (Brown jt, 1999a). CDK-de täielikuks aktivatsiooniks on vaja T-ling fosforüleerida (Cdk2 puhul T160) ning on näidatud, et vastav fosfaatrühm võib moodustada vesiniksideme optimaalses fosforüleerimismotiivis +3 positsioonis paikneva lüsiini- või arginiinijäägiga (Brown jt, 1999b). +3 positsiooni lüsiini- või arginiinijääk võib lisaks moodustada kontakte tsükliiniga (Brown jt, 1999a). Kuigi suurima ja selgelt defineeritava mõjuga on +1 ja +3 positsioonid, siis fosforüleerimist võivad mõjutada ka teised positsioonid, mistõttu erinevate optimaalset S/T-P-x-K/R motiivi sisaldavate peptiidide fosforüleerimiskiirus võib erineda kuni 10 korda (Holmes ja Solomon, 1996; Kõivomägi jt, 2011b).

Erinevad tsükliinid stimuleerivad Cdk1 S/T-P-x-K/R motiiviga peptiidi fosforüleerimise võimet erinevalt. Rakutsükli edenedes tõstab iga järgmine tsükliin Cdk1 kompleksi substraatpeptiidi fosforüleerimise võimet (Loog ja Morgan, 2005; Kõivomägi jt, 2011b). G1-faasi Cln2-Cdk1 kompleksi spetsiifilisuse konstant optimaalse substraatpeptiidi fosforüleerimisel on 40 korda väiksem kui mitootilisel Clb2-Cdk1 kompleksil (Kõivomägi jt, 2011b). Cln2 mõjutab ka Cdk1 aktiivtsentri spetsiifilisust, nii et lüsiini- või arginiinijääk stimuleerib peptiidi fosforüleerimist lisaks fosforüleerimismotiivi +3 positsioonile ka +2 positsioonis (Kõivomägi jt, 2011b). Seega võimaldab positiivselt laetud aminohappejäägi olemasolu +2 positsioonis, kuid puudumine +3 positsioonis, tõsta peptiidi spetsiifilisust G1-tsükliin-Cdk1 komplekside suhtes võrreldes B-tüüpi tsükliin-Cdk1 kompleksidega.

Rakutsükli regulatsiooni kvantitatiivse mudeli kohaselt vajavad rakutsükli hilisemad sündmused kõrgemat CDK aktiivsust. CDK aktiivsuse tõus ja CDK fosforüleerimissaite defosforüleerivate fosfataaside aktiivsuse langus rakutsükli jooksul tagab protsesside õige järjekorra (Stern ja Nurse, 1996; Uhlmann jt, 2011; joonis 4). Rakutsükli varaste tsükliin-

CDK komplekside madal aktiivsuse tase võib olla vajalik välistamiseks hiliste protsesside enneaegset käivitamist (Loog ja Morgan, 2005). Niisugune regulatsioonimehhanism tekitab vajaduse eristada varaseid ja hiliseid substraatvalke.



**Joonis 4. CDK üldise aktiivsuse muutus rakutsükli jooksul.** CDK aktiivsus optimaalse peptiidi suhtes on madalam rakutsükli G1- ja S-faasis ning saavutab maksimumi mitoosis. Kohandatud Uhlmann jt, 2011.

### 1.3.1.2. Fosfoadaptorvalk Cks1

Tsükliin-Cdk1 kompleksiga on stabiilselt seondunud veel kolmas valk – Cks1 (Hadwiger jt, 1989a). *S. cerevisiae* *CKS1* on hädavajalik geen, mille puudumisel rakutsükkel peatub G1-faasis (Hadwiger jt, 1989a). Imetajarakkudes on kaks pagaripärmi Cks1 valguga homoloogilist valku – Cks1 ja Cks2. Sarnaselt kinaasiga Cdk1 on ka Cks-valgud evolutsiooni käigus vähe muutunud, kusjuures inimese Cks1 ja Cks2 on võimelised seonduma *S. cerevisiae* Cdk1-ga ning kõrvaldama pärmiss kahjustuse, mis on tingitud Cks1 valgu puudumisest (Richardson jt, 1990). CDK kompleksis on tsükliin seondunud kinaasi N-terminaalse osaga, samas kui Cks1 seondub kinaasi C-terminaalse osaga (Arvai jt, 1995; joonis 5). Erinevalt tsükliinist ei mõjuta Cks CDK-ga seondudes oluliselt selle struktuuri (Bourne jt, 1996). Tsükliini seondumine CDK-ga stimuleerib Cks1 valgu seondumist kompleksiga (Egan ja Solomon, 1998), kusjuures pärmiss *S. cerevisiae* moodustab Cln2-Cdk1 Cks1-ga stabiilse kompleksi, kuid Clb-Cdk1 kompleks seob valku Cks1 nõrgemalt (Kõivomägi jt, 2011a). Cln-Cdk1 kompleksid ei ole ensümaatilistelt aktiivsed Cks1 puudumisel, ent Clb-Cdk1 komplekside aktiivsust mudelsubstraadi histoon H1 suhtes Cks1 ei mõjuta (Reynard jt, 2000).

Cks perekonna valgud sisaldavad fosfaatiooni siduvat konserveerunud katioonset taskut (Arvai jt, 1995; Bourne jt, 1996). *S. cerevisiae* Cks1 seondub peptiididega, milles fosforüleeritud treoniinijäägile järgneb proliini jääk, ning see seondumine tõstab ensüümkompleksi afiinsust fosforüleeritud valkude suhtes, mõjutades Cdk1 substraatide valikut (Kõivomägi jt, 2013; McGrath jt, 2013). Cks1 seondub ka Cdk1 poolt fosforüleeritud

peptiididega ning on vajalik mitmete substraatide multifosforüleerimiseks (Kõivomägi jt, 2011a; Kõivomägi jt, 2013). Cks1 valgu afiinsust peptiidi suhtes tõstab fosforüleeritud treoniinijäägist -2 positsioonis paiknev suur hüdrofoobne aminohappejääk, samas fosforüleeritud seriinijääki Cks1 ei seo (Kõivomägi jt, 2013, McGrath jt, 2013). Fosforüleeritud treoniinijäägi ja Cks1 vahelise interaktsiooni mõju substraatvalgu fosforüleerimisele sõltub Cks1 katioonsesse taskusse seonduva ning kinaasi aktiivtsentrisse seonduva fosforüleerimismotiivi omavahelisest paiknemisest. Cks1 stimuleerib fosforüleerimist vaid juhul, kui fosforüleeritav motiiv paikneb Cks1-ga seonduvast fosforüleeritud treoniinijäägist peptiidahelas vähemalt 12 aminohappejäägi kaugusel C-terminuse suunas ja distantse suurenedes fosforüleerimist soodustav mõju väheneb (Kõivomägi jt, 2013).

### **1.3.1.3. Tsükliinide seondumine substraatvalkudega**

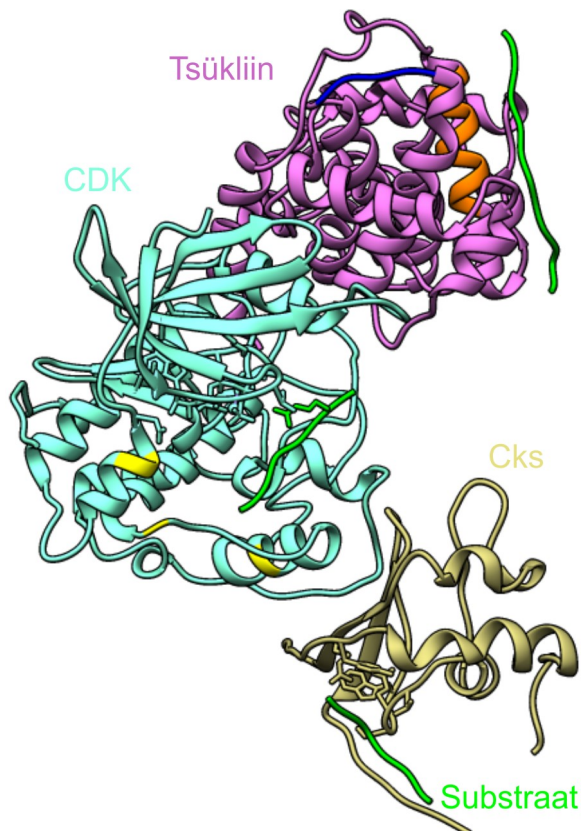
Vaatamata Cdk1 üldise aktiivsuse tõusule rakutsükli jooksul, fosforüleerivad nii G1- kui ka S-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid mitmeid substraate efektiivsemalt kui mitootilised tsükliin-Cdk1 kompleksid (Loog ja Morgan, 2005; McCusker jt, 2007; Bhaduri ja Pryciak, 2011; Kõivomägi jt, 2011b). Rakutsükli varaste tsükliin-CDK komplekside spetsiifilist aktiivsust tõstavad tsükliin-substraat interaktsioonid, mis toimuvad substraatvalkudel paiknevate lühikeste lineaarsete motiivide kaudu.

Imetajate tsükliinide A ja E pinnal paikneb hüdrofoobne tasku, mis seonduv substraatvalkudes lühikeste motiividega, mille konsensuslik järjestus on  $R/K-x-L-x\{0,1\}-\Phi$ , milles R/K tähendab arginiini- või lüsiinijääki, x suvalist aminohappejääki, L leutsiinijääki ja  $\Phi$  suurt hüdrofoobset aminohappejääki, mis paikneb peptiidahelas leutsiinijäägist järgmises või ülejärgmises positsioonis (Adams jt, 1996; Schulman jt, 1998; Lowe jt, 2002). Kirjeldatud motiivi nimetatakse RxL-motiiviks ning vastav interaktsioon on konserveerunud pärmidest imetajateni (Cross jt, 1999). RxL-motiivi lisamine optimaalset fosforüleerimismotiivi sisaldavasse peptiidi suurendab peptiidi seondumisafiinsust tsükliin E-Cdk2 ja tsükliin A-Cdk2 kompleksidega 75–120 korda (Takeda jt, 2001). RxL-motiiv ei suurenda oluliselt mitootiliste tsükliin B-Cdk2 või Clb2-Cdk1 aktiivsust substraatide fosforüleerimisel (Adams jt, 1996; Loog ja Morgan, 2005). Tsükliin A hüdrofoobne tasku on umbes 35 Å kaugusel Cdk2 aktiivtsentrist (Schulman jt, 1998; joonis 5) ning RxL-motiivi seondumine hüdrofoobsesse taskusse suurendab substraadi lokaalset kontsentratsiooni CDK aktiivtsentri lähedal (Takeda jt, 2001). Sarnaselt Cks1-vahendatud fosforüleerimisele sõltub ka tsükliin-substraat seondumise mõju fosforüleerimisele tugevalt fosforüleerimismotiivide ja RxL-motiivi omavahelisest paiknemisest peptiidahelas (Kõivomägi jt, 2013). Fosforüleerimise

stimuleerimiseks peab fosforüleeritav aminohappejääk paiknema peptiidahelas RxL-motiivist vähemalt 16 aminohappejäägi kaugusel N-terminaalses suunas (Kõivomägi jt, 2013). S-faasi Clb5-Cdk1 kompleksi dissotsiatsioonikonstant optimaalse fosforüleerimismotiiviga peptiidi suhtes on umbes 760  $\mu\text{M}$ , samas kui mitootilisel Clb2-Cdk1 kompleksil on 76  $\mu\text{M}$  (Kõivomägi jt, 2011b). RxL-motiiv suurendab oluliselt S-faasi tsükliin-Cdk1 komplekside seondumisafiinsust, võimaldades madala aktiivsentril aktiivsusega Clb5-Cdk1 kompleksil efektiivselt fosforüleerida üksnes RxL-motiiviga substraate (Loog ja Morgan, 2005). Clb5 hüdrofoobne tasku on vajalik S-faasi õigeaegseks läbimiseks (Cross jt, 1999). S-faasi Cdk1 komplekside substraatide valik RxL-motiivi kaudu võimaldab kõrget seondumisafiinsust spetsiifiliste substraatide suhtes, samas kui madal aktiivsentril aktiivsus takistab rakutsükliis hilisemate substraatide enneaegset fosforüleerimist (Loog ja Morgan, 2005).

Mitmed Cdk1 substraadid, näiteks feromooni raja valk Ste20 ja transkriptsiooni inhibiitor Whi5, on *in vivo* fosforüleeritud ainult G1-faasi Cln1- ja Cln2-Cdk1 komplekside poolt (Oehlen ja Cross, 1998; Bhaduri jt, 2015). Cln2-Cdk1 kompleksi substraatvalke Ste5, Ste20 ja Sic1 uurides leiti, et nende kiireks fosforüleerimiseks on vajalik substraadi leutsiini- ja proliini jääkide rikas järjestus, mis nimetati LP-motiiviks (Bhaduri ja Pryciak, 2011; Kõivomägi jt, 2011b). Olulised determinandid LP-motiivis ei ole selgelt defineeritud. Valkudes Sic1 ja Ste5 on leitud, et fosforüleerimiseks on vajalik järjestus LLPP, kuid mitte kõik LLPP järjestust sisaldavad peptiidid ei stimuleeri Cln2-Cdk1-sõltuvat fosforüleerimist (Bhaduri ja Pryciak, 2011, Kõivomägi jt, 2011b). Järelikult on interaktsioonis oluline ka ümbritsev aminohappeline kontekst. Valgus Ste20 soodustab Cln2-Cdk1 sõltuvat fosforüleerimist järjestus LDDPIQF, milles olulisemad determinandid on leutsiini- ja fenüülalaniini jääk (Bhaduri ja Pryciak, 2011). Valgu Sic1 baasil tehtud LLPP järjestust sisaldav peptiid inhibeerib mitmete valkude fosforüleerimist Cln2-Cdk1 komplekside poolt, kuid ei mõjuta Clb-Cdk1 komplekside aktiivsust (Kõivomägi jt, 2011b). LP-motiiv ei stimuleeri Ste5 fosforüleerimist Cln3-Cdk1 poolt, seega võimaldab LP-motiiv Cln1- ja Cln2-Cdk1-spetsiifilist substraatide fosforüleerimist (Bhaduri ja Pryciak, 2011; Bhaduri jt, 2015).

Ka LP-motiivi mõju substraatvalgu fosforüleerimisele sõltub fosforüleeritava aminohappejäägi ja seondumismotiivi omavahelisest paiknemisest (Kõivomägi jt, 2013). LP-motiiviga seonduv ala tsükliini pinnal asub CDK aktiivsentrilist kaugemal kui RxL-motiiviga seonduv hüdrofoobne tasku (Bhaduri jt, 2015; joonis 5) ning minimaalne fosforüleerimist stimuleeriv distants LP-motiivi ja fosforüleeritava aminohappejäägi vahel on umbes 30 aminohappejääki (Kõivomägi jt, 2013).

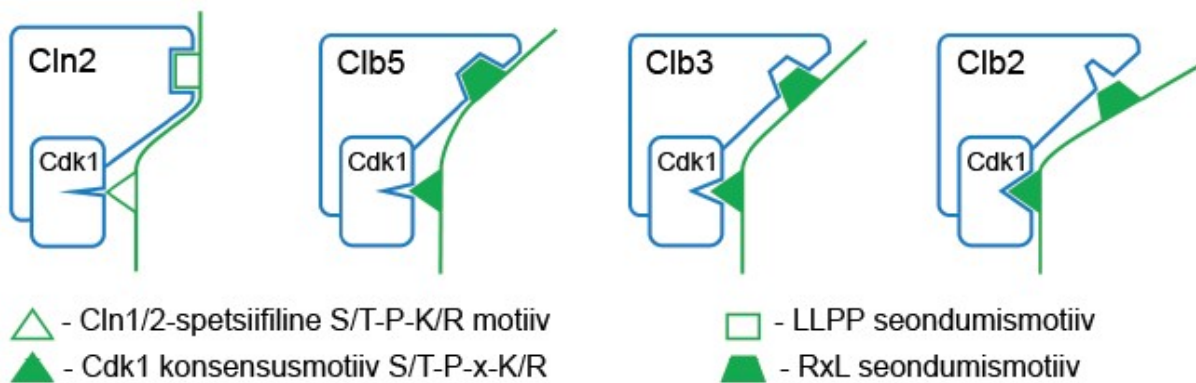


Joonis 5. **Tsükliin-CDK-Cks kompleksi struktuur.** Tsükliin on tähistatud lilla, CDK helesinise, Cks pruuni ning peptiidid substraatvalgust roheline värviga. Tsükliini pinnal on oranžiga värvitud RxL-motiiviga seonduv  $\alpha$ -heeliks (Schulman jt, 1998) ning sinisega LP-motiiviga seonduv ala (Bhaduri jt, 2015). CDK pinnal on kollasega märgitud võimalikud valguga Srl3 interakteeruvad aminohappejäägid (Yahya jt, 2014). Tsükliin-CDK-Cks kompleksi struktuur on saadud Kõivomägi jt, 2013 artiklist.

Cln2 mutanti, mis ei seonu LP-motiiviga, nimetatakse Cln2(lpd) (i.k. *LP docking* ehk LP-seondumine). Mutantset tsükliini Cln2(lpd) või LP-peptiidi kasutades on näidatud, et LP-motiiv mõjutab Ste5, Ste20, Whi5, Sic1, Rga1, Stb1, Pds1 ja Yhp1 fosforüleerimist (Bhaduri ja Pryciak, 2011; Kõivomägi jt, 2011b; Bhaduri jt, 2015). Valk Srl3, mis takistab G1-tsükliini Cln3 sisenemist rakutuuma ning inhibeerib seeläbi G1/S üleminekut, seondub otse kinaasiga Cdk1 (Yahya jt, 2014). Srl3 on ka Cdk1 substraat ning Cln2-Cdk1 kompleksi seondumine Srl3-ga ei sõltu LP-interaktsioonist (Bhaduri jt, 2015). Ei ole teada, kas Srl3 on Cln-spetsiifiline Cdk1 substraat ning kas Cdk1 ja Srl3 seondumine sõltub tsükliinist. Lisaks on eksperimentaalselt näidatud veel vähemalt 11 Cln2-Cdk1 substraatvalku (Msa1, Bop3, Tos8, Rtt109, Xbp1, Sli15, Exo84, Spc42, Rga2, Boi1, Cdc24), mille puhul ei ole teada, kas nende Cln2-spetsiifilisus tuleneb LP-seondumisest (Jaspersen jt, 2004; McCusker jt, 2007; Kõivomägi jt, 2011b). Tsükliinidel Cln1 ja Cln2 on spetsiifiline funktsioon punga morfogeneesis (Moffat ja Andrews, 2004), mida on võimeline täitma ka mutant Cln2(lpd) (Bhaduri jt, 2015). Seega on punga tekkeks vaja Cln2-spetsiifilist fosforüleerimist, mis ei vaja LP-interaktsiooni, mistõttu võib oletada, et ka punga morfogeneesis osaleb LP-sõltumatuid Cln2 substraate.

Ei ole teada, kas LP-seondumine on oluline ka imetajate G1-tsükliinide funktsioneerimisel. Imetajarakkudes toimub hilises G1-faasis pRB (i.k. *retinoblastoma protein*)

hüperfosforüleerimine, milleks on vaja nii tsükliin D-Cdk4/6 kui ka tsükliin E-Cdk2 komplekside aktiivsust (Lundberg ja Weinberg, 1998). pRB fosforüleeritakse väga sarnaselt ka pagaripärmi rakus hilises G1-faasis, kusjuures selleks on vaja nii tsükliin Cln3 kui ka Cln1 või Cln2 (Hatakeyama jt, 1994). G1-faasi tsükliinidel on konserveerunud mehhanism pRB fosforüleerimisel, mistõttu võiks neil olla ka konserveerunud substraatide äratundmismehhanism, mida ei ole aga leitud.



**Joonis 6. Cdk1 kompleksi substraatide valik sõltub tsükliinist.** Tsükliinid mõjutavad Cdk1 kompleksi substraatide äratundmist põhiliselt kahe mehhanismi abil: 1) erinevad tsükliinid seonduvad otseselt substraatvalkudega erinevate lühikeste lineaarsete motiivide kaudu, 2) tsükliinid mõjutavad Cdk1 aktiivtsentri spetsiifikat, kusjuures rakutsükliis järjestikkused tsükliinid suurendavad Cdk1 afiinsust optimaalse fosforüleerimismotiivi suhtes. (kohandatud, Kõivomägi ja Loog, 2011)

Tsükliin-CDK-Cks kompleksis suunavad tsükliinid ja Cks perekonna valgud CDK aktiivtsentri spetsiifiliste substraatide kindlate fosforüleeritavate kohtade juurde (joonis 6). Tsükliinist sõltuv substraatide seondumine ja fosforüleerimise efektiivsuse sõltuvus fosforüleerimismotiivide paiknemisest seondumismotiivide suhtes tagab fosforüleerimissündmuste õigeaegsuse (Kõivomägi jt, 2013). Samas ei ole veel teada, milliste mehhanismide abil G1-faasi kompleks Cln3-Cdk1 substraatvalke valib ning kas Cln2-spetsiifiline fosforüleerimine on põhjustatud ainult LP-interaktsioonist.

## 2. Eksperimentaalosa

### 2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva magistr töö eesmärkideks on:

1. uurida Cln2-Cdk1 substraatvalkude fosforüleerimise sõltuvust LP-motiiviga seondumisest;
2. selgitada substraatvalke uurides, mis stimuleerib LP-motiivist sõltumatute Cln2-spetsiifiliste Cdk1 substraatide fosforüleerimist ning leida tsükliini Cln2 mutandid, millel on vähenenud aktiivsus spetsiifiliste substraatide fosforüleerimisel;
3. kirjeldada tsükliin-substraat seondumise mõju Cln2-Cdk1 kompleksi funktsioonide täitmisel G1/S ülemineku ja pungumise regulatsioonis ning analüüsida, kas Sli15 paiknemine rakus sõltub Cln2-Cdk1 aktiivsusest;
4. selgitada, kas proteiinkinaas A inhibeerib Cln2-Cdk1 substraatide fosforüleerimist *in vitro*.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Algtüved ja söötmed

Konstruktide kloonimiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 $\alpha$  (Invitrogen). Rekombinantset valgud ekspresseeriti *E. coli* tüves BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene). Mutageneesil kasutatav üheaahelaline DNA eraldati *E. coli* tüvest CJ236 (New England Biolabs).

Bakterirakke kasvatati LB (Luria-Bertani) söötmes (10 g/l trüptoon (BD Biosciences), 5 g/l pärmiekstrakt (Formedium), 10 g/l NaCl) või 2xYT (i.k. *Yeast Extract Tryptone*) söötmes (16 g/l trüptoon (BD Biosciences), 10 g/l pärmiekstrakt (Formedium), 5 g/l NaCl). DH5 $\alpha$  rakke kasvatati LB söötmes, mis sisaldas rakkudesse transformeeritud plasmiidile vastavat antibiootikumi (100  $\mu$ g/ml kanamütsiini (Sigma) või 100  $\mu$ g/ml ampitsilliini (Sigma)) ning BL21 rakkude puhul oli lisaks 50  $\mu$ g/ml klooramfenikooli (Sigma).

Kõik käesolevas magistr töö osas kasutatud *S. cerevisiae* tüved on toodud lisa 3.

Pärmirakke kasvatati YPD (i.k. *Yeast Extract Peptone Dextrose*) söötmes (10 g/l pärmiekstrakt (Formedium), 20 g/l peptoon (Formedium), 20 g/l glükoos (Oriola)) või plasmiidiga rakkude puhul sünteetilises täissöötmes (SC (i.k. *synthetic complete*)), millest oli puudu selektsiooni

võimaldav aminohape või nukleotiid (7 g/l pärmi lämmastiku alus ilma aminohapeteta (BD Biosciences), 1,9 g/l selektsioonile vastav *drop-out* pulber (MP Biomedicals), 20 g/l glükoos (Oriola)). natNT2 markergeeni kasutamisel plaaditi rakud YPD plaatidele, milles oli 100 mg/l norseotritsiini (Werner BioAgents), ning kanMX4 markergeeni korral YPD plaatidele, milles oli 200 mg/l genetitsiini (Thermo Scientific).

## 2.2.2. DNA konstruktide tegemine

### 2.2.2.1. Konstruktide tegemine polümeraasi ahelreaktsiooni abil

Konstruktide valmistamisel kasutati PCR-i teostamiseks *Phusion High Fidelity* DNA polümeraasi (Thermo Scientific) vastavalt tootja juhistele. Oligonukleotiidid telliti firmalt Microsynth. *S. cerevisiae* geenide kloneerimiseks paljundati huvipakkuv järjestus pärmi genoomselt DNA-lt, kusjuures praimeritega viidi sisse kloneerimiseks vajalikud restriksiooniensüümide lõikejärjestused. Pärimi genoomse DNA eraldamine teostati nagu eelnevalt kirjeldatud Lööke jt (2011) artiklis.

Mutatsioonide tegemiseks PCR-i abil disainiti oligonukleotiidid, mis sisaldasid märklaudjärjestusega komplementaarset järjestust ning muudetud järjestust, mis võimaldas oligonukleotiididel omavahel paarduda. Esmalt teostati PCR-i reaktsioonid muudetavast järjesusest 5' ja 3' suunas ning seejärel reaktsioon, milles oligonukleotiidide omavahel paarduva osa abil liideti kaks PCR-i produkti kokku. Selle tulemusel saadi oligonukleotiidide abil muudetud järjestust sisaldav täispikk DNA lõik, mida amplifitseeriti omakorda PCR-iga. PCR-i reaktsioonid viidi läbi mahus 25 µl.

Pärast PCR-i lisati reaktsioonidele 5 µl *6x Orange Loading Dye* (Thermo Scientific) laadimispuhvrit. PCR-i produktide analüüsimiseks laeti reaktsioonid TAE-agarosgeelile (40 mM Tris-atsetaat (pH 8,3), 1 mM EDTA, 0,3 µg/ml etiidiumbromiid, 1% või 2% agaros) ning elektrofooresiti TAE puhvris. Produktid lõigati geelist ning puhastati *GEL/PCR Purification Kit*-iga (Favorgen).

PCR-i produkte lõigati vastavate *FastDigest* restriksiooniensüümidega (Thermo Scientific), mille lõikejärjestused paiknesid PCR-i produktide otstes. *FastDigest* restriктаase kasutati vastavalt tootja juhistele. Vektorite lõikamisel kasutati *FastDigest* restriктаase ning defosforüleerimisel aluselist fosfataasi *FastAP* (Thermo Scientific) tootja juhistest lähtudes. Restriктаasid inaktiveeriti, hoides reaktsioonisegusid 5 minutit temperatuuril 80 °C.

PCR-i produktid ning vektorid ligeeriti T4 DNA ligaasiga (Thermo Scientific) vastavalt tootja juhistele. Ligatsioonisegud transformeeriti *E. coli* tüve DH5α rakkudesse. Selektiivsöötme

üleskasvanud kolooniatest eraldati plasmiidne DNA *Plasmid DNA Extraction Mini Kit*-i (Favorgen) abil. Konstrukte kontrolliti esmalt restriksioonanalüüsiga ning seejärel sekveneerimisega Eesti Biokeskuse tuumiklaboris. PCR-il põhinevat meetodit kasutati kõigi mutantide, välja arvatud Sli15 ning Rtt109 erinevate variantide tegemiseks

### **2.2.2.2. Konstruktide valmistamine oligonukleotiidi poolt suunatud mutageneesiga**

Sli15 ning Rtt109 erinevate variantide konstrueerimisel kasutati mutatsioonide tegemiseks oligonukleotiide, mis hübridiseeriti üheaheelalise DNA-ga (Kunkel, 1985). Laborant Jevgeni Mihhejev eraldas konstrukti üheaheelalise DNA (ssDNA) *E. coli* tüve CJ236 rakkudest. CJ236 rakkudesse transformeeriti pET28a vektorid, millesse oli kloonitud valku kodeeriv järjestus *RTT109* geenist või Sli15 variandist, mis sisaldas aminohappejääke positsioonist 422 kuni positsioonini 511 ning milles olid tehtud asendused S427A, S437A, S462A, T474A ja S489A. Mutageneesi jaoks disainiti oligonukleotiid, mille kummagi otsa 15 nukleotiidi olid komplementaarsed ssDNA-ga ja keskel paiknes muteeritava alaga komplementaarne lõik.

Oligonukleotiidide 5' hüdroksüülrühma kineerimiseks inkubeeriti reaktsioonisegu koostisega 6,5 µM oligonukleotiid, 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ditiotreitol (DTT), 425 µM ATP ja 0,15 U/µl T4 polünukleotiidi kinaas (Thermo Scientific) 45 minutit 37 °C. T4 polünukleotiidi kinaas inaktiveeriti segu 10 minutit 65 °C juures kuumutades. Seejärel pipeteeriti tuubi, milles oli 7,5 µl vett 1 µl ssDNA lahust (50 ng DNA-d), 0,5 µl 6,5 µM kineeritud oligonukleotiidi ja 1 µl 10x seondumispuhvit (200 mM Tris-HCl (pH 7,4), 500 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>). Seondumissegud tõsteti temperatuuril 98 °C olevasse termoblokki ning blokk tõsteti masinast välja ning lasti aeglaselt jahtuda toatemperatuurile, võimaldades oligonukleotiidide seondumist ssDNA-ga. ssDNA-le komplementaarse ahela sünteesimiseks ning selle ligeerimiseks oligonukleotiidi 5' otsaga lisati 10 µl seondumissegule 1,35 µl 10x sünteesi puhvit (100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 10 mM ATP, 5 mM dNTP), 1,5 µl T4 DNA ligaasi aktiivsusega 5 Weiss U/µl (Thermo Scientific) ja 0,83 µl T4 DNA polümeraasi aktiivsusega 5 U/µl (Thermo Scientific). Sünteesireaktsiooni hoiti 5 minutit jääl, seejärel 5 minutit toatemperatuuril ja 90 minutit 37 °C juures. 5 µl sünteesireaktsiooni segu transformeeriti *E. coli* tüve DH5α rakkudesse. Bakterikloonidest eraldati plasmiidne DNA kasutades *Plasmid DNA Extraction Mini Kit*-i (Favorgen) vastavalt tootja juhistele ning mutageneesi õnnestumise kontrollimiseks sekveneeriti plasmiidid Eesti Biokeskuse tuumiklaboris.

### **2.2.2.3. *E. coli* transformatsioon**

*E. coli* tüvede DH5 $\alpha$ , CJ236 ja BL21-CodonPlus(DE3)-RP transformeerimiseks kasutati Jevgeni Mihhejevi poolt valmistatud kompetentseid rakke, mis olid hoiustatud -80 °C juures. Tsentrifuugituubi pipeteeriti 20  $\mu$ l 5x KCM lahust (500 mM KCl, 150 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM MgCl<sub>2</sub>), BL21 ja CJ236 rakkude puhul 20 ng DNA-d, DH5 $\alpha$  rakkude puhul 2–10  $\mu$ l ligatsiooni või mutageneesi reaktsiooni lahust ning vett lõppmahuni 100  $\mu$ l. Saadud lahusele lisati 100  $\mu$ l kompetentseid rakke ning suspensiooni hoiti 20 minutit jääl, misjärel tehti rakkudele kuumašokk 42 °C juures (DH5 $\alpha$  puhul 90 sekundit, BL21 ja CJ236 puhul 60 sekundit). Rakud tõsteti 2 minutiks jääle, seejärel lisati 800  $\mu$ l LB söödet ning inkubeeriti 30–60 minutit 37 °C loksutil. Rakkude kogumiseks tsentrifuugiti segu 1 minut 3300 g. Rakusade suspendeeriti üles 150  $\mu$ l LB söötmes ning plaaditi selektiivsetele antibiootikumidega LB plaatidele.

### **2.2.3.S. *S. cerevisiae* tüvede valmistamine**

*S. cerevisiae* geenide deleteerimiseks ja liitvalkude tegemiseks kasutati PCR-il ja homoloogilisel rekombinatsioonil põhinevat süsteemi (Longtine jt, 1998; Janke jt, 2004).

*S. cerevisiae* transformatsiooniks kasvatati rakke YPD söötmes *Infors HT Multitron* loksutil pöõretel 160 rpm temperatuuril 30 °C kuni kultuuri optiline tihedus lainepikkusel 600 nm (OD<sub>600</sub>) oli 0,8. Rakud koguti tsentrifuugides 1 minut 2200 g. Sööde eemaldati ning rakud resuspendeeriti 1 ml puhvris A (5 mM Tris-HCl (pH 8), 0,5 mM EDTA, 100 mM liitiumatsetaat). Segu tsentrifuugiti 1 minut 2200 g, supernatant eemaldati ning rakud resuspendeeriti rakkudest ligikaudu 2 korda suuremas ruumalas puhvris A. Rakkude kompetentseks muutmiseks inkubeeriti segu 10 minutit toatemperatuuril. Transformatsiooniks kasutati plasmiidse DNA korral 10–30 ng DNA-d 1  $\mu$ l lahuseks ja lineaarse DNA korral vähemalt 500 ng DNA-d 40  $\mu$ l lahuseks, mis segati 10  $\mu$ l *Salmon Sperm* DNA (Sigma) lahusega kontsentratsiooniga 10 mg/ml, mida oli eelnevalt kuumutatud 100 °C juures 10 minutit ning jahutatud jäävannil. DNA lahusele lisati 100  $\mu$ l kompetentsete pärmirakkude suspensiooni, 700  $\mu$ l puhvrit B (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 40% polüetüleenglükool (PEG) keskmise molekulmassiga 3350 g/mol, 100 mM liitiumatsetaat) ja 48  $\mu$ l dimetüülsulfoksiidi ning segati. Segu inkubeeriti temperatuuril 42 °C 40 minutit, misjärel seda jahutati 2 minutit jääl. Liitiumatsetaadi eemaldamiseks tsentrifuugiti rakke 30 sekundit 3300 g ning supernatant eemaldati. Rakud resuspendeeriti 1 ml 1xTE puhvris (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA), tsentrifuugiti 1 minut 1500 g, supernatant eemaldati, rakud resuspendeeriti 200  $\mu$ l 1xTE puhvris ning külvati Petri tassile. Antibiootiliste selektsioonimarkerite kasutamise korral külvati rakud esmalt YPD plaatidele ning 16–24

tundi hiljem tehti tempelkylv selektiivsele plaadile. Auksotroofsusmarkerite kasutamise korral külvati rakud otse selektiivsele plaadile.

Selektiivsel plaadil kasvanud kolooniaid kontrolliti PCR-iga *Taq* DNA polümeraasiga (Thermo Scientific) vastavalt tootja juhistele standardses *Taq* polümeraasi puhvris. Pärmi kolooniatest eraldati DNA, lüüsid rakud 30 µl 20 mM NaOH lahuses 100 °C 10 minutit. Lüsaati tsentrifugeeriti 30 sekundit 16000 g ning supernatanti kasutati PCR-i matriitsina. Käesoleva magistritöö käigus valmistati pärmitüved MÖ038, MÖ040, MÖ047, MÖ061 ja MÖ062 (genotüübid lisas 3).

## 2.2.4. GST-Cln2-Cdk1 komplekside puhastamine

Mutantsete Cln2-Cdk1-Cks1 komplekside puhastamiseks valmistati plasmiidid, millelt ekspresseeriti *GALI* promootorilt Cln2 variante, millele oli liidetud GST-märgis (glutatioon-S-transferaas). Need plasmiidid transformeeriti *S. cerevisiae* tüve DOM0090 rakkudesse, mida seejärel kasvatati *Infors HT Multitron* loksutil pööretel 160 rpm temperatuuril 30 °C ühes liitris SC-His söötmes, kuhu oli lisatud 20 g/l rafinoosi. Kultuuri tihedusel  $OD_{600}=0,8$  lisati GST-Cln2 liitvalgu ekspressiooni indutseerimiseks kultuurile galaktoosi lõppkontsentratsioonini 20 g/l. 1 tund pärast galaktoosi lisamist tsentrifugeeriti rakukultuuri 10 minutit 3000 g 4 °C juures. Rakusadet pesti 30 ml PBS-iga ning tsentrifugeeriti 5 minutit 5000 g 4°C. Rakud suspendeeriti üles 3 ml Cln2 lüüsipuhvris (50 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 1M KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 5% glütserool, 0,25% Tween 20), kuhu olid lisatud proteaaside ning fosfataaside inhibiitorid (1 mM PMSF (fenüülmetüülsulfonüül fluoriid), 1 µg/ml pepstatiin A, 1 µg/ml aprotiniin, 180 µg/ml Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2,1 mg/ml NaF, 17,3 mg/ml β-glütserofostaat). Saadud suspensioon tilgutati vedelasse lämmastikku ning hoiustati -80 °C juures. Rakukestade purustamiseks kasutati *Mixer Mill MM 400* homogenisaatorit (Retsch), milles rakud lõhuti nii, et suspensioon ei sulanud üles. Selleks jahutati *Mixer Mill MM 400* anumad mahuga 50 ml vedelas lämmastikus ning külmunud rakususpensioon pandi anumatesse. Anumaid väristati homogenisaatoris 3 minutit sagedusega 30 Hz, misjärel anumad jahutati uuesti vedelas lämmastikus ning väristamist korrati veel 2 korda. Seejärel tõsteti purustatud rakkude pulber jääle ning sulama hakanud pulbrile lisati 15 ml toatemperatuuril olevat Cln2 lüüsipuhvrit (koos proteaaside ning fosfataaside inhibiitoritega). Lüsaati hoiti 10 minutit jääl, misjärel seda tsentrifugeeriti 10 minutit 17000 g 4 °C. Supernatanti tsentrifugeeriti uuesti 1 tund 38000 g 4 °C. 200 µl *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* (GE Healthcare) graanuleid pipeteeriti *Poly-Prep* (Biorad) kromatograafiakolonnile ning pesti 2 ml Cln2 lüüsipuhvriga. Tsentrifugeeritud lüsaadist pipeteeriti supernatant 50 ml tsentrifugeerituubi, millesse lisati 200 µl *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* graanuleid. GST-

Cln2 liitvalgu seondumiseks graanulitega segati graanuleid sisaldavat lüsaati *end-over-end* segajal (Rotator-Mixer, Biosan) 4 °C juures 1 tund. Seejärel kanti lüsaat ja graanulid kolonnile ning pärast lüsaadi läbivoolamist pesti kolonni 4 korda 2 ml Cln2 lüüspuhvriga. GST-Cln2-Cdk1-Cks1 kompleksi elueerimiseks suleti kolonn korgiga, graanulid suspendeeriti 200 µl elueerimispuhvris (50 mM Hepes-KOH (pH 7), 250 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 5% glütserool, 25 mM L-glutatioon) ning 5 minuti pärast koguti eluaat. Elueerimist teostati 200 µl kaupa kolm korda. Eluaadid pipeteeriti tuubidesse 20 µl kaupa, külmutati vedelas lämmastikus ja hoiustati -80 °C külmkirstus.

## 2.2.5. GST-märgisega substraatvalkude puhastamine

Substraatide puhastamiseks GST-liitvalkudena transformeeriti pGEX-4T1 vektorisse kloneeritud konstruktid *E. coli* tüve BL21-CodonPlus(DE3)-RP rakkudesse. Nrm1, Sli15 ja Bud2 mutantsete valkude ekspresseerimiseks kasvatati bakterirakke temperatuuril 37 °C 50 ml LB söötmes, millesse oli lisatud 100 µg/ml ampitsilliini. Kultuuri optilisel tihendusel OD<sub>600</sub>=0,6 lisati kultuurile valguekspressiooni indutseerimiseks IPTG-d (isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiid) (Biosolve Chemicals) lõppkontsentratsioonini 1 mM ning kolm tundi hiljem rakud koguti tsentrifuugimisega 5 minutit 5000 g. Rakkude sade külmutati vedelas lämmastikus ning hoiustati -80 °C juures. Rakkude sade sulatati jääs ning suspendeeriti üles 2 ml GST-lüüsi-*puhvris* (50 mM Hepes-NaOH (pH 7), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% NP-40), millesse oli lisatud 1 mg/ml lüsotsüümi (Sigma) ning proteaaside inhibiitorid (1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotiin, 1µg/ml pepstatiin A). Rakkude lüüsimiseks hoiti rakkude suspensiooni 4 °C juures 20 minutit, misjärel lüsaati sonikeeriti 3 korda 15 sekundit 50% võimsuse juures *Bandelin Sonoplus HD 2070* ultraheligeneraatoriga, jahutades sonikeerimiste vahel lüsaati 1 minut jääs. Rakulise sademe eemaldamiseks tsentrifuugiti lüsaati 15 minutit 21000 g 4 °C. 50 µl *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* graanuleid pipeteeriti *Bio-Spin* kromatograafiakolonnile (Biorad) ning pesti 1 ml GST-lüüsi-*puhvriga*. Tsentrifuugitud lüsaadist eraldati supernatant, millega suspendeeriti *Glutathione Sepharose* graanulid üles ning saadud suspensioon tõsteti tsentrifuugituubi. GST-liitvalgu seondumiseks keradega hoiti lüsaati 4 °C juures 30 minutit *end-over-end* segajal, misjärel kanti suspensioon kromatograafiakolonnile, lastes lüsaadil läbi kolonni joosta. Kolonni pesti 4 korda 1 ml GST-lüüsi-*puhvriga*. Valkude elueerimiseks suspendeeriti graanulid üles 50 µl elueerimispuhvris (50 mM Hepes-NaOH (pH 7), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% NP-40, 25 mM L-glutatioon) ning pärast 5 minutit koguti eluaat. Kolonni elueeriti 50 µl kaupa 3 korda, eluaadid külmutati vedelas lämmastikus ja hoiustati -80°C juures.

### 2.2.6.6xHis-märgisega valkude puhastamine

6xHis-märgisega valkude ekspresseerimiseks transformeeriti *E. coli* tüvesse BL21-CodonPlus(DE3)-RP pET28a vektorisse kloneeritud konstruktid, milles oli T7 polümeraasi promootori kontrolli all 6x-His märgisega liitvalk. 6xHis-Mms4 liitvalgu ekspresseerimiseks kasvatati kultuuri 500 ml 2xYT söötmes temperatuuril 37 °C kuni tiheduseni  $OD_{600}=0,6$ , mil kultuur tõsteti loksutile temperatuuriga 18 °C ning lisati IPTG-d lõppkontsentratsioonini 100 µM. 16 tundi pärast IPTG lisamist tsentrifugeeriti kultuuri rakkude kogumiseks 10 minutit 6000 g 4 °C. Rakke pesti 30 ml PBS-iga ning tsentrifugeeriti 5 minutit 5000 g 4°C juures, misjärel rakud külmutati vedelas lämmastikus. Ülejäänud 6xHis liitvalkude (Sic1ΔC, Rtt109, Bop3, Ste7, Srl3, Ash1, Hcm1, Gic2, Stb1) ekspresseerimiseks kasvatati BL21 rakkude kultuur 200 ml LB söötmes temperatuuril 37 °C kuni tiheduseni  $OD_{600}=0,6$ , mil kultuur tõsteti 23 °C olevale loksutile ning lisati IPTG-d lõppkontsentratsioonini 500 µM. 6 tundi hiljem rakud koguti tsentrifugeerides 5 minutit 5000 g 4°C ning külmutati vedelas lämmastikus.

Rakkude sade suspendeeriti Mms4 puhul 20 ml ning teiste valkude puhul 10 ml His-lüüsipuhvris (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 300 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glütserool, 20 mM imidasool), millesse oli lisatud 1 mg/ml lüsotsüümi ning proteaaside inhibiitorid (1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotiniin, 1µg/ml pepstatiin A). Rakkude lüüsimiseks hoiti suspensiooni 4 °C juures 20 minutit, misjärel lüsaati sonikeeriti 3 korda 30 sekundit 50% võimsuse juures *Bandelin Sonoplus HD 2070* ultraheligeneraatoriga. Sonikeerimiste vahepeal jahutati lüsaati, hoides seda 1 minut jääs. Lüsaati tsentrifugeeriti 20 minutit 38000 g 4 °C. 100 µl *Chelating Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare) graanuleid pipeteeriti *Bio-Spin* kromatograafiakolonnile ning pesti 1 ml veega. Graanulitele lisati 100 µl 200 mM NiCl<sub>2</sub> lahust ja pesti 1 ml His-lüüsipuhvriga. Tsentrifugeeritud lüsaadist eraldati supernatant, mis segati *Chelating Sepharose Fast Flow* graanulitega. 6xHis-märgisega liitvalkude seondumiseks graanulitega segati suspensiooni *end-over-end* segajal 4 °C juures 30 minutit, misjärel see kanti kromatograafiakolonnile ning lüsaadil lasti läbi voolata. Kolonni pesti 2 korda 1 ml His-lüüsipuhvriga ja 1 ml pesupuhvriga (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 300 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glütserool, 50 mM imidasool). Valgud elueeriti, lisades kolonnile 100 µl elueerimispuhvrit (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 300 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glütserool, 300 mM imidasool), mis oli toatemperatuuril. Valke elueeriti kolm korda. Eluaadid külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80 °C.

### 2.2.7.Kinaaside aktiivsuse mõõtmine *in vitro*

Kinaasikatsetes kasutati tsükliin-Cdk1 komplekse, mis olid puhastatud eelnevalt kirjeldatud meetodil (Kõivomägi jt, 2011b; käesolev töö, peatükk 2.2.4). Cdk1 komplekside

kontsentratsioonid määrati aktiivsuse järgi (Kõivomägi jt, 2011b) ning tsükliin-Cdk1 komplekside kontsentratsioon katses oli 0,1–2 nM. Kinaasikatsetesse lisati valku Cks1, mis oli puhastatud Reynard jt (2000) kirjeldatud meetodil. 6x-His- või GST-märgisega substraatvalkude kontsentratsioon katses oli 0,5–2 µM. Kinaasikatsetes kasutatud substraadid GST-Spc29, 6xHis-Spc42, 6xHis-Spc110, 6xHis-Xbp1, 6xHis-Sli15, 6xHis-Whi5, 6xHis-Exo84, 6xHis-Ace2 ja 6xHis-Yhp1 ning ensüümid 3HA-Cln2-Cdk1, 3HA-Cln2(lpd)-Cdk1, Clb5-Cdk1, Clb3-Cdk1 ja Clb2-Cdk1 olid puhastatud Tuuliki Ojala, Mardo Kõivomägi või Ervin Valgu poolt. Substraatvalkude kontsentratsioonid määrati võrreldes valkude signaalide intensiivsusi *Coomassie Brilliant Blue G250* (Applichem) värvilahusega värvitud SDS-polüakrüülamiid (SDS-PAA) geelidel kaliibrimiskõveraga, mis saadi veise seerumi albumiini (BSA, i.k *Bovine Serum Albumin*) (Thermo Scientific) teadaoleva kontsentratsiooniga proovide põhjal. Valkude fikseerimiseks loksutati SDS-PAA-geele 15 minutit puhvril, mis sisaldas 30% etanooli ja 30% äädikhapet. Geele loksutati vähemalt tund aega *Coomassie Brilliant Blue G250* värvilahuses ning pesti 2-12 tundi veega, misjärel geelid skaneeriti ning valkude signaalide intensiivsused kvantifitseeriti programmiga *ImageQuant TL* (Amersham Biosciences). Kinaaside aktiivsust mõõdeti järgmises reaktsioonisegus: 50 mM Hepes-NaOH (pH 7,4), 180 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM imidasool, 2,5 mM L-glutatioon, 0,1 mg/ml 2xHA peptiid, 2% glütserool, 2 mM EGTA, 0,2 mg/ml BSA, 500 nM Cks1, 500 µM ATP, 0,1 µCi/µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 0,1–2 nM ensüümkompleks ning 0,5–2 µM substraatvalk. LP-seondumise mõju uurimiseks Cln2-Cdk1 substraatide fosforüleerimisel kasutati eelnevalt kirjeldatud Cln2 mutanti, mis ei seonu LP-motiiviga (Cln2(lpd)) (Bhaduri jt, 2015). 6xHis-märgisega hiire cAMP-sõltuv proteiinkinaas A (PKA) oli puhastatud Rait Kivi poolt. Bud2ΔN valgu eelnev fosforüleerimine PKA poolt viidi läbi 30 minuti jooksul ülaltoodud reaktsioonisegus, milles PKA kontsentratsioon oli 2 µM ning Bud2ΔN kontsentratsioon 50 µM. PKA eemaldamiseks puhastati fosforüleeritud Bud2ΔN uuesti nagu kirjeldatud peatükkis 2.2.5.

Reaktsioonid viidi läbi mahus 20 µl ning need peatati kahel ajapunktil (8 ja 16 minutit), segades 8 µl reaktsioonisegu Laemmli-SDS puhvriga (60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glütserool, 5% β-merkaptopetaanool, 0,01% broomfenoolsiin). Kinaasikatsetes tehti toatemperatuuril ning reaktsioonid toimusid algkiiruse tingimustes (katse jooksul fosforüleeriti alla 10% Cdk1 substraatvalgus olevatest fosforüleerimissaitidest). Reaktsioonisegud lahutati elektroforeesil SDS-PAA-geelides (lahutav geel: 0.375 M Tris-HCl (pH 8,8), 10% akrüülamiid [29:1 akrüülamiid:bis-akrüülamiid], 0,1% SDS; koondav geel: 0.125 M Tris-HCl (pH 6,8), 5% akrüülamiid [29:1 akrüülamiid:bis-akrüülamiid], 0,1% SDS) foreesipuhvril (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS). Geelid värviti *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Applichem) värvilahusega (40% metanool, 7% äädikhape, 0,025% *Coomassie*

*Brilliant Blue R-250*), kuumutades lahust keemiseni ja loksutades 10 minutit. Geelid pesti esmalt 40% metanooli ja 7% äädikhapet sisaldava lahusega ning seejärel veega. Mõlemal korral lahuseid esmalt kuumutati keemiseni ning loksutati 5 minutit. Substraatvalkudesse inkorporeeritud  $^{32}\text{P}$  signaali kogumiseks kleebiti kuivatatud geelid *Storage Phosphor Screen* (GE Healthcare) kassetidesse, milles neid hoiti 12–60 tundi. Signaalid detekteeriti *Typhoon Trio* (Amersham Biosciences) abil ja kvantifitseeriti programmiga *ImageQuant TL* (Amersham Biosciences). Kõiki kinaasikatseid korrati vähemalt kaks korda.

### **2.2.8. Western Blot**

*Western Blot* analüüsi jaoks kasvatati pärmirakud selektiivses SC söötmes *Infors HT Multitron* loksutil pööretel 160 rpm temperatuuril 30 °C. tsentrifuugiti. Rakutsükli peatamiseks G1-faasis lisati kultuurile tihedusega  $\text{OD}_{600}=0,3-0,4$   $\alpha$ -faktorit lõppkontsentratsioonini 1 mg/l. Rakke kasvatati koos  $\alpha$ -faktoriga 2,5 tundi, misjärel rakke pesti ilma feromoonita söötmega kolm korda (pesti sama ruumala söötmega, milles kultuur kasvas, ja pesemisel rakke tsentrifuugiti 2000 g 1 minut). Rakud resuspendeeriti SC-Trp söötmes ning kasvatati edasi vastavalt eksperimendi protokollile. *Western Blot* analüüsiks koguti rakusade 5-10 ml kultuurist, mille tihedus oli  $\text{OD}_{600}=0,5-0,8$ . Supernatant eemaldati ja rakusade külmutati vedelas lämmastikus. Rakud resuspendeeriti 200  $\mu\text{l}$  uurea-lüüsipuhvris (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 7 M uurea, 2 M tiourea, 65 mM 3-[(3-kolamidopropüül)dimethüülammonio]-1-propaansulfonaat (CHAPS), 65 mM DTT, 1 mM PMSF, 180  $\mu\text{g/ml}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 2,1 mg/ml NaF, 17,3 mg/ml  $\beta$ -glütserofostaat) ning segule lisati 200  $\mu\text{l}$  *Silibead* (Biotop) kuule läbimõõduga 0,4–0,6 mm. Rakkude lõhkumiseks väristati proove 40 sekundit kiirusega 4 m/s *FastPrep-24* (MP Biomedicals) homogenisaatoriga. Lüsaaadi eraldamiseks kuulidest tehti tsentrifuugituubi põhja nõelaga auk ning see tuub pandi teise tuubi ja tsentrifuugiti 2 sekundit 1500 g. Seejärel tsentrifuugiti lüsaaati 10 minutit 16000 g ning supernatant tõsteti uude tsentrifuugituubi. Proovide totaalse valgukontsentratsiooni määramiseks kasutati *Bio-Rad Protein Assay* lahust (Biorad) vastavalt tootja juhistele. SDS-poluakrüülamiid geelile laeti maksimaalselt 12  $\mu\text{l}$  lüsaaati, millele lisati 4  $\mu\text{l}$  4x Laemmli-SDS puhvrit (250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 8% SDS, 40% glütserool, 20%  $\beta$ -merkaptopetaanol, 0,04% broomfenoolsinine). Ühe katse piires laeti radadele võrdne totaalse valgukontsentratsiooni hulk.

Cln2-7myc liitvalkude ekspressiooni analüüsimiseks ja Srl3-13myc fosforüleeritud vormide lahutamiseks kasutati 8% akrüülamiidiga (37,5:1 akrüülamiid/bis-arküülamiid) SDS-PAA-geele. Cdc24-13myc ja 10myc-Sli15 variantide fosforüleerimise analüüsimiseks lahutati valgud *Phos-Tag* (Wako Chemicals) SDS-PAA-geelides, milles oli 6% (Cdc24) või 8% (Sli15) akrüülamiid (29:1 akrüülamiid/bis-akrüülamiid), 25  $\mu\text{M}$  *Phos-Tag* reagent ja 50  $\mu\text{M}$

MnCl<sub>2</sub>. SDS-PAA-geele elektroforeesiti *Hoefler SE 260* (Amersham Biosciences) elektroforeesiaparatuuridega *EPS 301* voolublokkidega (Amersham Biosciences) konstantsel voolutugevusel 15 mA geeli kohta 80–120 minutit.

Valkude ülekanne nitrotselluloosmembraanile teostati *Pierce G2 Fast Blotter* seadmega (Thermo Scientific) *semi-dry* puhvrts (5,8 g/l Tris, 2,9 g/l glütsiin, 0,37 g/l SDS, 20% metanool) või *Phos-Tag* geelide puhul *IBlot* ülekanndesüsteemiga (Thermo Scientific) vastavalt tootja juhistele. Membraanile kandunud valkude võrdset kogust erinevatel radadel kontrolliti *Ponceau S* (Sigma) värvimisega. Valkude seondumiskohtade täitmiseks membraanil loksutati membraani tund aega TBS-T puhvrts (50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20), millesse oli lisatud 5% rasvavaba piimapulbrit. Primaarseid antikehasid (C-myc (A-14) sc-789 küüliku polükloonaalne IgG antikeha (Santa Cruz Biotechnology) ja hiire anti-HA.11 kloon 16B12 monokloonaalne IgG antikeha (Biolegend)) kasutati 1/500 lahjendustena TBS-T puhvrts, millesse oli lisatud 3% rasvavaba piimapulbrit ja 0,03% naatriumasiidiga. Antikeha seondumiseks epitoopidega loksutati membraani tund aega primaarse antikeha lahuses, millele järgnesid pesud 100 ml TBS-T puhvrtsiga (esmlt 15 minutit, seejärel 3 korda 5 minutit) loksutades. Sekundaarseid antikehasid (küüliku IgG-vastased kitse antikehad, mis olid konjugeeritud mädarõika peroksüdaasiga (LabAs) ja hiire IgG-vastased kitse antikehad, mis oli konjugeeritud mädarõika peroksüdaasiga (LabAs)) kasutati 1/7500 lahjendustena TBS-T puhvrts, millesse oli lisatud 3% rasvavaba piimapulbrit. Sekundaarsete antikehade seondumiseks loksutati membraani antikeha lahuses 30 minutit, millele järgnesid pesud 50 ml TBS-T puhvrtsiga (esmlt 15 minutit, seejärel 3 korda 5 minutit) loksutades. Antikehad detekteeriti *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific) lahusega vastavalt tootja juhistele. Kõiki *Western Blot* analüüsi sisaldavaid katseid tehti kaks korda. Katsetes kasutatud tüved ja plasmiidid on toodud lisas 5.

## 2.2.9. Punga polariseeritud kasvu katse

Pärmitüve DOM0090 rakkudesse transformeeriti pRS413 vektoril põhinevad plasmiidid, milles olid *GALI* promootori kontrolli all erinevad *GST-CLN2* variandid. Rakke kasvatati temperatuuril 30 °C 5 ml SC-His söötmes, milles oli energiaallikaks 20 mg/ml rafinoosi, ning kultuuri optilisel tihedusel OD<sub>600</sub>=0,5 indutseeriti GST-Cln2 ekspressioon, lisades söötmele galaktoosi lõppkontsentratsioonini 2%. Kaks tundi pärast indutseerimist eemaldati 180 µl kultuuri, mis segati 20 µl 37% formaldehüüdiga. Fikseeritud rakke pildistati *Axio Observer.Z1* mikroskoobiga (Zeiss), kasutades 63x/1.4 plan-apokromaatilist õliimmersiooniga diferentsiaal-interferentskontrast objektiiv (Zeiss). Katset tehti kaks korda

ning igast *CLN2* variandist analüüsiti kokku 90 punga. Punga pikkus mõõdeti punga kaelast tipuni, kasutades *ImageJ* programmi.

### **2.2.10. Tilkülvi katse**

*S. cerevisiae* tüve DK252 rakke, millesse olid transformeeritud plasmiidid pMO173, pMO174, pMO178, pMO179 või pMO180 (kirjeldus lisas 4), kasvatati 5 ml 2% rafinoosi ja 2% galaktoosiga SC-Trp söötmes Infors HT Multitron loksutil pööretel 160 rpm temperatuuril 30 °C kuni kultuuri tiheduseni  $OD_{600}=0,2-0,6$ . Kultuuridest tehti samasse söötmesse lahjendusread, mille kõige kontsentreeritumas oli  $10^6$  rakku/ml ning järgnevalt 2-, 10-, 100- ja 500-kordsed lahjendused esimesest. Lahjendusridadest külvati 5  $\mu$ l kas 2% glükoosiga või 2% rafinoosi ja 2% galaktoosiga SC-Trp plaatidele. Rakke kasvatati 30 °C juures 48 tundi. Tilkülvi katset tehti kaks korda.

### **2.2.11. Elusraku mikroskoopia**

*S. cerevisiae* rakud kasvatati 2% glükoosiga SC-Trp söötmes tiheduseni  $OD_{600}=0,2-0,6$ . 1,5  $\mu$ l rakukultuuri pipeteeriti 24x50x0,17 mm katteklaasile ning selle peale tõsteti 1 mm paksune 1% *Lonza NuSieve GTG* agarosiga (Thermo Scientific) SC-Trp tardsööde, millesse oli lisatud 2% glükoosi. Rakke pildistati *Axio Observer.Z1* mikroskoobiga, kasutades 63x/1.4 plan-apokromaatilist õliimmersiooniga diferentsiaal-interferentskontrast objektiivi (Zeiss). Katse jooksul hoiti rakke temperatuuril 30 °C objektiivi soojendaja abil. Rakke pildistati kuni 10 vaateväljalt 6 tunni jooksul iga 3 minuti järel ning igast vaateväljast tehti nii faasikontrast- kui ka fluorestsentspildid. Fokuseerimisel kasutati *Definite Focus* (Zeiss) süsteemi. GFP (i.k. *Green Fluorescent Protein*) ergastamiseks kasutati Colibri LED 470 moodulit ning mCherry ergastamiseks Colibri 540-80 LED moodulit 25% võimsusel. Säriaeg Sic1-GFP pildistamisel oli 15 ms, Sli15-GFP puhul 150 ms ning Whi5-mCherry jaoks 750 ms. Sli15-GFP lokaliseerimiseks selgitamiseks joonisel 16B pildistati rakke kultuurist tihedusel  $OD_{600}=0,2-0,6$  ning igast rakust tehti pildid viielt fookustasapinnalt (tasapindade erinevus 0,26  $\mu$ m). Katsetes kasutatud tüved ja plasmiidid on toodud lisas 5.

Pildianalüüsil rakkude detekteerimiseks ning Sic1-GFP ja Whi5-mCherry fluorestsentssignaalide kvantifitseerimiseks kasutati *MATLAB* (MathWorks) tarkvara programme (Skotheim jt, 2008; Doncic jt, 2013).

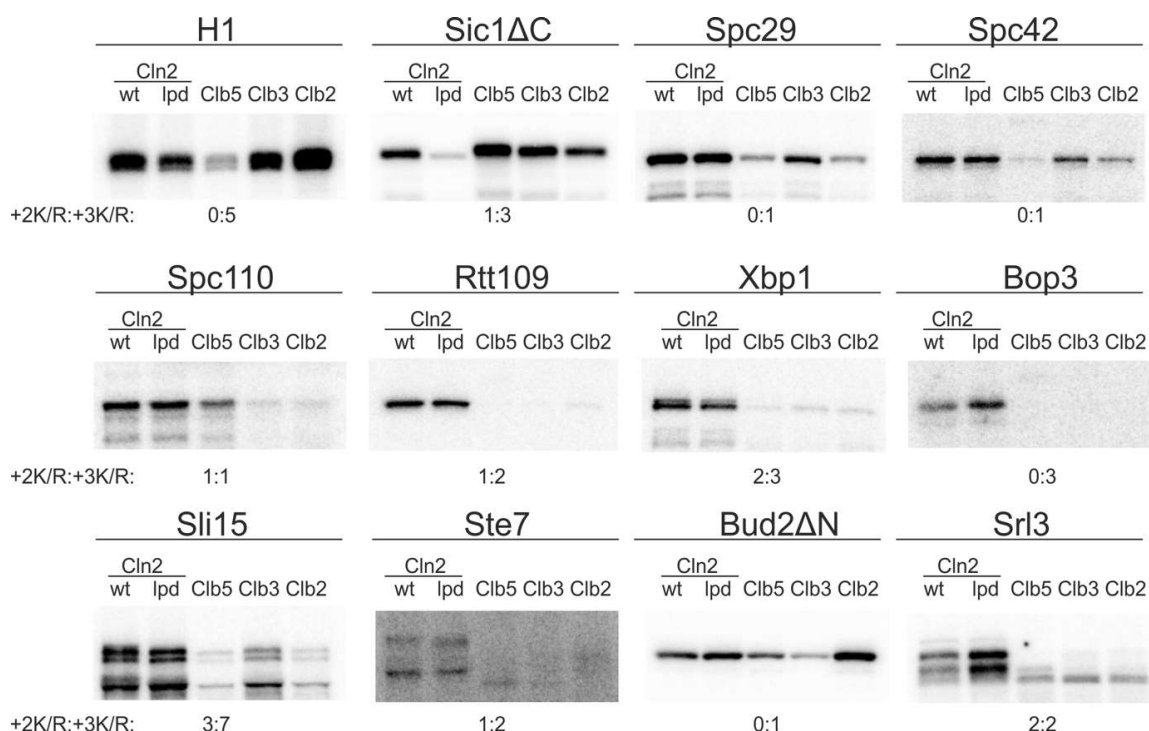
Ilma tsükliiniga Cln2 või mutantsete Cln2 ja metsiktüüpi tsükliiniga Cln2 rakkude suuruse võrdlemiseks ning Sic1 lagundamise ja punga tekke ajastuse erinevuse kontrollimiseks kasutati Studenti T-testi. Sli15 lokaliseerimise ja mitoosikävi jaotuse katses kontrolliti eri Cln2 variantidega rakkude erinevusi metsiktüüpi Cln2-ga rakkudest  $\chi^2$ -testiga.

## 2.3. Tulemused ja arutelu

### 2.3.1. Mitmete Cln2-Cdk1 substraatide fosforüleerimine toimub sõltumatult LP-interaktsioonist

Magistritöö esimeseks eesmärgiks oli analüüsida LP-motiivi olulisust Cln2-Cdk1 substraatide fosforüleerimisel ning selgitada, kas lisaks valgule Srl3 on veel Cln2 substraate, mille efektiivne fosforüleerimine ei sõltu LP-motiiviga seondumisest.

Selleks analüüsiti 12 valgu (histoon H1, Sic1 $\Delta$ C, Spc29, Spc42, Spc110, Rtt109, Xbp1, Bop3, Sli15, Ste7, Bud2 $\Delta$ N, Srl3) fosforüleerimist *in vitro* kinaasikatses Cdk1 komplekside poolt, milles tsükliiniks oli kas Cln2, mutantne LP-motiiviga mitteseonduv Cln2(lpd), Clb5, Clb3 või Clb2 (joonis 7). Sellise tsükliin-Cdk1 komplekside paneeli kasutamine võimaldab hinnata, milline on substraatvalgu tsükliinispetsiifilisus, kui suurel määral mõjutab LP-seondumine substraadi fosforüleerimist ning kas substraat on Cln2-spetsiifiline ka ilma LP-interaktsioonita. Katsetes kasutati ensüüme võrdsetes kontsentratsioonides ning Cln2-spetsiifiliseks loeti substraadid, mis olid enim fosforüleeritud Cln2-Cdk1 poolt.



**Joonis 7. Mitmete Cdk1 substraatide fosforüleerimine on Cln2-spetsiifiline ning ei sõltu LP-interaktsioonist.** Joonisel on esitatud autoradiograafid fosforüleeritud substraatvalkudest (histoon H1, Sic1 $\Delta$ C, Spc29, Spc42, Spc110, Rtt109, Xbp1, Bop3, Sli15, Ste7, Bud2 $\Delta$ N, Srl3). Substraatvalke fosforüleeriti Cdk1 komplekside poolt, milles tsükliiniks oli kas Cln2, mutantne LP-motiiviga seondumisvõimetu Cln2(lpd), Clb5, Clb3 või Clb2. Autoradiograafide all toodud +2K/R:+3K/R näitab Cln2-spetsiifiliste (+2K/R) ja optimaalsete (+3K/R) fosforüleerimismotiivide arvu vastavas valgus.

Cdk1 substraat Sic1 sisaldab nii LP- kui ka RxL-seondumismotiive ning LP-motiiv kiirendab Sic1 $\Delta$ C fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt 7 korda (joonis 7). LP-motiiviga seondumisvõimetu Cln2(lpd)-Cdk1 kompleks fosforüleerib Sic1 $\Delta$ C valku 6 korda aeglasemalt kui Clb2-Cdk1, mis kinnitab Clb2-Cdk1 kõrgemat aktiivsust ilma seondumismotiivideta substraadi suhtes.

Lisaks eelnevalt teadaolevatele Cln2-spetsiifilistele Cdk1 substraatidele, on ka Spc29, Spc110, Ste7 ja Srl3 tugevaimalt fosforüleeritud Cln2-Cdk1 kompleksi poolt (joonis 7). Üheksa Cln2-spetsiifilise substraadi – Spc29, Spc42, Spc110, Rtt109, Xbp1, Bop3, Sli15, Ste7 ja Srl3 – fosforüleerimist LP-interaktsioon ei mõjuta.

Cln2-Cdk1 võib võrreldes Clb-Cdk1 kompleksidega efektiivsemalt fosforüleerida kohti, milles on lüsiini- või arginiini jääk fosforüleeritavast aminohappejäägist +2 positsioonis (+2K/R), kuid mitte +3 positsioonis (+3K/R). Spc29, Spc42 ning Bop3 valkudel puuduvad +2 positiivse aminohappejäägiga fosforüleerimismotiivid ning ka teistel uuritud substraatidel on vastavaid fosforüleerimismotiive kas vähem või sama palju kui optimaalseid fosforüleerimismotiive. Seega ei saa kirjanduses avaldatud teadmistega selgitada, mis põhjustel fosforüleerib Cln2-Cdk1 kompleks valke Spc29, Spc42, Spc110, Rtt109, Xbp1, Bop3, Sli15 ja Ste7 kiiremini kui kõrgema aktiivsusega Clb-Cdk1 kompleksid.

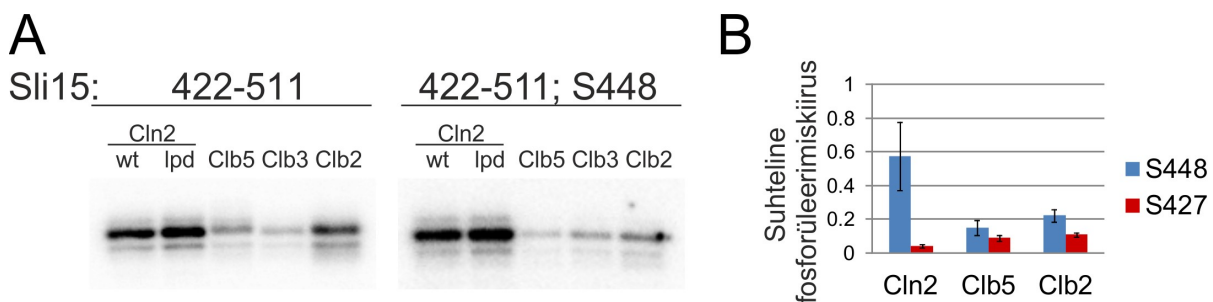
Spc29 ja Spc110 on käävi polaarkoha valgud, mille fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt ei ole varem näidatud. *In vitro* kinaasireaktsioonis on nad tugevalt Cln2-spetsiifilised Cdk1 substraadid (joonis 7), mistõttu võivad Spc29 ja Spc110 olla olulised Cln2-Cdk1 substraatvalgud käävi polaarkoha duplikatsioonil. Lisaks identifitseeriti Cln2-Cdk1 substraadina feromooni raja valk Ste7, mille fosforüleerimine võib täiendavalt vaigistada feromooni signaalirada.

### **2.3.2. Positiivselt laetud motiiv soodustab Sli15, Bud2 ja Rtt109**

#### **fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt**

LP-motiivist sõltumatute Cln2-Cdk1 substraatide täpsemaks uurimiseks vajaliku mudelsubstraadi leidmiseks tehti joonisel 7 leitud substraatidest sekundaar- ja tertsiaarstruktuuri ennustused, kasutades vastavalt programme *PSIPRED* v3.3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) ja *I-TASSER* (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Selgus, et Spc29, Spc42, Spc110, Rtt109, Xbp1, Ste7 ja Srl3 valgud koosnevad suurel määral kõrgema struktuuriga aladest, samas Sli15 ja Bop3 sisaldavad pikemaid ilma kindla tertsiaarstruktuurita regioone, milles asuvad Cdk1 fosforüleerimismotiivid. LP-motiivist sõltumatute substraatide üksikasjalikumaks uurimiseks kasutati Sli15 valku.

Piiritlemaks täpsemalt valgus Sli15 Cln2-spetsiifiliselt fosforüleeritavat regiooni, uuriti substraadina Sli15 fragmenti aminohappejäägist 422 kuni aminohappejäägini 511 (Sli15(422–511)). Ilmnes, et ka seda Sli15 lõiku fosforüleerib Cln2-Cdk1 kompleks kiiremini kui Clb-Cdk1 kompleksid (joonis 8A). Sli15(422–511) valk sisaldab viit optimaalset (S427, S437, S448, S462 ja T474) ja ühte suboptimaalset (S489) Cdk1 fosforüleerimissaiti. Mudelsubstraadi täiendavaks lihtsustamiseks asendati S427, S437, S462, T474 ja S489 alaniinidega, jättes ainukeseks fosforüleerimissaidiks S448. See mudelsubstraat tähistati Sli15(422–511; S448). Cln2-Cdk1 fosforüleerib Sli15(422–511; S448) valku samaselt Sli15 valgule 7 korda kiiremini kui Clb2-Cdk1 (joonis 8A). Järelikult on kõnealune Sli15 mutant säilitanud oma Cln2-sõltuvat fosforüleerimist soodustavad omadused, mistõttu kasutati seda mudelsubstraadina Cln2-Cdk1-vahendatud fosforüleerimise uurimiseks. Sli15(422–511) valgus ei ole kõik optimaalsed fosforüleerimissaidid Cln2-Cdk1 poolt võrdselt fosforüleeritud. Cln2-Cdk1 fosforüleerib Sli15(422–511; S448) valku 2 korda aeglasemalt kui Sli15(422–511) valku, milles on 5 optimaalset fosforüleerimissaiti, samas kui Clb5- ja Clb2-sõltuv Sli15(422–511; S448) valgu fosforüleerimine aeglustub oodatult ligikaudu 5 korda võrreldes Sli15(422–511) fosforüleerimisega (joonis 8A, 8B). Lisaks ei ole kõik fosforüleerimissaidid Sli15(422–511) valgus Cln2-spetsiifilised, näiteks S427 on Cln2-Cdk1 poolt aeglasemalt fosforüleeritud kui Clb5- või Clb2-Cdk1 poolt (joonis 8B).



**Joonis 8. Sli15(422–511; S448) on Cln2-spetsiifiline Cdk1 substraat.** (A) Autoradiograafid, mis näitavad fosforüleerimist tsükliin-Cdk1 komplekside poolt Sli15 segmendil, milles on alles Sli15 aminohappejäägid positsioonidest 422 kuni 511 (Sli15(422–511)) ja samal Sli15 segmendil, milles on Cdk1 fosforüleerimissaitidest alles vaid S448 (Sli15(422–511; S448)). (B) *In vitro* kinaasireaktsioonide fosforüleerimissignaalid kvantifitseeriti ning toodud graafikul on Sli15(422–511) üksikute fosforüleerimissaitide S427 ja S448 suhtelised fosforüleerimiskiirused võrreldes algse Sli15(422–511) valguga. Veapiirid näitavad keskväärtuse 95% usaldusintervalle.

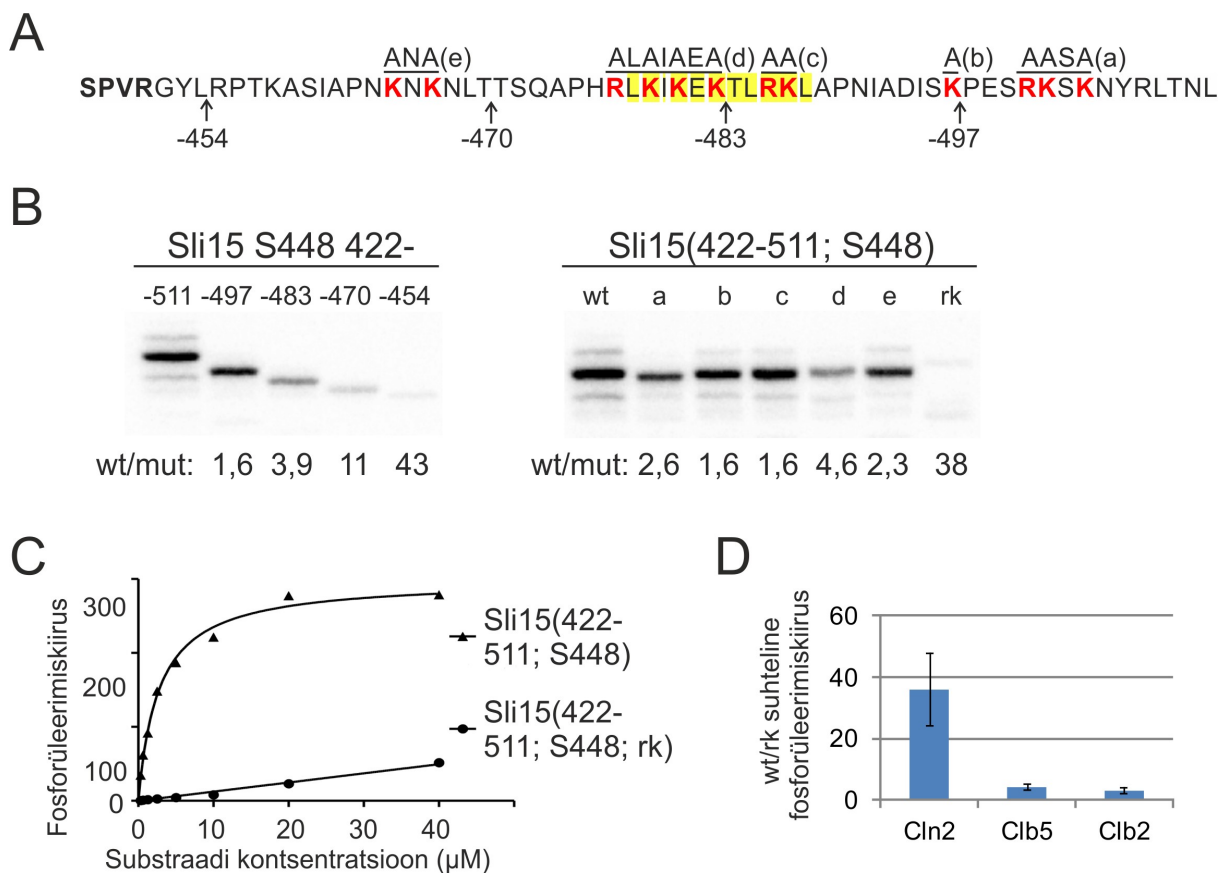
Cln2-spetsiifilisust põhjustava regiooni täpsemaks piiritlemiseks deleteeriti Sli15(422–511; S448) C-terminaalsest otsast neli erineva pikkusega lõiku, valmistades konstruktid, mille poolt kodeeritav polüpeptiid ulatub Sli15 positsioonini 454, 470, 483 ja 497 (joonis 9A). Uurides nende polüpeptiidide fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt *in vitro* leiti, et substraadi

pikkuse kahanemisega kaasneb nende fosforüleerimise järk-järguline aeglustumine (joonis 9B), mis võib tähendada, et igas eemaldatavas lõigus on midagi, mis stimuleerib fosforüleerimist. Deletsioonide järjestikune mõju fosforüleerimisele varieerub vahemikus 2–3,5 korda, seega paikneb Cln2-spetsiifilisuse põhjus võrdlemisi ühtlaselt 57 aminohappelises lõigus, mis on oluline erinevus võrreldes eelnevalt leitud Cdk1-sõltuvat fosforüleerimist stimuleerivate üksikute lühikeste lineaarsete motiividega.

Sli15 iga ülalkirjeldatud deletsioon eemaldab valgust lüsiini- ja arginiinijääke ning nende asendamine alaniinijääkidega langetab deleteerimisega sarnaselt Cln2-Cdk1-sõltuvat fosforüleerimist (joonis 9A, B). Iga üksiku positiivselt laetud lõigu asendamisega langeb fosforüleerimine 1,6–4,6 korda, kuid kõikide motiivide samaaegne asendamine aeglustab fosforüleerimist 38 korda (rk mutant). Seega, mitmete motiivide kumulatiivne mõju fosforüleerimisele sarnaneb substraatvalgu lühendamisel saadud tulemusele, samas kui iga üksiku motiivi efekt on väike. Kõige tugevam mõju Cln2-Cdk1-sõltuval fosforüleerimisele on <sup>477</sup>RLKIKEK<sup>483</sup> järjestuses lüsiini- ja arginiinijääkide asendamisega alaniinijääkidega (mutant d, joonis 9A, B), mille tagajärjel fosforüleerimine langeb 4,6 korda. See järjestus on osa  $\alpha$ -heeliksist <sup>478</sup>LKIKEKTLRKL<sup>488</sup>, milles positiivselt laetud aminohappejäägid koonduvad heeliksi ühele küljele (joonis 10F). Seega võivad positiivselt laetud aminohappejääkide rikkad lõigud peptiidahelas soodustada fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt.

Selleks, et selgitada, kas need positiivselt laetud motiivid tugevdavad Cln2-Cdk1 kompleksi seondumist substraatvalguga, analüüsiti fosforüleerimiskiiruse sõltuvust substraatvalgu kontsentratsioonist valgul Sli15(422–511; S448) ja valgul Sli15(422–511; S448; rk), milles on kõik joonisel 9A punasega märgitud lüsiini- ja arginiinijäägid asendatud alaniinijääkidega. Sli15(422–511; S448) valgu Michaelise konstant ( $K_M$ ) Cln2-Cdk1 suhtes on 2,7  $\mu$ M, samas kui mutantse valgu  $K_M$  on oluliselt suurem (joonis 9C). Cln2-Cdk1 kompleksi  $K_M$  optimaalset fosforüleerimismotiivi sisaldava peptiidi suhtes on 747  $\mu$ M (Kõivomägi jt, 2011b), mis on üle 250 korra kõrgem kui Sli15(422–511; S448) valgu puhul. Järelikult suurendavad positiivselt laetud motiivid substraatvalgu seondumisafiinsust Cln2-Cdk1 kompleksiga, võimaldades efektiivset fosforüleerimist.

Uuritud Sli15 lõigus fosforüleerib Cln2-Cdk1 kompleks fosforüleerimissaiti S448 14 korda kiiremini kui saiti S427 (joonis 8B). Seetõttu võib sarnaselt eelnevalt kirjeldatud tsükliin-substraat seondumisinteraktsioonidele ka leitud seondumise mõju valgu fosforüleerimisele sõltuda seondumismotiivi ja fosforüleeritava aminohappejäägi omavahelisest paiknemisest.



**Joonis 9. Sli15 efektiivset fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt võimaldavad positiivselt laetud motiivid.** (A) Selgitav skeem, millel on Sli15 järjestus positsioonidest 448 kuni 511. Rasvaselt on märgitud Cdk1 fosforüleerimismotiiv (SPVR) ja punaselt asendatud lüsiini- ja arginiini jäägid; a, b, c, d ja e tähistavad joonisel 9B kasutatud mutante, milles asendati aminohappejäägid, ja nooled tähistavad joonisel 9B kasutatud deletsioonimutante. rk mutandis asendati kõik punaselt märgitud aminohappejäägid alaniinjääkidega. (B) Autoradiograafid, mis näitavad Sli15 eri variantide fosforüleerimist Cln2-Cdk1 kompleksi poolt *in vitro*. Autoradiograafide all on toodud fosforüleerimiskiiruste suhe Sli15(422–511; S448) (wt) ja Sli15 eri mutantide (mut) vahel. (C) Michaelis-Menteni graafik Sli15(422–511; S448) või Sli15(422–511; S448) rk mutandi fosforüleerimisest Cln2-Cdk1 poolt. (D) Sli15(422–511; S448) (wt) ja asendatud lüsiini- ja arginiini jääkidega variandi (rk) fosforüleerimist Cln2-, Clb5- ja Clb2-Cdk1 kompleksi poolt uuriti *in vitro*. Graafikul on mutandi suhteline fosforüleerimiskiirus võrreldes algse Sli15(422–511; S448) valguga, veapiirideks on keskvärtuse 95% usaldusintervallid.

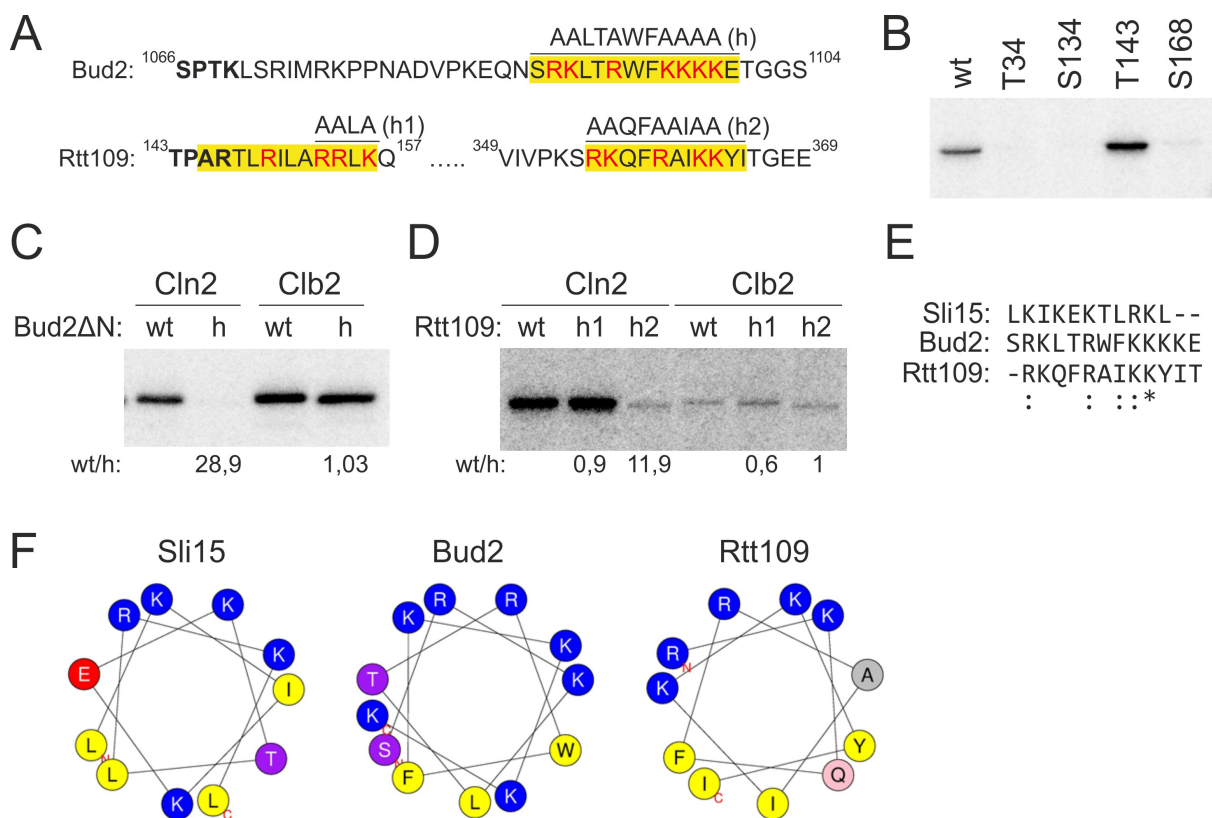
Sli15 uuritavas lõigus langetab arginiini- ja lüsiini jääkide asendamine Cln2-Cdk1-vahendatud fosforüleerimist 38 korda, samas kui Clb5-Cdk1 ja Clb2-Cdk1 fosforüleerimine väheneb 3–4 korda (Joonis 9D). Tehtud asendustel on ligikaudu kümme korda tugevam mõju Cln2-sõltuvale fosforüleerimisele, mõjudes seega Cln2-spetsiifiliselt. Positiivselt laetud aminohappejääkide asendamise mõju fosforüleerimisele Clb5-Cdk1 ja Clb2-Cdk1 poolt võib tuleneda fosforüleerimissaidi S448 suuremast varjestatusest peptiidahela poolt.

Kuna Sli15 valgus stimuleerib fosforüleerimist kõige tugevamalt positiivselt laetud amfipaatne  $\alpha$ -heeliks, otsiti sarnaseid  $\alpha$ -heelikseid teistest joonisel 7 leitud Cln2-Cdk1 substraatidest. Selgus, et punga morfogeneesis osalev valdavalt globulaarne valk Bud2 sisaldab C-terminaalset lahusele avatud ala, milles on üks Cdk1 fosforüleerimismotiiv (S1066). Nimetatud motiivist 21 aminohappejäägi kaugusel valgu C-terminuses on  $\alpha$ -heeliks, milles lüsiini- ja arginiinijäägid paiknevad heeliksi ühel küljel (joonis 10A, F). Veel leiti, et histooni atsetüültransferaasis Rtt109 on kaks niisugust  $\alpha$ -heeliksit (joonis 10A, F). Rtt109 valgus on viis Cdk1 fosforüleerimismotiivi, kuid enamus Cln2-Cdk1-vahendatud fosforüleerimisest on suunatud fosforüleerimissaiti T143 (joonis 10B).

Bud2 ja Rtt109 valkudes asendati uuritavates  $\alpha$ -heeliksites lüsiini- ja arginiinijäägidalaniinijääkidega, nagu on näidatud joonisel 10A, ning vastavate valkude fosforüleerimist Cln2- ja Clb2-Cdk1 komplekside poolt mõõdeti *in vitro*.  $\alpha$ -heeliksi lüsiini- ja arginiinijääkide asendamine langetab Bud2 fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt ligikaudu 29 korda, samas kui Clb2-Cdk1-vahendatud fosforüleerimist nende aminohappejääkide asendamine ei mõjuta (Joonis 10C). Rtt109 valgu fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt ei mõjuta positsioonides 145–156 paiknevas  $\alpha$ -heeliksis aminohappejääkide R153, R154 ja K156 asendaminealaniinijääkidega (h1 mutant) (joonis 10D). Seevastu Rtt109 valku, milles on positsioonides 355–365 paiknevas  $\alpha$ -heeliksis positiivselt laetud aminohappejäägid asendatudalaniinijääkidega (h2 mutant), fosforüleerib Cln2-Cdk1 ligi 12 korda aeglasemalt kui metsiktüüpi valku (wt) (joonis 10D). Rtt109 positsioonides 145–156 oleva  $\alpha$ -heeliksi mõju uurimisel asendati vaid C-terminaalsed R153, R154 ja K156, sest R146 ja R149 paiknevad fosforüleerimissaidi T143 vahetus läheduses, mistõttu nende muteerimine võib mõjutada Cdk1 aktiivtsentri seondumist fosforüleerimissaidiga. Tehtud asendused Bud2 ja Rtt109  $\alpha$ -heeliksites ei mõjuta oluliselt nende valkude fosforüleerimist Clb2-Cdk1 poolt, mis näitab, et muutused nende muteeritud valkude fosforüleerimisel ei tulene kinaaside halvemast ligipääsust fosforüleerimissaidile ning et leitud seondumismotiiv on Cln2-spetsiifiline (joonis 10C, D). Kõigile muteeritud  $\alpha$ -heeliksitega valkudele tehti sekundaarstruktuuri ennustused *PSIPRED v3.3* programmiga, mille alusel jäid kõik  $\alpha$ -heeliksid lüsiini- ja arginiinijääkide asendamisel alles.

Seni kirjeldatud tsükliin-substraat interaktsioonide puhul peab fosforüleerimise stimuleerimiseks toimuma samal ajal nii tsükliin-substraat seondumine kui ka kinaasi aktiivtsentri ja fosforüleerimissaidi vaheline seondumine (Takeda jt, 2001; Kõivomägi jt, 2013). Rtt109  $\alpha$ -heeliks positsioonides 145–156 (h1) paikneb fosforüleerimissaidi T143

vahetus läheduses, mistõttu võib seandumismotiiv paikneda fosforüleerimissaidile liiga lähedal, et saaks toimuda samaaegne tsükliin-substraat ja T143-aktiivtsenter seundumine.



**Joonis 10. Bud2 ja Rtt109 fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt stimuleerivad  $\alpha$ -heeliksid, milles positiivselt laetud aminohappejäägid paiknevad heeliksi ühel küljel (A) Skeemid, millel on aminohappelised järjestused Bud2 positsioonist 1066 kuni 1104 ja Rtt109 positsioonist 143 kuni 157 ning 349 kuni 369. Cdk1 fosforüleerimismotiivid on märgitud rasvaselt, potentsiaalselt fosforüleerimist stimuleerivad lüsiini- ja arginiinijäägid punaselt. (B) Autoradiograaf, mis näitab Rtt109 mutantsete valkude, milles on alles üks Cdk1 fosforüleerimissait (T34, S134, T143 või S168), fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt. (C, D) Autoradiograafid näitavad Bud2 valgu C-terminaalse ala (positsioonist 1000 kuni positsioonini 1104) ja Rtt109 fosforüleerimist Cln2- ja Clb2-Cdk1 komplekside poolt. Wt tähendab muteerimata valku ning h puhul on uuritavatesse heeliksitesse tehtud asendused nagu joonisel 10A. (E) Sli15, Bud2 ja Rtt109 uuritud heeliksiste järjestuste joondused, mis tehti ClustalW programmiga (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>). (F) Cln2-sõltuvat fosforüleerimist stimuleerivate  $\alpha$ -heeliksiste (Sli15 positsioonid 478–488, Bud2 1088–1100, Rtt109 355–366) projektsioonid, mis tehti *HeliQuest* programmi (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) abil.**

Selleks, et analüüsida, kas Cln2-sõltuvat fosforüleerimist stimuleerivatel  $\alpha$ -heeliksitel on veel sarnasusi, joondati need ClustalW programmiga (joonis 10E). Uuritavad  $\alpha$ -heeliksid joonduvad üle kahe või kolme aminohappejäägi paiknevate lüsiini- või arginiinijääkide alusel ning ainuke täiendav sarnasus on hüdfoobse aminohappejäägi (Sli15 valgus leutsiini-, Bud2 fenüülalaniini-, Rtt109 isoleutsiini-) paiknemine enne kolmandat järjestikkust positiivset

aminohappejääki (joonis 10E). Arvestades, et leutsiin, fenüülalaniin ja isoleutsiin on küllalt erinevad aminohapped, võib see sarnasus olla juhuslik ja funktsionaalselt ebaoluline. Valgu Rtt109 on vastava  $\alpha$ -heeliksi hüdrofoobne pool suunatud valgu struktuuri sisse ning ei ole lahusele ligipääsetav. Siiski ei saa tehtud katsete tulemusel välistada, et  $\alpha$ -heeliksi teisel küljel asuvad hüdrofoobsed aminohappejääd osalevad tsükliin-substraat seondumises. Kokkuvõttes võib Sli15, Bud2 ja Rtt109 valkude uurimise tulemuste põhjal öelda, et Cln2-sõltuvat fosforüleerimist stimuleerivad positiivselt laetud aminohappejäädide kogumid, millest tugevaimat mõju omavad  $\alpha$ -heeliksid, milles vähemalt kolm positiivselt laetud aminohappejääki asuvad järjestikku  $\alpha$ -heeliksi ühel küljel. Kuna leitud seondumismotiivides on kesksel kohal lüsiini- ja arginiini jäägid, nimetati uus motiiv KR-motiiviks.

### 2.3.3. Vähenenud spetsiifilise aktiivsusega Cln2 mutantide kirjeldamine

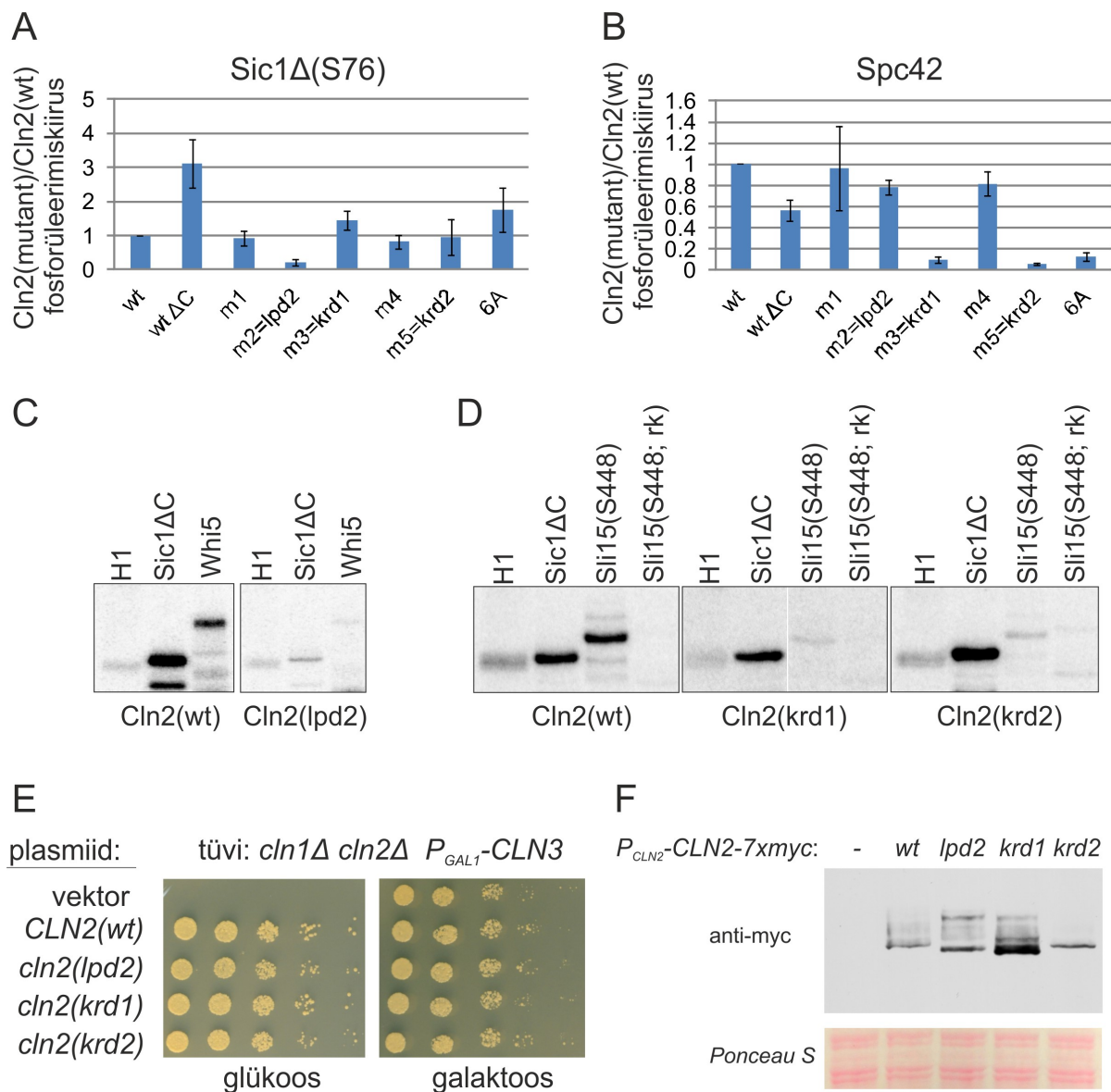
Analüüsimaiks KR-motiivi olulisust suurema hulga valkude fosforüleerimisel ning Cln2 funktsioonide täitmisel *in vivo* otsiti KR-motiiviga seondumisvõimetuid Cln2 mutante. Mutatsioone tehti kohtadesse, mis tertsiaarstruktuuri ennustuse alusel võiksid paikneda valgu pinnal ning mis sisaldavad konserveerunud polaarseid aminohappejääke. Struktuuriennustus tehti *I-TASSER* programmiga ning *Saccharomyces*'e perekonna liikide Cln2 valkude järjestuste joondus *Saccharomyces Genome Database* leheküljel (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/FUNGI/showAlign>). Cln2 mutantides tehtud aminohappelised asendused ja nende paiknemine Cln2-CDK-Cks1 struktuuril on näidatud lisas 1.

*In vitro* kinaasireaktsioonides analüüsiti Cln2 mutantide aktiivsust kolme substraadi suhtes: 1) optimaalset fosforüleerimissaiti sisaldav peptiid, 2) Sic1 mutant, milles on alles vaid fosforüleerimissait S76 (Sic1 $\Delta$ C(S76)) ning 3) Spc42. Substraadi fosforüleerimiskiirus näitab peptiidi korral kinaasi üldist aktiivsust, Sic1 $\Delta$ C(S76) korral tsükliini võimet seonduda LP-motiiviga (Kõivomägi jt, 2011b) ning Spc42 korral LP-motiivist sõltumatut Cln2-spetsiifilist fosforüleerimist.

Cln2 mutant m2 fosforüleerib Sic1 $\Delta$ C(S76) valku ligikaudu 5 korda aeglasemalt kui metsiktüüpi Cln2(wt), samas kui valgu Spc42 fosforüleerimine Cln2(m2) ja Cln2(wt) poolt erineb vähe (joonis 11A, B). Võrdsel ensüümide kontsentratsioonil fosforüleerivad Cln2(wt)-Cdk1 ja Cln2(m2)-Cdk1 CDK-de mudelsubstraati histooni H1 võrdse kiirusega, kuid Sic1 $\Delta$ C ja Whi5 valke fosforüleerib Cln2(m2)-Cdk1 vastavalt 18 ja 13 korda aeglasemalt kui Cln2(wt)-Cdk1 (joonis 11C). Sic1 ja Whi5 on põhjalikult uuritud Cln2-Cdk1 substraadid, mille kiire fosforüleerimine toimub LP-interaktsiooni abil (Kõivomägi jt, 2011b; Bhaduri jt,

2015). Seega on Cln2(m2) mutandil spetsiifiline LP-sõltuvate substraatvalkude fosforüleerimise defekt. Selle omaduse kajastamiseks nimes anti mutandile Cln2(m2) uus nimi Cln2(lpd2). Aminohappelised asendused mutandis Cln2(lpd2) paiknevad valgu pinnal lingus, mille kõrval olevas lingus asuvad eelnevalt leitud mutandis Cln2(lpd) asendatud aminohappejäägid (lisa 1; Bhaduri jt, 2015). Need kaks kõrvuti asetsevat lingu võivad seega moodustada ühise seondumisala substraatide LP-motiivi jaoks. Mutandis Cln2(lpd2) asendati järjestus <sup>63</sup>DQQPEMN<sup>69</sup> järjestusega AQAPAMA, kusjuures eelnevalt on leitud, et E67 muteerimisel on negatiivne mõju rakkude kasvule ilma Clb5 ja Clb6 tsükliinideta pärmitüves, kuid D63 muteerimisel mõju puudub (Huang jt, 1997). Tüves, milles puuduvad Clb5 ja Clb6, võib Sic1 lagundamine sõltuda rohkem selle fosforüleerimisest Cln2-Cdk1 poolt, seega on seal suurenenud vajadus LP-sõltuvaks fosforüleerimiseks. Seetõttu võib arvata, et LP-motiivi seondumisel osaleb E67 ja võib-olla ka Q65 ja N69, kuid mitte D63.

Kolme Cln2 mutandi (m3, m5 ja 6A) Cdk1 kompleksid fosforüleerivad Spc42 valku oluliselt aeglasemalt kui Cln2(wt)-Cdk1 (joonis 11B). Nimetatud mutandid suudavad efektiivselt fosforüleerida LP-motiiviga Sic1 valku, kuid mitte KR-motiivist sõltuvat Sli15(422–511; S448) valku (joonis 11A, D). Seetõttu nimetati mutandid Cln2(m3) ja Cln2(m5) mutantideks Cln2(krd1) ja Cln2(krd2). Cln2 C-terminaalse ala eemaldamisel (Cln2ΔC) langeb Spc42 fosforüleerimise kiirus alla kahe korra, järelkult säilib Spc42 Cln2-spetsiifiline fosforüleerimine ka ilma Cln2 C-terminaalse alata (joonis 11B). Seevastu Cln2 C-terminaalses alas paiknevate Cdk1 fosforüleerimissaitide asendamisel alaniinijääkidega (6A) langeb fosforüleerimiskiirus ligi kaheksa korda (joonis 11B), viidates sellele, et Spc42 fosforüleerimise efektiivsus võib sõltuda Cln2 fosforüleerituse tasemest. Fosforüleerimata olekus võib Cln2 C-terminaalne ala seonduda tsükliini pinnaga, varjastades substraatide seondumismotiive. Cln2(krd1) mutatsioonid paiknevad G1-tsükliinidele omases insertsioonis, mis on linguna tsükliini pinnal (lisa joonis 1). Nende mutatsioonide läheduses paiknevad ka Cln2 tuumaimpordi ja -ekspordi signaaljärjestused (Quilis ja Igual, 2012). Cln2 lokalisatsioon sõltub tsükliini fosforüleerituse tasemest (Miller ja Cross, 2001), mistõttu võib fosforüleerimata olekus C-terminaalne ala seonduda tsükliini pinnaga ning varjata osaliselt tuuma ekspordi signaali ja KR-motiiviga seondumises osalevat regiooni, kuid Cln2 fosforüleerituse suurenedes võib ligipääs neile regioonidele paraneda. Eelnevalt on leitud, et Cln2-Cdk1 ja Cln3-Cdk1 kompleksidel on autofosforüleerimise võime ning et autofosforüleerimine suurendab nende aktiivsust (Tyers jt, 1992). Niisugune fosforüleerimise mõju on omane ainult G1-faasi Cdk1 kompleksidele (Tyers jt, 1992), mistõttu võib see olla seotud KR-motiivi poolt vahendatud fosforüleerimisega.



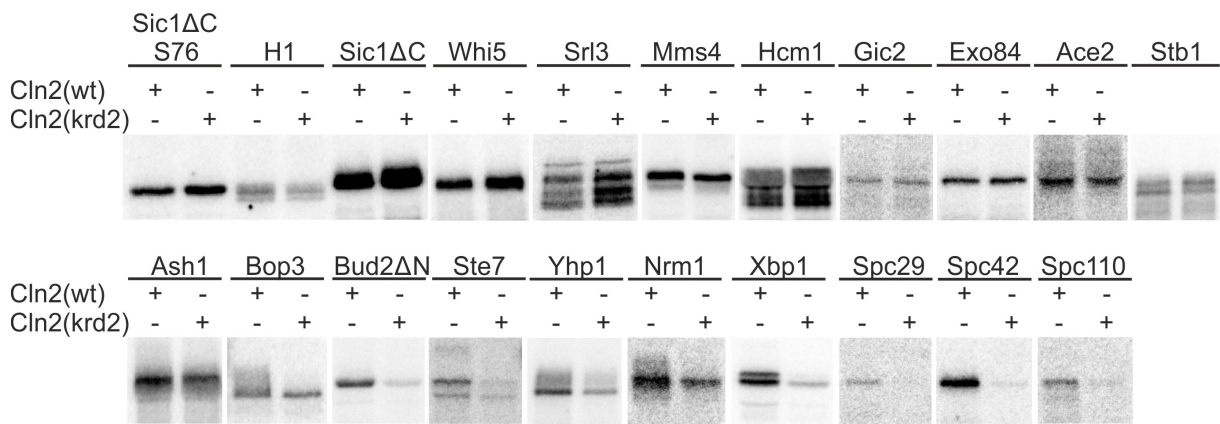
**Joonis 11. Vähenenud spetsiifilise aktiivsusega Cln2 mutantide kirjeldamine.** (A, B) *In vitro* kinaasireaktsioonides mõõdeti PKTPKKAKKL järjestusega peptiidi ning valkude Sic1ΔC(S76) ja Spc42 fosforüleerimise kiirust GST-Cln2-Cdk1 komplekside poolt. Leidmaks defekte spetsiifiliste substraatide fosforüleerimisel, standardiseeriti Cln2-Cdk1 komplekside üldine aktiivsus peptiidi suhtes. Graafikutel on Cln2 eri variantide Sic1Δ(S76) (A) ja Spc42 (B) fosforüleerimise kiirus võrrelduna metsiktüüpi Cln2 kompleksiga. Veapiiridena on toodud keskvaartuse 95% usaldusintervallid (C, D) Autoradiograafid, mis näitavad histooni H1, Sic1ΔC, Whi5, Sli15(422–511; S448) ja Sli15(422–511; S448; rk) valkude fosforüleerimist erinevate GST-Cln2-Cdk1 komplekside poolt. (E) Tilkkülvi katse, milles olid *S. cerevisiae* tüve DK252 (*cln1Δ cln2Δ P<sub>GAL1</sub>-CLN3*) rakkudesse juurde viidud pRS314 vektoril põhinevad plasmiidid, millel *CLN2* promootorilt ekspresseeriti näidatud *CLN2* variante. (F) *Western Blot* analüüsi tulemus, mis näitab pRS314 vektorilt *CLN2* promootorilt ekspresseeritud erinevate Cln2-7xmyc valkude tasemeid.

Katse tulemused näitavad, et Cln2(lpd2), Cln2(krd1) ja Cln2(krd2) on funktsionaalsed tsükliinid, kuna nad suudavad sarnaselt metsiktüüpi Cln2 tsükliiniga ainukese G1-faasi

tsükliinina rakutsükli toimimist võimaldada (joonis 11E). Pärmirakkudes on Cln2(krd1) valgu tase kõrgem kui metsiktüüpi Cln2 tsükliinil, samas Cln2(krd2) valgu ja fosforüleerituse tase on madalamad (joonis 11F). Cln2(krd2) valgu madalam tase võib olla põhjustatud struktuursetest probleemidest. Mutandi Cln2(krd2) madalam fosforüleerituse tase võib tähendada kas KR-seondumise osalust Cln2 fosforüleerimisel või nõrgenenud seondumist Cdk1-ga, kuna Cdk1-ga seondumisvõimetud Cln2 mutandid on vähem fosforüleeritud (Bhaduri jt, 2015). Mutandis Cln2(krd2) asendatud PxS järjestus on identne ka tsükliinidel Cln1 ja Cln3, kuid vastav järjestus puudub Clb-tsükliinidel (järjestuse joondus saadud artiklist Bhaduri jt, 2015). Mutatsioonid Cln3 valgus PxS järjestuse lähedal põhjustavad defekte Cln3 funktsiooni täitmisel *in vivo* (Miller jt, 2005). Kuigi PxS järjestus asub tsükliin-CDK seondumises osalevast regioonist eemal (lisa 1), nõrgendavad mutatsioonid Cln3 PxS järjestuse lähedal tsükliini seondumist Cdk1-ga (Miller jt, 2005). Ehkki kõnealused mutatsioonid põhjustavad Cln3 funktsiooni langust, Cln3-Cdk1 kinaasne aktiivsus rakkudes ei lange, kuna Cln3 vastava regiooni muteerimisel valgu tase tõuseb (Miller jt, 2005). Seega KR-motiiv võib olla oluline substraatide valikul ka tsükliinil Cln3.

### **2.3.4.KR-seondumine soodustab mitmete Cln2-Cdk1 substraatide fosforüleerimist**

KR-seondumise laiema olulisuse hindamiseks Cln2-Cdk1 substraatide fosforüleerimisel uuriti lisaks valkudele Sli15 ja Rtt109 veel 21 substraativalgu (Sic1 $\Delta$ C(S76), histoon H1, Sic1 $\Delta$ C, Whi5, Srl3, Mms4, Hcm1, Gic2, Exo84, Ace2, Stb1, Ash1, Bop3, Bud2 $\Delta$ N, Ste7, Yhp1, Nrm1, Xbp1, Spc29, Spc42, Spc110) fosforüleerimist Cln2(wt)-Cdk1 ja Cln2(krd2)-Cdk1 poolt. Ilmnes, et kümme substraati (Sic1 $\Delta$ C(S76), Sic1 $\Delta$ C, Whi5, Exo84, Stb1, Mms4, Gic2, Hcm1, Ace2 ja Srl3) fosforüleerivad Cln2(wt)-Cdk1 ja Cln2(krd2)-Cdk1 ligikaudu võrdselt (joonis 12). Mitmed võrdselt fosforüleeritavad substraadid (Sic1 $\Delta$ C, Whi5 ja Stb1) sisaldavad LP-motiivi (Kõivomägi jt, 2011b). Ühteteist uuritud substraatidest (histoon H1, Ash1, Bop3, Bud2 $\Delta$ N, Ste7, Yhp1, Nrm1, Xbp1, Spc29, Spc42 ja Spc110) fosforüleerib Cln2(krd2)-Cdk1 kompleks aeglasemalt kui metsiktüüpi Cln2-Cdk1 kompleks, kusjuures fosforüleerimiskiiruse langus on erinevatel substraatidel 1,5 kuni 24 korda (joonis 12). Joonisel 7 leiti üheksa Cln2-spetsiifilist substraati, mille fosforüleerimine ei ole mõjutatud LP-seondumisest. Neist kaheksa (Sli15, Rtt109, Bop3, Ste7, Xbp1, Spc29, Spc42, Spc110) fosforüleerimist stimuleerib KR-seondumine (joonised 9B, 10D, 12).



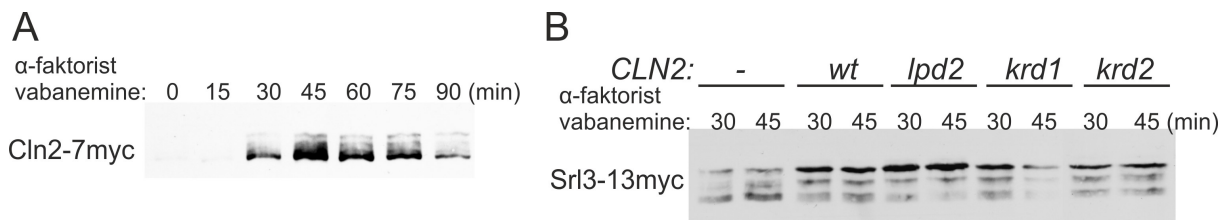
**Joonis 12. KR-interaktsioon on vajalik mitmete Cln2-Cdk1 substraatide kiireks fosforüleerimiseks.** Autoradiograafid näitavad substraatvalkude Sic1ΔC(S76), histoon H1, Sic1ΔC, Whi5, Srl3, Mms4, Hcm1, Gic2, Exo84, Ace2, Stb1, Ash1, Bop3, Bud2ΔN, Ste7, Yhp1, Nrm1, Xbp1, Spc29, Spc42 ja Spc110 fosforüleerimist *in vitro* kinaasireaktsioonis Cln2(wt)-Cdk1 või Cln2(krd2)-Cdk1 poolt.

Cln2(krd2)-Cdk1 fosforüleerib Cln2(wt)-Cdk1 kompleksist oluliselt aeglasemalt käävi polaarkehade valke Spc29, Spc42 ja Spc110, feromooni signalisatsioonis osalevat valku Ste7, pungumisega seotud valku Bud2 ning transkriptsiooni regulaatoreid Ash1, Xbp1, Yhp1 ja Nrm1. Seega võib leitud Cln2-spetsiifilist fosforüleerimist võimaldav mehhanism olla rakutsükli G1-faasi protsesside regulatsioonis laialt levinud.

Cln2(krd2)-Cdk1 fosforüleerib substraatvalku Srl3 metsiktüüpi Cln2 kompleksiga võrdselt (joonis 12), järelikult on Srl3 fosforüleerimine sõltumatu nii LP- kui ka KR-motiiviga seondumisest. Analüüsimaks Srl3 fosforüleerimist *in vivo*, määrati esmalt, milline on Cln2 ekspressiooni tase erinevates ajapunktides pärast G1-faasis sünkroniseeritud rakkude vabanemist rakutsükli seisakust. Cln2 ekspresseerub alates hilisest G1-faasist, mis käesolevas töös tehtud katsetes on alates 30-ndast minutist pärast  $\alpha$ -faktorist vabanemist (joonis 13A). Seetõttu kasutati Cln2-Cdk1 substraatvalkude *in vivo* fosforüleerimise uurimiseks sünkroniseeritud rakutsükliga rakke, milles oli  $\alpha$ -faktori mahapesust möödunud 30 ja 45 minutit. Niisugustes rakkudes on Cln2-Cdk1 aktiivsus kõrge, kuid hilisemate tsükliin-Cdk1 komplekside aktiivsus on madal. Srl3 valgu fosforüleerimist analüüsiti *Western Blot* meetodil, kasutades SDS-PAA-geele, milles Srl3 fosforüleeritud vormid liiguvad aeglasemalt kui fosforüleerimata valk.

Cln2-Cdk1 fosforüleerib Srl3 valku *in vivo*, kuna erinevalt rakkudest, milles puuduvad tsükliinid Cln1 ja Cln2, on tsükliini Cln2 sisaldavates rakkudes hilises G1-faasis suurem osa Srl3 valgust elektroforeesil aeglasemalt liikuvast fosforüleeritud vormist (joonis 13B). Erinevatel Cln2 variantidel ei ole erinevust Srl3 fosforüleerimisel ka *in vivo*, mis kinnitab, et

Srl3 Cln2-spetsiifiline fosforüleerimine toimub LP- ja KR-motiividest sõltumatult. Lisaks ei muutu Srl3 fosforüleerituse tase 30 ja 45 minuti ajapunktide vahel, mis võib tähendada, et Srl3 on väga varajane Cln2-Cdk1 substraat, saavutades maksimaalse fosforüleerimise juba madalal Cln2-Cdk1 kompleksi tasemel.



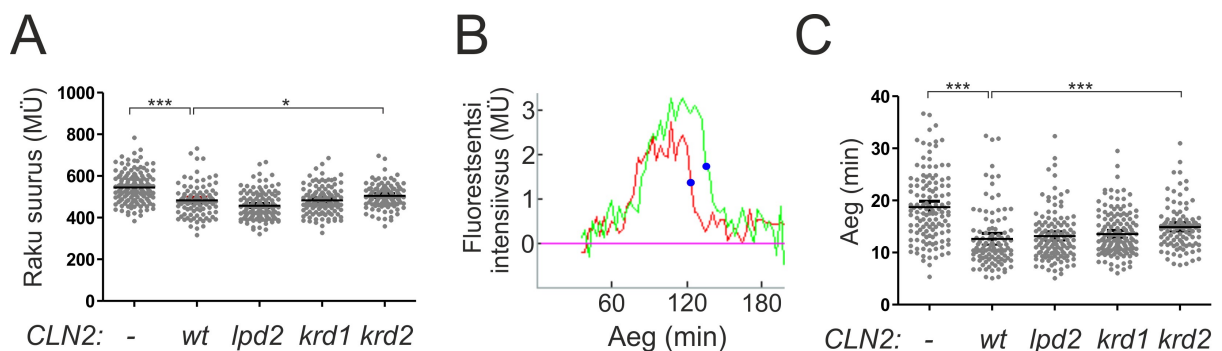
**Joonis 13. Srl3 fosforüleerimist ei mõjuta LP- ega KR-interaktsioonid.** (A)  $\alpha$ -faktoriga G1-faasi sünkroniseeritud pärmikultuuri rakkudel (tüve MÖ038 ( $\Delta cln1 \Delta cln2$ ) rakud, millesse oli viidud plasmiid Cln2-7myc liitvalgu ekspresseerimiseks *CLN2* promootorilt) pesti  $\alpha$ -faktor ning rakke kasvatati edasi. Iga 15 minuti järel koguti osa rakke ning joonisel on toodud Cln2-7myc liitvalgu ekspressiooni *Western Blot* analüüsi pilt. (B) *S. cerevisiae* tüve MÖ061 ( $\Delta cln1 \Delta cln2 SRL3-13MYC$ ) rakud, millesse olid viidud Cln2 variante kodeerivad plasmiidid, sünkroniseeriti  $\alpha$ -faktoriga G1-faasis,  $\alpha$ -faktor pesti maha ning rakke kasvatati edasi 30 ja 45 minutit. Toodud on vastavatel ajapunktidel võetud rakkude Srl3 fosforüleerimise *Western Blot* analüüsi pildid.

### 2.3.5. Cln2(*lpd2*) ja Cln2(*krd1*) tsükliinid toimivad G1/S ülemineku regulatsioonis sarnaselt metsiktüüpi Cln2 tsükliiniga

Uurimaks, kas KR- ja LP-seondumismehhanismid osalevad G1/S ülemineku regulatsioonis, vaadeldi üksikute rakkude rakutsükleid aegvõtte-mikroskoopia abil. G1/S üleminekus on kesksel kohal Cdk1 substraatvalgud Whi5 (rakutsükli G1/S transkriptsiooniprogrammi inhibiitor) ja Sic1 (Clb-Cdk1 komplekside inhibiitor) (Costanzo jt, 2004; Schwob jt, 1994). G1/S ülemineku uurimiseks analüüsiti kahte parameetrit: 1) raku suurus hetkel, mil 50% Whi5-mCherry valgust on tuumast tsütoplasmasse eksporditud ning 2) valgu Whi5 tuumast eksportimisest kuni valgu Sic1 lagundamiseni kulunud aeg.

Saadud tulemused näitavad, et tsükliin Cln2 mõjutab nii Whi5 tuumast eksportimise ajastust kui ka Whi5 eksportimise ja Sic1 lagundamise omavahelist ajastust. Cln2 puudumisel on rakud hetkel, mil 50% Whi5 valgust on tuumast eksporditud, keskmiselt 12,8% suuremad ( $p=1,6 \times 10^{-10}$ ) (joonis 14A). Raku suurust mõõdeti raku suurima läbilõike pindalana. Samas LP- või KR-motiiviga seondumisvõimetute Cln2(*lpd2*) ja Cln2(*krd1*) tsükliinidega rakkude suurus ei erine 50% Whi5 tuumast väljumise hetkel metsiktüüpi Cln2 tsükliiniga rakkudest. Metsiktüüpi Cln2 tsükliiniga rakkudes toimub 50% Whi5 eksportimine tuumast tsütoplasmasse keskmiselt 12,6 minutit enne 50% Sic1 lagundamist (joonis 14B, C). Ilma

tsükliiniga Cln2 rakkudes pikeneb aeg 50% Whi5 tuumast väljumisest kuni 50% Sic1 lagundamiseni keskmiselt 18,7 minutini, mis on oluline erinevus metsiktüüpi tsükliiniga Cln2 rakkudest ( $p=4,3 \times 10^{-13}$ ). See tulemus kinnitab eelnevalt leitud, et Cln2 on vajalik muutmaks G1/S üleminekut kiireks protsessiks (Skotheim jt, 2008). Eelnevalt on näidatud, et rakkudes, milles puudub Cln-Cdk1 komplekside inhibiitorvalk Far1, väljub Whi5 tuumast LP-seondumise puudumisel suuremates rakkudes (Bhaduri jt, 2015). Käesolevas töös analüüsiti rakke, milles Far1 on funktsionaalne, ning LP-seondumisest tingitud erinevuse puudumine Whi5 eksportimisel võib tuleneda sellest, et LP-motiiv on oluline ka Cln2-Cdk1 inhibeerimises Far1 poolt (Bhaduri jt, 2015). Seega, kuigi Cln2(lpd2)-Cdk1 fosforüleerib Whi5 valku aeglasemalt (joonis 11C), ei mõjuta LP-seondumine Whi5 eksportimise ajastust rakkudes, sest LP-seondumisvõimetu Cln2 on vähem inhibeeritud Far1 poolt (Bhaduri jt, 2015).



**Joonis 14. Mutantsed tsükliinid Cln2(lpd2) ja Cln2(krd1) toimivad G1/S ülemineku regulatsioonis sarnaselt metsiktüüpi Cln2 tsükliiniga.** Erinevate Cln2 variantide mõju rakutsükli G1/S regulatsioonile uuriti aegvõtte-mikroskoopiaga pärritüve MÖ040 ( $\Delta cln1 \Delta cln2 WHI5-mCherry SIC1-GFP$ ) rakkudes, millesse olid viidud *CLN2* promootorilt erinevaid Cln2 variante ekspresseerivad plasmiidid. (A) Rakkude suurus hetkel, mil 50% Whi5-mCherry valgust on tuumast eksporditud. Raku suuruse analüüsimisel uuriti ainult tütarrakke. Raku suurust mõõdeti raku suurima läbilõike pindalana, MÜ tähistab määramata ühikut. Igast *CLN2* variandist analüüsiti vähemalt 100 rakku, veapiirideks on keskvaartuse 95% usaldusintervallid. (B) Näidisgraafik ühe metsiktüüpi Cln2 tsükliiniga raku rakutsüklist. Punane joon näitab rakutuumas oleva Whi5-mCherry ning roheline joon Sic1-GFP fluorestsentsignaali intensiivsuse muutust ajas. Sinise täpiga on märgitud ajapunktid, mis loeti 50% Whi5 tuumast eksportimise või 50% Sic1 lagundamise hetkedeks (C) Aeg, mis kulub 50% Whi5-mCherry tuumast eksportimisest kuni 50% Sic1-GFP valgu lagundamiseni. Igast *CLN2* variandist analüüsiti vähemalt 100 rakku, veapiirid näitavad keskvaartuse 95% usaldusintervalle.

Ka Sic1 lagundamise ajastus ei erine metsiktüüpi Cln2, Cln2(lpd2) või Cln2(krd1) tsükliiniga rakkudes (joonis 14C). Cln2(krd2) tsükliiniga rakud on Whi5 tuumast eksportimise ajal keskmiselt 4,4% suuremad ( $p=0,014$ ) ja Sic1 lagundamine toimub keskmiselt 2,2 minutit

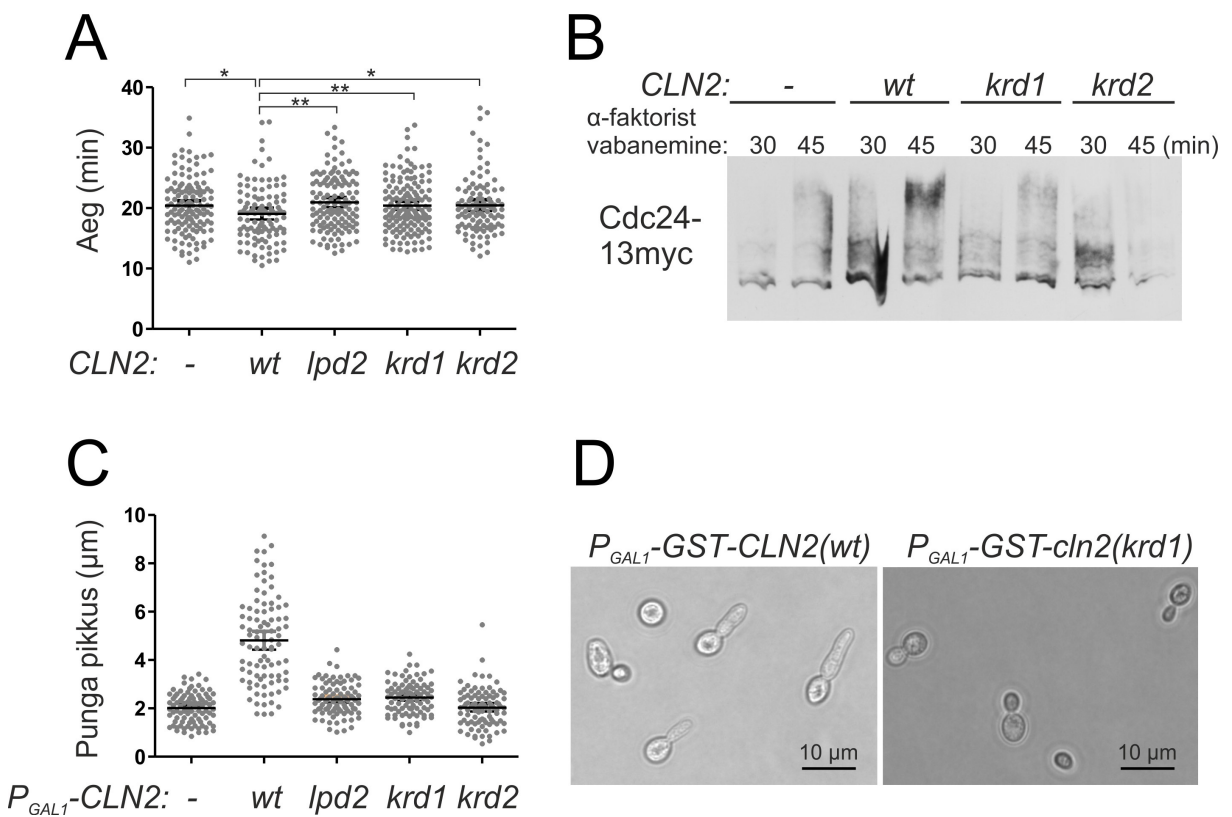
hiljem ( $p=0,0006$ ) (joonis 14A, C), kuid antud erinevus võib olla põhjustatud pigem Cln2(krd2) valgu madalamast ekspresioonitasemest kui defektidest KR-motiiviga substraatide fosforüleerimisel. Eelnevalt on näidatud, et MBF-i hilise märklaudgeeni *NRM1* ekspressioon sõltub oluliselt Cln2 olemasolust, kuid mitte LP-seondumise toimimisest (Bhaduri jt, 2015). Seega võib MBF transkriptsioonikompleksi täielikuks aktiveerimiseks olla vajalik KR-sõltuv fosforüleerimine. See võib olla seotud Sic1 hilinevad degradatsiooniga rakkudes, milles on mutantne tsükliin Cln2(krd2), kuna MBF kompleks aktiveerib ka Sic1 fosforüleerimises osalevate tsükliinide geenide *CLB5* ja *CLB6* transkriptsiooni (Schwob ja Nasmyth, 1993).

### **2.3.6.Cln2-Cdk1 osaleb pungumise regulatsioonis nii LP- kui ka KR-seondumise kaudu**

Punga tekkekoha valikuga seotud valgu Bud2 kiire fosforüleerimine Cln2-Cdk1 poolt sõltub KR-motiivist (joonis 10C). Seetõttu uuriti, kas tsükliin-substraat interaktsioonid mõjutavad pungumisega seotud protsesse *in vivo*. Esmalt uuriti pungumise ajastust rakkudes, milles puudus Cln2 või ekspresseerisid erinevad Cln2 variandid. Ilma tsükliinita Cln2 ning Cln2 LP- ja KR-seondumisvõimetute mutantidega (Cln2(lpd2), Cln2(krd1), Cln2(krd2)) rakkudes tekib pung keskmiselt 1,3 kuni 1,9 minutit hiljem, lähtudes 50% Whi5 tuumast eksportimise hetkest, kusjuures leitud erinevused on statistiliselt olulised ( $p$ -väärtused vastavalt 0,01, 0,001, 0,009 ja 0,018) (joonis 15A). Kinaas Pho85 on võimeline asendama kinaasi Cdk1 punga tekke indutseerimisel (Moffat ja Andrews, 2004), mis võib selgitada Cln2 väikest mõju pungumise ajastusele. Cln2 puudumise ning LP- ja KR-seondumisvõimetute tsükliinide mõju pungumise ajastusele on sarnane, seetõttu võib pungumisega olla seotud nii LP- kui ka KR-motiiviga Cln2-Cdk1 substraatvalke.

Punga tekke regulatsioonis on kesksel kohal GTPaasi Cdc24 guaniin-nukleotiidi vahetusfaktor Cdc42 (Enserink ja Kolodner, 2010). Cdc24 on Cln2-spetsiifiline Cdk1 substraat (McCusker jt, 2007), mistõttu uuriti, kas Cdc24 fosforüleerimine muutub Cln2 puudumisel või KR-seondumisvõimelise Cln2 puudumisel. Selleks analüüsiti Cdc24 fosforüleerimist sünkroniseeritud rakukultuuris 30 ja 45 minutit pärast  $\alpha$ -faktori põhjustatud G1-faasi seisakust väljumist. Fosforüleerimise uurimiseks kasutati *Phos-Tag* SDS-PAA-geele, milles valkude fosforüleeritud vormid liiguvad aeglasemalt. Cdc24 fosforüleerimine sõltub Cln2 olemasolust ning rakkudes, milles ekspresseerub vaid kas Cln2(krd1) või Cln2(krd2), on 45 minutit pärast  $\alpha$ -faktori mahapesu väiksem osa Cdc24 valgust maksimaalselt fosforüleeritud vormis kui metsiktüüpi Cln2 tsükliiniga rakkudes (joonis 15B). Metsiktüüpi tsükliiniga Cln2 ja mutantse tsükliiniga Cln2(krd1) rakkude G1-faasi läbimine on

sarnane (joonis 14A, C). Seega võib Cdc24 fosforüleerimine toimuda otse Cln2-Cdk1 poolt KR-seondumise abil või osaleb KR-interaktsioon kinaasi Cla4 aktiveerimisel, mis võib ka valku Cdc24 fosforüleerida (Bose jt, 2001).



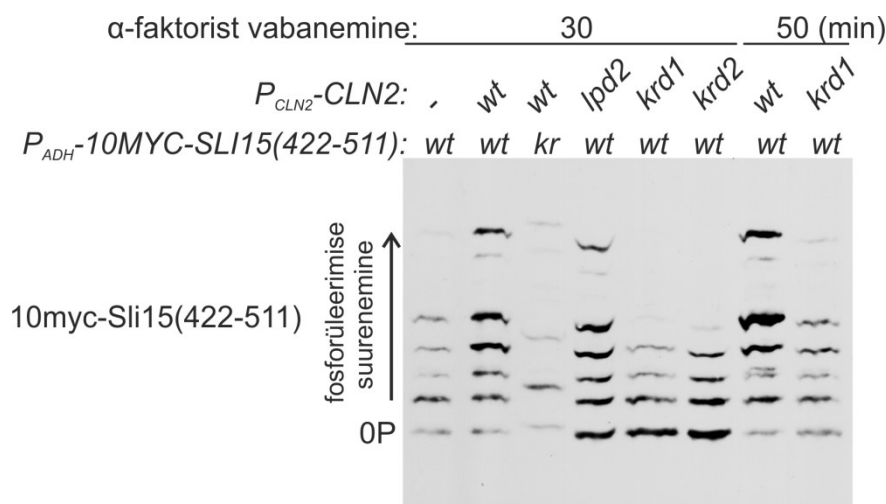
**Joonis 15. Cln2-Cdk1 reguleerib pungumist nii LP- kui ka KR-seondumise abil.** (A) Punga tekke ajastuse uurimiseks kasutati aegvõtte-mikroskoopiat tüve MÖ040 ( $\Delta cln1 \Delta cln2$  *WHI5-mCherry SIC1-GFP*) rakkudega, millesse olid viidud *CLN2* promootorilt vastavaid *CLN2* variante kodeerivad plasmiidid. Graafikul on aeg, mis kulub hetkest, mil 50% Whi5-mCherry valgust oli tuumast välja viidud kuni hektkeni, mil tekkis pung. Igast *CLN2* variandist analüüsiti vähemalt 100 rakku, veapiirid näitavad keskväärtuse 95% usaldusintervalle. (B) *Western Blot* meetodi pilt, mis näitab Cdc24-13myc liitvalgu fosforüleerimist tüve MÖ062 ( $\Delta cln1 \Delta cln2$  *CDC24-13MYC*) rakkudes, millesse olid viidud *CLN2* promootorilt vastavaid *CLN2* variante kodeerivad plasmiidid. Cdc24 valgu fosforüleeritud vormide lahutamiseks kasutati *Phos-Tag* SDS-PAA-geeli. (C, D) *S. cerevisiae* rakkudes indutseeriti *GAL1* promootorilt GST-Cln2 erinevate variantide ekspressioon. 2 tundi pärast indutseerimist rakud fikseeriti ja pildistati. (C) Graafikul punga pikkus punga kaelast punga tipuni erinevate üleekspresseeritud Cln2 valkudega rakkudes. Igast  $P_{GAL1}$ -GST-*CLN2* variandist mõõdeti 90 punga. (D) Pildid rakkudest, milles oli 2 tundi *GAL1* promootorilt ekspresseeritud GST-liitvalku kas metsiktüüpi tsükliiniga (Cln2(wt)) või mutantse tsükliiniga (Cln2(krd1)).

Tsükliinid Cln1 ja Cln2 stimuleerivad punga kasvu pikkusesse ning vastavate tsükliinide üleekspressioon põhjustab tavapärasest piklikumate pungade teket (Lew ja Reed, 1993). Kinnitamaks KR-seondumise osalemist pungumise regulatsioonis, uuriti Cln2 mutantide

võimet stimuleerida punga tipmist kasvu. Selleks indutseeriti pämirakkudes erinevate Cln2 variantide ekspressioon *GALI* promootorilt ning 2 tundi hiljem mõõdeti pungade pikkused. Metsiktüüpi Cln2 üleekspressiooni korral olid enamik rakkudest pikliku pungaga (keskmine punga pikkus 4,8  $\mu\text{m}$ ), samas kui Cln2(*lpd2*), Cln2(*krd1*) ja Cln(*krd2*) üleekspressioonil niisugust fenotüüpi ei tekkinud (punga pikkused keskmiselt vastavalt 2,4, 2,4 ja 2  $\mu\text{m}$ ) (joonis 15C, D). Saadud tulemused kinnitavad juba eelnevalt näidatud LP-interaktsiooni olulisust polariseeritud kasvu regulatsioonis (Bhaduri jt, 2015) ning näitavad, et polariseeritud kasvu stimuleerimises osaleb ka KR-sõltuv Cln2-Cdk1-vahendatud fosforüleerimine.

### 2.3.7. Cln2-Cdk1 reguleerib Sli15 lokalisatsiooni KR-seondumise abil

Sli15 on *in vitro* Cln2-spetsiifiline Cdk1 substraat (joonis 7), kuid ei ole teada, kas Sli15 on fosforüleeritud Cln2-Cdk1 poolt ka *in vivo* ning kas vastav fosforüleerimine reguleerib kuidagi Sli15 valgufunktsioneerimist. Sli15 valk on kompleksis kinaasiga Ipl1 ning on tugevalt Ipl1 poolt fosforüleeritud (Nakajima jt, 2011). Seetõttu kasutati Cln2-Cdk1-sõltuva fosforüleerimise uurimiseks valku Sli15(422–511), mis ei seonu kinaasiga Ipl1 (Kang jt, 2001). Sli15(422–511) fosforüleerimist uuriti sünkroniseeritud rakkudes, mis olid 30 ja 50 minuti eest vabanenud  $\alpha$ -faktorist tingitud G1-faasi seisakust.

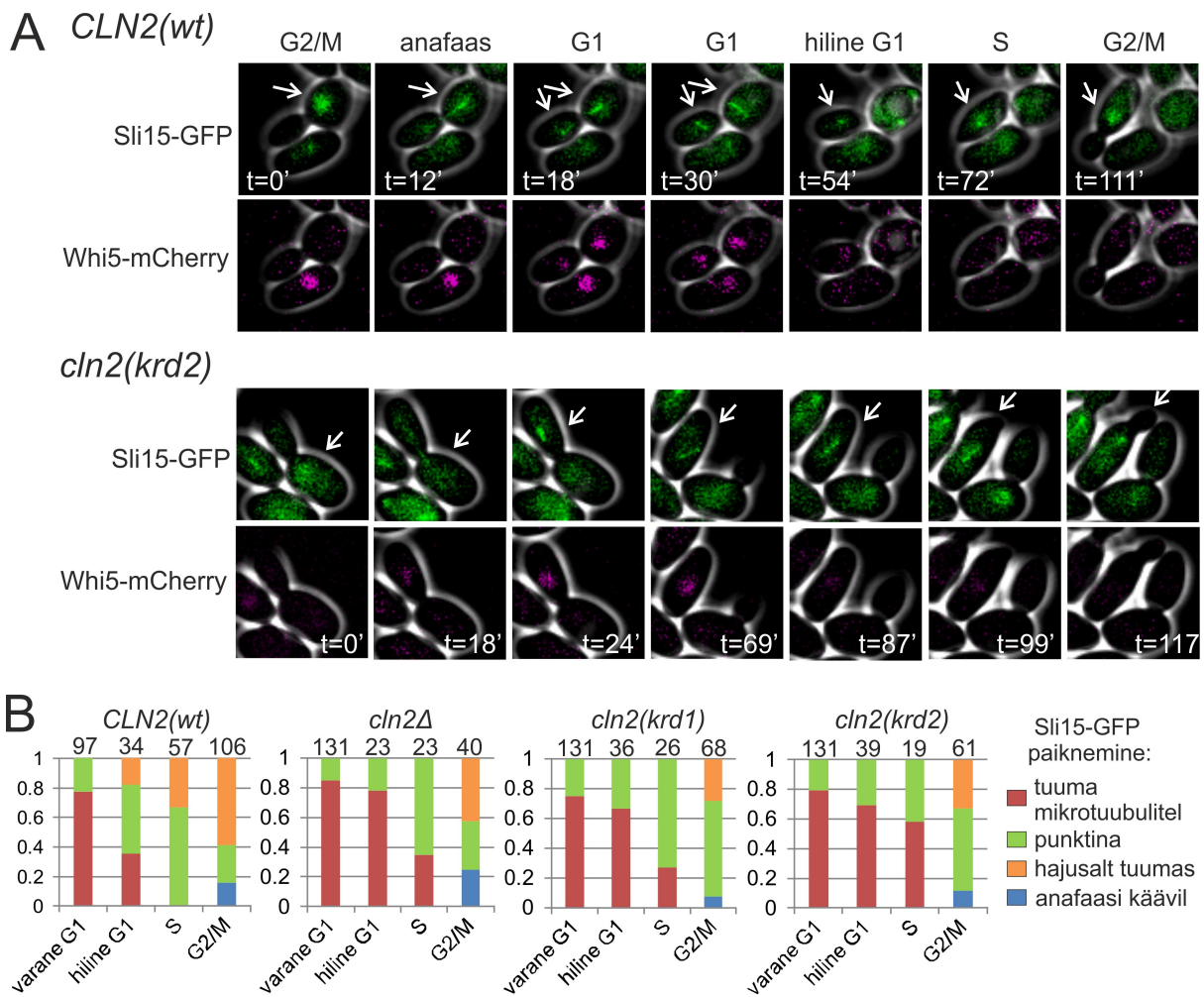


**Joonis 16. KR-seondumine on vajalik valgusli15(422–511) efektiivseks fosforüleerimiseks *in vivo*.** Western Blot analüüsi pilt, mis näitab 10myc-Sli15(422–511) fosforüleerimist erinevate Cln2 variantidega rakukultuurides 30 ja 50 minutit pärast rakkude vabanemist  $\alpha$ -faktorist põhjustatud rakutsükli seisakust. *S. cerevisiae* tüve MÖ038 (*Δcln1 Δcln2*) rakkudesse olid viidud plasmiidid, millelt ekspresseeriti *ADH* promootorilt kas metsiktüüpi 10myc-Sli15(422–511) valku (*wt*) või KR-seondumise võimetut mutantset valku (*kr*) ning *CLN2* promootorilt Cln2 variante. Valkude fosforüleeritud vormid lahutati *Phos-Tag* SDS-PAA-geelelektroforeesil. OP tähistab fosforüleerimata valku.

Selgus, et metsiktüüpi Cln2 tsükliiniga rakkudes on enam Sli15(422–511) valku elektroforeesil aeglasemalt liikuvates rohkelt fosforüleeritud vormidena kui tsükliinita Cln2 rakkudes (joonis 16). Sli15(422–511) valk on osaliselt fosforüleeritud identifitseerimata kinaasi poolt ka rakkudes, milles puuduvad tsükliinid Cln1 ja Cln2. KR-seondumismotiivideta valk Sli15(422–511; kr) on vähem fosforüleeritud kui seondumismotiividega valk Sli15(422–511; wt). Lisaks on *cln2(krd1)* ja *cln2(krd2)* rakkudes vähem Sli15(422–511) valku rohkelt fosforüleeritud vormides, mis kinnitab, et KR-seondumine on oluline Cln2-Cdk1 substraatide fosforüleerimisel *in vivo*.

Kuna Cln2-Cdk1 fosforüleerib valku Sli15(422–511) *in vivo*, võib ka täispikk Sli15 olla Cln2-Cdk1 substraadiks. Sli15 lokalisatsiooni mitootilistes rakkudes uurides on leitud, et Sli15 fosforüleerimine Cdk1 poolt mõjutab Sli15-Ipl1 kompleksi seondumist mikrotuubulitega (Pereira ja Schiebel, 2003).

Selgitamaks, kuidas muutub Sli15 lokalisatsioon rakutsükli vältel, uuriti Sli15-GFP liitvalgu paiknemist aegvõtte-mikroskoopia abil. Suure pungaga rakkudes, mis on kas G2- või M-faasis, paikneb Sli15-GFP liitvalk tuumas kas hajusalt või selgepiirilise punktina (joonisel 17A ajahetkel  $t=0$  min noolega näidatud rakud, 17B). Saadud tulemus on kooskõlas publitseeritud andmetega, mille kohaselt anafaasi-eelsetes rakkudes paikneb Sli15 tuumas difuusselt, kusjuures paiknemine on dünaamiline, olles rohkem kas tsentromeeride või mikrotuubulite juures (Nakajima jt, 2011). Üleminekul anafaasi lokaliseerub Sli15 mitoosikäavile ning jääb seotuks tuumas paiknevate mikrotuubulitega ka varases G1-faasis, mil Whi5-mCherry paikneb tuumas (joonisel 17A *CLN2(wt)* noolega näidatud rakkudes  $t=18$  min ja  $t=30$  min, 17B). Metsiktüüpi Cln2 tsükliiniga rakkudes toimub hilises G1-faasis, mida tähistab tuumast Whi5-mCherry fluorestsentssignaali kadumine, muutus Sli15 paiknemises. Varases G1-faasis olevates rakkudes on Sli15-GFP 77% juhtudel tuumas olevatel mikrotuubulitel, kuid hilises G1-faasis on ainult 35% rakkudest Sli15-GFP lokaliseerunud mikrotuubulitele ning ülejäänutel on Sli15-GFP fluorestsentssignaal kas punktina või difuusselt tuumas (joonisel 17A *CLN2(wt)* noolega näidatud rakus  $t=54$  min, 17B). Lokalisatsioon punktina võib tähendada paiknemist kinetohooridel või käävi polaarkehadel. S-faasis olevates väikese pungaga rakkudes ei olnud Sli15-GFP enam üheski rakus mikrotuubulitel (joonisel 17A *CLN2(wt)* noolega näidatud rakus  $t=72$  min, 17B). Seega jääb Sli15-GFP mikrotuubulitega seotuks ka G1-faasis, kuid seotus kaob hilises G1-faasis. Järelikult toimub muutus Sli15 paiknemises kõrgeima Cln2-Cdk1 aktiivsuse ajal.



**Joonis 17. Cln2-Cdk1 mõjutab Sli15-GFP liitvalgu paiknemist rakus KR-interaktsiooni abil.**

Sli15 lokaliseerimise uuriti pärimises MÖ047 (*Δcln1 Δcln2 WHI5-mCherry SLI15-GFP*), millesse olid viidud pRS314 vektoril põhinevad plasmiidid *CLN2* promootorilt erinevate *CLN2* variantide ekspresseerimiseks. (A) Esitatud on mikroskoobi samast vaateväljast kattuvalt faasikontrast- ja fluorestsentspildid, mis näitavad Sli15-GFP ja Whi5-mCherry paiknemist ühe rakutsükli jooksul rakkudes, milles on kas metsiktüüpi tsükliin (*CLN2(wt)*) või KR-motiiviga seondumisvõimetu tsükliin (*cln2(krd2)*). Rakud on pildistatud 630x suurendusega. Piltide kohal on toodud noolega näidatud raku hinnanguline rakutsükli faas ja piltidele on kirjutatud aeg (t) minutites alates esimesest esitatud pildist. (B) Sli15-GFP paiknemise jaotus tsükliiniga Cln2 või erinevate Cln2 tsükliini variantidega rakkudes. Rakud jaotati nelja kategooriasse: 1) varase G1-faasi rakkudeks loeti pungata rakud, milles Whi5-mCherry on tuumas, 2) hilise G1-faasi rakkudeks loeti pungata rakud ilma Whi5-mCherry liitvalguta tuumas, 3) S-faasi rakkudeks loeti väikese pungaga rakud, 4) G2/M rakkudeks loeti suure pungaga rakud. Tulpade kohal on toodud analüüsitud rakkude arv.

Leidmaks, kas Cln2 võib mõjutada Sli15 lokaliseerimise KR-sõltuva fosforüleerimise kaudu, uuriti Sli15-GFP lokaliseerimise ka ilma tsükliinideta Cln1 ja Cln2 rakkudes ning mutantsete tsükliinidega Cln2(krd1) ja Cln2(krd2) rakkudes. Varases G1-faasis, mil Cln2-Cdk1 aktiivsus puudub või on madal, oli kõikide *CLN2* variantide puhul Sli15-GFP ligikaudu 80% rakkudest

lokaliseerunud mikrotuubulitele. Kui metsiktüüpi Cln2 tsükliiniga rakkudes toimub Whi5 tuumast eksportimise ajal muutus ka Sli15 lokalisatsioon (p=2,1x10<sup>-5</sup>), siis Cln2 puudumise või mutantsete Cln2(krd1) ja Cln2(krd2) puhul sel ajal olulist muutust ei toimu (joonisel 17A *cln2(krd2)* noolega näidatud rakus t=87 min, 17B). Sli15-GFP tubulaarse lokalisatsiooni kadumine toimub KR-seondumisvõimelise Cln2 puudumisel hiljem, kuna nendes rakkudes on Sli15 seondunud mikrotuubulitega 27–58% juhtudest ka pungunud rakkudes (joonisel 17A *cln2(krd2)* noolega näidatud rakus t=99 min, 17B), mis on oluline erinevus metsiktüüpi Cln2 sisaldavatest rakkudest (p-väärtused vahemikus 0,0002 kuni 5,4x10<sup>-9</sup>).

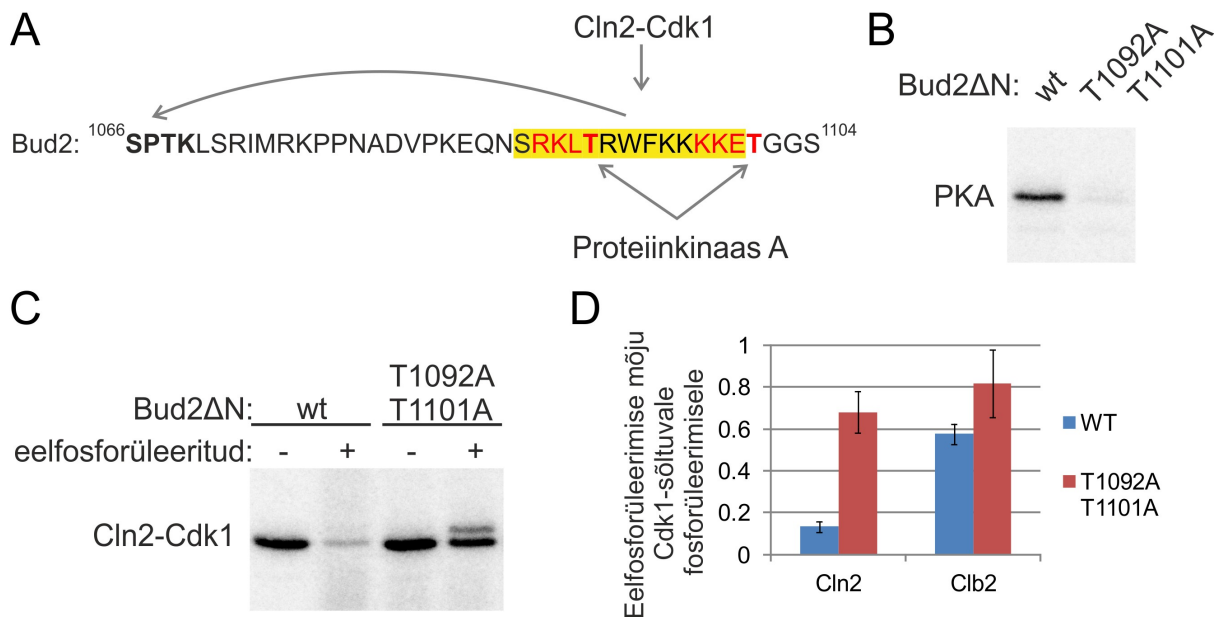
Eeltoodust võib järeldada, et KR-seondumisest vahendatud fosforüleerimine võib mõjutada Sli15 ümberpaiknemist mikrotuubulitelt käävi polaarkehadele või kinetohooridele. Sli15 lokalisatsiooni regulatsioon on Cln2 uus funktsioon. Sli15 valgus Cdk1 fosforüleerimissaitide asendamiselalaniinjääkidega suureneb kromosoomide segregatsioonivigade tõenäosus üle 1000 korra (Pereira ja Schiebel, 2003). Sli15 on fosforüleeritud ka mitootiliste Cdk1 komplekside poolt (Pereira ja Schiebel, 2003) ning lokaliseerub kinetohooridele ka ilma tsükliinideta Cln1 ja Cln2 rakkudes, seetõttu võivad hilisemad Cdk1 kompleksid kompenseerida Sli15 vähenenud fosforüleerimise G1-faasis, mis on tingitud Cln2 puudusest.

### **2.3.8.KR-seondumismotiivi fosforüleerimine nõrgendab selle mõju Cln2-Cdk1-vahendatud fosforüleerimisele**

cAMP-sõltuv proteiinkinaas A (PKA) koordineerib raku suurust ja G1-faasi kestvust sõltuvalt süsinikuallika olemasolust (Baroni jt, 1994). PKA aktiivsuse korral G1-faas pikeneb *CLN1* ja *CLN2* transkriptsiooni vähenemise tõttu (Amigoni jt, 2015). PKA konsensuslik fosforüleerimismotiiv on R/K-R/K-x-S/T (Mok jt, 2010). PKA fosforüleerimismotiivile vastavad järjestused paiknevad Bud2 ja Sli15 valkudes Cln2-sõltuvat fosforüleerimist stimuleerivates  $\alpha$ -heeliksites või vahetult pärast  $\alpha$ -heelikseid (joonis 18A). Kuna seondumismotiivi lähedal paiknevate aminohappejääkide fosforüleerimine võib rikkuda Cln2 seondumise motiiviga, uuriti, kas PKA konsensussele vastavad saidid Bud2 valgus (T1092 ja T1101) on substraadiks PKA-le ning kas see fosforüleerimine mõjutab substraadi järgnevat fosforüleerimist Cln2-Cdk1 kompleksi poolt.

Selleks mõõdeti PKA aktiivsust Bud2 C-terminaalse ala suhtes *in vitro*. Tulemused näitavad, et PKA fosforüleerib Bud2 $\Delta$ N valku ning selleks on vaja fosforüleerimissaiti T1092 ja T1101 (joonis 18B). Seejärel fosforüleeriti Bud2 $\Delta$ N variante PKA-ga, fosforüleeritud valgud puhastati ning kasutati Cdk1 komplekside substraadina. Ilmnes, et Cln2-Cdk1 fosforüleerib PKA poolt eelfosforüleeritud Bud2 $\Delta$ N valku 7,5 korda aeglasemalt kui eelfosforüleerimata

substraati, kusjuures eelfosforüleerimise tugev mõju sõltub Cln2 seondumismotiivis asuvate PKA fosforüleerimissaitide (T1092 ja T1101) olemasolust (joonis 18C, D). PKA-poolne eelfosforüleerimine mõjutab seevastu ainult 1,7 korda Bud2 $\Delta$ N fosforüleerimist Clb2-Cdk1 poolt ja ligikaudu sama suur on eelfosforüleerimise mõju substraadi Bud2 $\Delta$ N(T1092A T1101A) fosforüleerimisel nii Cln2-Cdk1 kui ka Clb2-Cdk1 poolt. Seega võib nõrka mõju järgneva Cdk1-vahendatud fosforüleerimise vähenemisele pidada ebaspetsiifiliseks, kuid täiendavat 5-kordset mõju Cln2-spetsiifiliseks.



**Joonis 18. cAMP-sõltuv proteiinkinaas A fosforüleerib Cln2 seondumismotiivi Bud2 valgus, aeglustades Bud2 järgnevat fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt.** (A) Skeem, mis selgitab Bud2 fosforüleerimist Cln2-Cdk1 ja PKA poolt. Punaselt ja rasvaselt on märgitud PKA poolt fosforüleeritavad aminohappejäägid T1092 ja T1101 ning kollaselt  $\alpha$ -heeliks. (B) Autoradiograaf näitab Bud2 $\Delta$ N valgu ja mutantse Bud2 $\Delta$ N(T1092A T1101A) valgu fosforüleerimist PKA poolt. (C) Autoradiograaf näitab PKA-vahendatud Bud2 $\Delta$ N valgu eelfosforüleerimise mõju valkude järgnevale fosforüleerimisele Cln2-Cdk1 poolt. (D) Graafik näitab PKA-vahendatud eelfosforüleerimise mõju Bud2 $\Delta$ N eri variantide järgnevale fosforüleerimisele Cln2- või Clb2-Cdk1 poolt. Eelfosforüleerimise mõju leidmiseks jagati eelfosforüleeritud substraadi fosforüleerimiskiirus Cdk1 komplekside poolt fosforüleerimata substraadi fosforüleerimiskiirusega.

$\alpha$ -heeliksis või  $\alpha$ -heelikst vahetult C-terminuse suunas asuvate aminohappejääkide fosforüleerimine mõjub heeliksile destabiliseerivalt (Elbaum ja Zondlo, 2014). Seetõttu võib Bud2 $\Delta$ N valgu fosforüleerimine PKA poolt põhjustada  $\alpha$ -heeliksi lahtikeerdumise, nõrgendades seeläbi KR-seondumismotiivi interaktsiooni Cln2 valguga ning aeglustades substraadi fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt. PKA fosforüleerimismotiivid paiknevad mitmetes ennustuslikes KR-seondumismotiivides (lisa joonis 2), mistõttu võib PKA lisaks

*CLN1* ja *CLN2* transkriptsiooni vähendamisele täiendavalt takistada Cln2-sõltuvat fosforüleerimist seondumismotiivide fosforüleerimise kaudu.

Kokkuvõttes, kuigi Cln2-Cdk1 substraatide seondumismotiivid ei ole G1-faasi läbimiseks hädavajalikud (joonis 11E), võivad erinevad tsükliin-substraat interaktsioonid olla vajalikud G1-faasi protsesside täpseks ajaliseks regulatsiooniks. Näiteks Srl3 Cln2-sõltuv fosforüleerimine ei muutu vahemikus 30 ja 45 minutit pärast  $\alpha$ -faktori G1-faasi seisakust vabanemist (joonis 13B), kuid Cdc24 fosforüleerimine tõuseb selles ajavahemikus oluliselt (joonis 15B). Seega võivad erinevad interaktsioonid substraatidega võimaldada valkude fosforüleerimist ajaliselt diferentseerida.

Cln2 C-terminaalses alas paiknevate Cdk1 fosforüleerimissaitide muteerimisel väheneb ensüümkompleksi võime fosforüleerida KR-motiiviga substraate, kuid LP-motiiviga substraatide fosforüleerimine ei muutu (joonis 11A, B). Eelnevalt on näidatud, et Cln2 fosforüleerituse tase tõuseb G1-faasi jooksul (Miller ja Cross, 2001) ning et positiivne tagasiside G1/S transkriptsiooni aktiveerimisel on vajalik G1/S ülemineku kindlustamiseks (Skotheim jt, 2008). G1/S transkriptsiooni aktiveerimiseks fosforüleerivad Cln-Cdk1 kompleksid LP-interaktsiooni abil Whi5 valku (Costanzo jt, 2004; Kõivomägi jt, 2011b). Varases G1-faasis, kui Cln2 kontsentratsioon on madal ning Cln2 on vähe fosforüleeritud, võib Cln2-Cdk1 efektiivselt fosforüleerida LP-motiiviga substraate. Sel juhul toimub esmalt G1/S transkriptsiooni täiendav aktiveerimine, millega seoses tõuseb ka Cln2 valgu tase ning Cln2 fosforüleerituse tase. See omakorda võimaldab efektiivsemat KR-vahendatud fosforüleerimist, mis võib olla vajalik teiste Cln2 funktsioonide täitmiseks. Niisugune mehhanism kindlustaks, et rakus toimub esmalt pühendumine rakutsükklisse minemisele ning alles seejärel indutseeritakse teised rakutsükliga seotud protsessid nagu pungumine ja käävi polaarkehade duplikatsioon. Seda hüpoteesi toetab ka tulemus, et G1/S üleminekut negatiivselt mõjutav valk Srl3 on varane Cdk1 substraat (joonis 13B), samas kui punga tekkega seotud Cdc24 fosforüleeritakse hiljem (joonis 15B). Arvestades Cln2-Cdk1 vahendatud fosforüleerimise järk-järgulist vähenemist Sli15 valgu muteerimisel ning KR-interaktsiooni väga erinevat mõju joonisel 11 toodud substraatvalkude fosforüleerimisele, võib KR-motiiv stimuleerida erinevate valkude fosforüleerimist väga erinevalt. Niisugune mehhanism võimaldab täiendavalt diferentseerida Cln2-Cdk1 kompleksi substraate, mis omakorda võimaldab substraatvalkude fosforüleerimise ajalist järjestamist rakutsükli ning seeläbi rakutsükli protsesside täpset regulatsiooni.

## Kokkuvõte

Käesoleva magistr töö peamiseks eesmärgiks oli uurida, millised mehhanismid võimaldavad Cdk1 substraatide Cln2-spetsiifilist fosforüleerimist. Cln2-Cdk1 substraatide uurimisel leiti üheksa Cln2-spetsiifilist Cdk1 substraatvalku, mille fosforüleerimist ei mõjuta eelnevalt kirjeldatud Cln2 hüdrofoobne substraatide seondumismehhanism. Nende substraatide täpsemal uurimisel selgus, et Cln2-Cdk1-vahendatud fosforüleerimist stimuleerivad positiivselt laetud aminohappejääkidest motiivid (KR-motiiv), millest tugevaima mõjuga on amfipaatsed  $\alpha$ -heeliksid, milles lüsiinid ja arginiinid paiknevad heeliksi ühel küljel. Niisuguste  $\alpha$ -heeliksite mõju näidati Cln2-Cdk1 substraatvalkude Sli15, Bud2 ja Rtt109 fosforüleerimisel. Tsükliini Cln2 muteerimisel saadi Cln2 mutandid, millel olid spetsiifilised defektid kas hüdrofoobse LP-motiiviga või KR-motiiviga substraatide fosforüleerimisel. KR-motiiviga seondumisvõimetu Cln2 tsükliini abil näidati uue substraatide valiku mehhanismi olulisust kümne rakutsükli transkriptsiooni regulatsioonis, pungumises, feromooni signalisatsioonis ja käävi polaarkeha duplikatsioonis osaleva Cln2-Cdk1 substraadi fosforüleerimisel.

Analüüsides nende seondumismehhanismide olulisust *in vivo*, leiti et kumbki mehhanism ei mõjuta oluliselt G1/S ülemineku dünaamikat, kuid KR-mehhanismi puudumisel väheneb Cdc24 fosforüleerimine ning pungumine hileneb mõningal määral. Lisaks näidati, et nii LP- kui KR-seondumine osalevad polariseeritud kasvu regulatsioonis. Vaadeldes Sli15 lokalisatsiooni rakutsükli jooksul, selgus et Sli15 on G1-faasis lokaliseerunud tuumas olevatele mikrotuubulitele, kuid hilises G1-faasis paikneb ümber kinetohooridele. Sli15 lokalisatsiooni muutus hilises G1-faasis vajab KR-motiiviga seondumisvõimelise Cln2 olemasolu.

cAMP-sõltuv proteiinkinaas A fosforüleerib Cln2 seondumismotiivi Bud2 valgus ning aeglustab seeläbi substraatvalgu järgnevat fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt. Niisugune regulatsioon võimaldab täiendavalt inhibeerida Cln2-Cdk1 aktiivsust kõrge PKA aktiivsusega rakkudes. KR-seondumine stimuleerib erinevate substraatvalkude fosforüleerimist väga erineval määral, kusjuures KR-seondumise efektiivsus võib sõltuda Cln2 tsükliini fosforüleerituse tasemest. Cln2-Cdk1 kompleksi erinevad substraatide valiku mehhanismid võivad olla olulised, et järjestada Cdk1 substraatide fosforüleerimist G1-faasis, mis omakorda võimaldab rakutsükli protsesside täpset ajalist regulatsiooni.

# **Substrate recognition mechanisms of G1-phase cyclin-dependent kinase complex Cln2-Cdk1**

Mihkel Örd

## **Summary**

Cyclin-dependent kinases (CDK) are central regulators of cell cycle. During the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* Cdk1 is activated by nine different cyclins which alter the functional specificity of the CDK complex. In G1-phase, Cdk1 forms a complex with cyclins Cln1, Cln2 and Cln3 to activate G1/S transcription factors, induce budding, complete spindle pole body duplication and inhibit mating pheromone signalling. Cyclins alter substrate recognition of the Cdk1 complex and several Cdk1 substrates are phosphorylated specifically by G1 cyclin-Cdk1 complexes. G1 cyclin Cln2 contains a docking site that interacts with a leucine- and proline-rich motif (LP motif) on substrates, providing substrate specificity for the Cln2-Cdk1 complex. In the present study it is shown that a novel substrate docking interaction governs the phosphorylation specificity of a group of G1-cyclin-Cdk1 targets. The novel docking motif was determined as a lysine- or arginine-rich sequence (KR motif) that is found in substrates either as a linear motif or as an  $\alpha$ -helix with at least three sequential basic amino acid residues on one side of the helix. Cln2 mutants that are specifically defective in either hydrophobic LP interaction or KR motif docking were identified. KR docking enhances phosphorylation of 10 Cln2-Cdk1 targets which participate in budding, spindle pole body duplication, transcription regulation and pheromone signalling. Cln2 docking motifs are not essential for G1/S transition, however the docking mechanisms ensure timely budding and regulate polarized growth. In addition, it was discovered that localization of Sli15 in G1-phase depends on the activity of Cln2-Cdk1 and KR docking. cAMP-dependent protein kinase A phosphorylates Cln2 docking site in Bud2 protein, hindering phosphorylation by Cln2-Cdk1 complexes. Also, it is shown that the phosphorylation status of Cln2 might alter substrate recognition by Cln-Cdk1 complexes. It is proposed that the Cln2 docking mechanisms provide a way for fine-tuning the CDK thresholds for early cell cycle events.

## Kirjanduse loetelu

- Adams PD, Sellers WR, Sharma SK, Wu AD, Nalin CM, Kaelin WG Jr. (1996). Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol.* 16(12):6623-33.
- Amigoni L, Colombo S, Belotti F, Alberghina L, Martegani E. (2015). The transcription factor Swi4 is target for PKA regulation of cell size at the G1 to S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle.* 14(15):2429-38.
- Arvai AS, Bourne Y, Hickey MJ, Tainer JA. (1995). Crystal structure of the human cell cycle protein CksHs1: single domain fold with similarity to kinase N-lobe domain. *J Mol Biol.* 249(5):835-42.
- Barbet NC, Schneider U, Helliwell SB, Stansfield I, Tuite MF, Hall MN. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell.* 7(1):25-42.
- Baroni MD, Monti P, Alberghina L. (1994). Repression of growth-regulated G1 cyclin expression by cyclic AMP in budding yeast. *Nature.* 371(6495):339-42.
- Bender L, Lo HS, Lee H, Kokojan V, Peterson V, Bender A. (1996). Associations among PH and SH3 domain-containing proteins and Rho-type GTPases in Yeast. *J Cell Biol.* 133(4):879-94.
- Bhaduri S, Pryciak PM. (2011). Cyclin-specific docking motifs promote phosphorylation of yeast signaling proteins by G1/S Cdk complexes. *Curr Biol.* 21(19):1615-23.
- Bhaduri S, Valk E, Winters MJ, Gruessner B, Loog M, Pryciak PM. (2015). A docking interface in the cyclin Cln2 promotes multi-site phosphorylation of substrates and timely cell-cycle entry. *Curr Biol.* 25(3):316-25.
- Bose I, Irazoqui JE, Moskow JJ, Bardes ES, Zyla TR, Lew DJ. (2001). Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p. *J Biol Chem.* 276(10):7176-86.
- Bourne Y, Watson MH, Hickey MJ, Holmes W, Rocque W, Reed SI, Tainer JA. (1996). Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell.* 84(6):863-74.
- Brown NR, Noble ME, Endicott JA, Johnson LN. (1999a). The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol.* 1(7):438-43.
- Brown NR, Noble ME, Lawrie AM, Morris MC, Tunnah P, Divita G, Johnson LN, Endicott JA. (1999b). Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity. *J Biol Chem.* 274(13):8746-56.
- Buvelot S, Tatsutani SY, Vermaak D, Biggins S. (2003). The budding yeast Ipl1/Aurora protein kinase regulates mitotic spindle disassembly. *J Cell Biol.* 2003 Feb 3;160(3):329-39.
- Cohen P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol.* 4(5):E127-30.
- Costanzo M, Nishikawa JL, Tang X, Millman JS, Schub O, Breitkreuz K, Dewar D, Rupes I, Andrews B, Tyers M. (2004). CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell.* 117(7):899-913.

- Cross FR, Yuste-Rojas M, Gray S, Jacobson MD. (1999). Specialization and targeting of B-type cyclins. *Mol Cell*. 4(1):11-9.
- Cross FR. (1988). DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 8(11):4675-84.
- Dahmann C, Futcher B. (1995). Specialization of B-type cyclins for mitosis or meiosis in *S. cerevisiae*. *Genetics*. 140(3):957-63.
- de Bruin RA, McDonald WH, Kalashnikova TI, Yates J 3rd, Wittenberg C. (2004). Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell*. 117(7):887-98.
- Deshai RJ, Chau V, Kirschner M. (1995). Ubiquitination of the G1 cyclin Cln2p by a Cdc34p-dependent pathway. *EMBO J*. 14(2):303-12.
- Dirick L, Böhm T, Nasmyth K. (1995). Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 14(19):4803-13.
- Dirick L, Moll T, Auer H, Nasmyth K. (1992). A central role for SWI6 in modulating cell cycle Start-specific transcription in yeast. *Nature*. 357(6378):508-13.
- Dirick L, Nasmyth K. (1991). Positive feedback in the activation of G1 cyclins in yeast. *Nature*. 351(6329):754-7.
- Dohlman HG, Thorner JW. (2001). Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu Rev Biochem*. 70:703-54.
- Doncic A, Eser U, Atay O, Skotheim JM. (2013). An algorithm to automate yeast segmentation and tracking. *PLoS One*. 8(3):e57970.
- Doncic A, Falleur-Fettig M, Skotheim JM. (2011). Distinct interactions select and maintain a specific cell fate. *Mol Cell*. 43(4):528-39.
- Drees BL, Sundin B, Brazeau E, Caviston JP, Chen GC, Guo W, Kozminski KG, Lau MW, Moskow JJ, Tong A, Schenkman LR, McKenzie A 3rd, Brennwald P, Longtine M, Bi E, Chan C, Novick P, Boone C, Pringle JR, Davis TN, Fields S, Drubin DG. (2001). A protein interaction map for cell polarity development. *J Cell Biol*. 154(3):549-71.
- Edgington NP, Futcher B. (2001). Relationship between the function and the location of G1 cyclins in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci*. 114(Pt 24):4599-611.
- Egan EA, Solomon MJ. (1998). Cyclin-stimulated binding of Cks proteins to cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*. 18(7):3659-67.
- Egelhofer TA, Villén J, McCusker D, Gygi SP, Kellogg DR. (2008). The septins function in G1 pathways that influence the pattern of cell growth in budding yeast. *PLoS One*. 3(4):e2022.
- Elbaum MB, Zondlo NJ. (2014). OGlcnAcylation and phosphorylation have similar structural effects in  $\alpha$ -helices: post-translational modifications as inducible start and stop signals in  $\alpha$ -helices, with greater structural effects on threonine modification. *Biochemistry*. 253(14):2242-60.
- Enserink JM, Kolodner RD. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div*. 5:11.

- Escoté X, Zapater M, Clotet J, Posas F. (2004). Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol.* 6(10):997-1002.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* 33(2):389-96.
- Feldman RM, Correll CC, Kaplan KB, Deshaies RJ. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell.* 91(2):221-30.
- Ferrezuelo F, Colomina N, Futcher B, Aldea M. (2010). The transcriptional network activated by Cln3 cyclin at the G1-to-S transition of the yeast cell cycle. *Genome Biol.* 11(6):R67.
- Fisher D, Krasinska L, Coudreuse D, Novák B. (2012). Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *J Cell Sci.* 125(Pt 20):4703-11.
- Gartner A, Jovanović A, Jeoung DI, Bourlat S, Cross FR, Ammerer G. (1998). Pheromone-dependent G1 cell cycle arrest requires Far1 phosphorylation, but may not involve inhibition of Cdc28-Cln2 kinase, in vivo. *Mol Cell Biol.* 18(7):3681-91.
- González-Novo A, Jiménez J, Clotet J, Nadal-Ribelles M, Cavero S, de Nadal E, Posas F. (2015). Hog1 targets Whi5 and Msa1 transcription factors to downregulate cyclin expression upon stress. *Mol Cell Biol.* 35(9):1606-18.
- Hadwiger JA, Wittenberg C, Mendenhall MD, Reed SI. (1989a). The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* *suc1+* gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex. *Mol Cell Biol.* 9(5):2034-41.
- Hadwiger JA, Wittenberg C, Richardson HE, de Barros Lopes M, Reed SI. (1989b). A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(16):6255-9.
- Hanks SK, Hunter T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9(8):576-96.
- Hatakeyama M, Brill JA, Fink GR, Weinberg RA. (1994). Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 8(15):1759-71.
- Henchoz S, Chi Y, Catarin B, Herskowitz I, Deshaies RJ, Peter M. (1997). Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast. *Genes Dev.* 11(22):3046-60.
- Hereford LM, Hartwell LH. (1974). Sequential gene function in the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* DNA synthesis. *J Mol Biol.* 84(3):445-61.
- Holmes JK, Solomon MJ. (1996). A predictive scale for evaluating cyclin-dependent kinase substrates. A comparison of p34cdc2 and p33cdk2. *J Biol Chem.* 271(41):25240-6.
- Holt LJ, Tuch BB, Villén J, Johnson AD, Gygi SP, Morgan DO. (2009). Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science.* 325(5948):1682-6.
- Huang KN, Odinsky SA, Cross FR. (1997). Structure-function analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclin Cln2. *Mol Cell Biol.* 17(8):4654-66.

- Humphrey SJ, James DE, Mann M. (2015). Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 26(12):676-87.
- Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, Moreno-Borchart A, Doenges G, Schwob E, Schiebel E, Knop M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast.* 21(11):947-62.
- Jaspersen SL, Huneycutt BJ, Giddings TH Jr, Resing KA, Ahn NG, Winey M. (2004). Cdc28/Cdk1 regulates spindle pole body duplication through phosphorylation of Spc42 and Mps1. *Dev Cell.* 7(2):263-74.
- Jaspersen SL, Winey M. (2004). The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:1-28.
- Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, Pavletich NP. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature.* 376(6538):313-20.
- Johnston GC, Pringle JR, Hartwell LH. (1977). Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res.* 105(1):79-98.
- Joughin BA, Liu C, Lauffenburger DA, Hogue CW, Yaffe MB. (2012). Protein kinases display minimal interpositional dependence on substrate sequence: potential implications for the evolution of signalling networks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367(1602):2574-83.
- Kang J, Cheeseman IM, Kallstrom G, Velmurugan S, Barnes G, Chan CS. (2001). Functional cooperation of Dam1, Ipl1, and the inner centromere protein (INCENP)-related protein Sli15 during chromosome segregation. *J Cell Biol.* 155(5):763-74.
- Kang PJ, Béven L, Hariharan S, Park HO. (2010). The Rsr1/Bud1 GTPase interacts with itself and the Cdc42 GTPase during bud-site selection and polarity establishment in budding yeast. *Mol Biol Cell.* 21(17):3007-16.
- Knaus M, Pelli-Gulli MP, van Drogen F, Springer S, Jaquenoud M, Peter M. (2007). Phosphorylation of Bem2p and Bem3p may contribute to local activation of Cdc42p at bud emergence. *EMBO J.* 26(21):4501-13.
- Kono K, Nogami S, Abe M, Nishizawa M, Morishita S, Pellman D, Ohya Y. (2008). G1/S cyclin-dependent kinase regulates small GTPase Rho1p through phosphorylation of RhoGEF Tus1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 19(4):1763-71.
- Kunkel TA. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(2):488-92.
- Kurat CF, Wolinski H, Petschnigg J, Kaluarachchi S, Andrews B, Natter K, Kohlwein SD. (2009). Cdk1/Cdc28-dependent activation of the major triacylglycerol lipase Tgl4 in yeast links lipolysis to cell-cycle progression. *Mol Cell.* 33(1):53-63.
- Kõivomägi M, Loog M. (2011). Cdk1: a kinase with changing substrate specificity. *Cell Cycle.* 10(21):3625-6.
- Kõivomägi M, Valk E, Venta R, Iofik A, Lepiku M, Balog ER, Rubin SM, Morgan DO, Loog M. (2011a). Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature.* 480(7375):128-31.

- Kõivomägi M, Valk E, Venta R, Iofik A, Lepiku M, Morgan DO, Loog M. (2011b). Dynamics of Cdk1 substrate specificity during the cell cycle. *Mol Cell*. 42(5):610-23.
- Kõivomägi M, Örd M, Iofik A, Valk E, Venta R, Faustova I, Kivi R, Balog ER, Rubin SM, Loog M. (2013). Multisite phosphorylation networks as signal processors for Cdk1. *Nat Struct Mol Biol*. 20(12):1415-24.
- Landry BD, Doyle JP, Toczyski DP, Benanti JA. (2012). F-box protein specificity for G1 cyclins is dictated by subcellular localization. *PLoS Genet*. 8(7):e1002851.
- Lanker S, Valdivieso MH, Wittenberg C. (1996). Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science*. 271(5255):1597-601.
- Lengronne A, Schwob E. (2002). The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1). *Mol Cell*. 9(5):1067-78.
- Lew DJ, Reed SI. (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol*. 120(6):1305-20.
- Longtine MS, McKenzie A 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14(10):953-61.
- Loog M, Morgan DO. (2005). Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature*. 434(7029):104-8.
- Lõoke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*. 50(5):325-8.
- Lörincz AT, Reed SI. (1984). Primary structure homology between the product of yeast cell division control gene CDC28 and vertebrate oncogenes. *Nature*. 307(5947):183-5.
- Lowe ED, Tews I, Cheng KY, Brown NR, Gul S, Noble ME, Gamblin SJ, Johnson LN. (2002). Specificity determinants of recruitment peptides bound to phospho-CDK2/cyclin A. *Biochemistry*. 41(52):15625-34.
- Lundberg AS, Weinberg RA. (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*. 18(2):753-61.
- Malumbres M, Barbacid M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 9(3):153-66.
- Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci*. 27(10):514-20.
- McCourt P, Gallo-Ebert C, Gonghong Y, Jiang Y, Nickels JT Jr. (2013). PP2A(Cdc55) regulates G1 cyclin stability. *Cell Cycle*. 12(8):1201-10.
- McCusker D, Denison C, Anderson S, Egelhofer TA, Yates JR 3rd, Gygi SP, Kellogg DR. (2007). Cdk1 coordinates cell-surface growth with the cell cycle. *Nat Cell Biol*. 9(5):506-15.
- McGrath DA, Balog ER, Kõivomägi M, Lucena R, Mai MV, Hirschi A, Kellogg DR, Loog M, Rubin SM. (2013). Cks confers specificity to phosphorylation-dependent CDK signaling pathways. *Nat Struct Mol Biol*. 20(12):1407-14.

- Mendenhall MD, Hodge AE. (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(4):1191-243.
- Miller ME, Cross FR, Groeger AL, Jameson KL. (2005). Identification of novel and conserved functional and structural elements of the G1 cyclin Cln3 important for interactions with the CDK Cdc28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 22(13):1021-36.
- Miller ME, Cross FR. (2001). Mechanisms controlling subcellular localization of the G(1) cyclins Cln2p and Cln3p in budding yeast. *Mol Cell Biol.* 21(18):6292-311.
- Moffat J, Andrews B. (2004). Late-G1 cyclin-CDK activity is essential for control of cell morphogenesis in budding yeast. *Nat Cell Biol.* 6(1):59-66.
- Mok J, Kim PM, Lam HY, Piccirillo S, Zhou X, Jeschke GR, Sheridan DL, Parker SA, Desai V, Jwa M, Camerini E, Niu H, Good M, Remenyi A, Ma JL, Sheu YJ, Sassi HE, Sopko R, Chan CS, De Virgilio C, Hollingsworth NM, Lim WA, Stern DF, Stillman B, Andrews BJ, Gerstein MB, Snyder M, Turk BE. (2010). Deciphering protein kinase specificity through large-scale analysis of yeast phosphorylation site motifs. *Sci Signal.* 3(109):ra12.
- Moreno-Torres M, Jaquenoud M, De Virgilio C. (2015). TORC1 controls G1-S cell cycle transition in yeast via Mpk1 and the greatwall kinase pathway. *Nat Commun.* 6:8256.
- Morgan DO. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:261-91.
- Nakajima Y, Cormier A, Tyers RG, Pigula A, Peng Y, Drubin DG, Barnes G. (2011). Ipl1/Aurora-dependent phosphorylation of Sli15/INCENP regulates CPC-spindle interaction to ensure proper microtubule dynamics. *J Cell Biol.* 194(1):137-53.
- Nash R, Tokiwa G, Anand S, Erickson K, Fitcher AB. (1988). The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *EMBO J.* 7(13):4335-46.
- Nasmyth K. (1993). Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr Opin Cell Biol.* 1993 Apr;5(2):166-79.
- Ninomiya-Tsuji J, Nomoto S, Yasuda H, Reed SI, Matsumoto K. (1991). Cloning of a human cDNA encoding a CDC2-related kinase by complementation of a budding yeast *cdc28* mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(20):9006-10.
- Oehlen LJ, Cross FR. (1994). G1 cyclins CLN1 and CLN2 repress the mating factor response pathway at Start in the yeast cell cycle. *Genes Dev.* 8(9):1058-70.
- Oehlen LJ, Cross FR. (1998). Potential regulation of Ste20 function by the Cln1-Cdc28 and Cln2-Cdc28 cyclin-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 273(39):25089-97.
- Pereira G, Schiebel E. (2003). Separase regulates INCENP-Aurora B anaphase spindle function through Cdc14. *Science.* 302(5653):2120-4.
- Queralt E, Igual JC. (2004). Functional distinction between Cln1p and Cln2p cyclins in the control of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic cycle. *Genetics.* 168(1):129-40.
- Quilis I, Igual JC. (2012). Molecular basis of the functional distinction between Cln1 and Cln2 cyclins. *Cell Cycle.* 11(16):3117-31.

- Reed SI, Hadwiger JA, Richardson HE, Wittenberg C. (1989). Analysis of the Cdc28 protein kinase complex by dosage suppression. *J Cell Sci Suppl.* 12:29-37.
- Reynard GJ, Reynolds W, Verma R, Deshaies RJ. (2000). Cks1 is required for G(1) cyclin-cyclin-dependent kinase activity in budding yeast. *Mol Cell Biol.* 20(16):5858-64.
- Richardson HE, Lew DJ, Henze M, Sugimoto K, Reed SI. (1992). Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes Dev.* 6(11):2021-34.
- Richardson HE, Stueland CS, Thomas J, Russell P, Reed SI. (1990). Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* 4(8):1332-44.
- Richardson HE, Wittenberg C, Cross F, Reed SI. (1989). An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell.* 59(6):1127-33.
- Salama SR, Hendricks KB, Thorner J. (1994). G1 cyclin degradation: the PEST motif of yeast Cln2 is necessary, but not sufficient, for rapid protein turnover. *Mol Cell Biol.* 14(12):7953-66.
- Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Cáceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barbacid M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature.* 448(7155):811-5.
- Schneider BL, Patton EE, Lanker S, Mendenhall MD, Wittenberg C, Futcher B, Tyers M. 1998. Yeast G1 cyclins are unstable in G1 phase. *Nature.* 395(6697):86-9.
- Schulman BA, Lindstrom DL, Harlow E. (1998). Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(18):10453-8.
- Schwob E, Böhm T, Mendenhall MD, Nasmyth K. (1994). The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell.* 79(2):233-44.
- Schwob E, Nasmyth K. (1993). CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 7(7A):1160-75.
- Shimada Y, Gulli MP, Peter M. (2000). Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat Cell Biol.* 2(2):117-24.
- Skotheim JM, Di Talia S, Siggia ED, Cross FR. (2008). Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature.* 454(7202):291-6.
- Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell.* 91(2):209-19.
- Songyang Z, Blechner S, Hoagland N, Hoekstra MF, Piwnicka-Worms H, Cantley LC. (1994). Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr Biol.* 4(11):973-82.
- Sopko R, Huang D, Smith JC, Figeys D, Andrews BJ. (2007). Activation of the Cdc42p GTPase by cyclin-dependent protein kinases in budding yeast. *EMBO J.* 26(21):4487-500.
- Stern B, Nurse P. (1996). A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.* 12(9):345-50.

- Strickfaden SC, Winters MJ, Ben-Ari G, Lamson RE, Tyers M, Pryciak PM. (2007). A mechanism for cell-cycle regulation of MAP kinase signaling in a yeast differentiation pathway. *Cell*. 128(3):519-31.
- Sullivan M, Morgan DO. (2007). Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(11):894-903.
- Swaney DL, Beltrao P, Starita L, Guo A, Rush J, Fields S, Krogan NJ, Villén J. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat Methods*. 10(7):676-82.
- Takeda DY, Wohlschlegel JA, Dutta A. (2001). A bipartite substrate recognition motif for cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*. 276(3):1993-7.
- Tyers M, Tokiwa G, Futcher B. (1993). Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J*. 12(5):1955-68.
- Tyers M, Tokiwa G, Nash R, Futcher B. (1992). The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J*. 11(5):1773-84.
- Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM, Morgan DO. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*. 425(6960):859-64.
- Uhlmann F, Bouchoux C, López-Avilés S. (2011). A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 366(1584):3572-83.
- Venta R, Valk E, Kõivomägi M, Loog M. (2012). Double-negative feedback between S-phase cyclin-CDK and CKI generates abruptness in the G1/S switch. *Front Physiol*. 3:459.
- Visintin R, Hwang ES, Amon A. (1999). Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature*. 398(6730):818-23.
- Yahya G, Parisi E, Flores A, Gallego C, Aldea M. (2014). A Whi7-anchored loop controls the G1 Cdk-cyclin complex at start. *Mol Cell*. 53(1):115-26. doi: 10.1016/j.molcel.2013.11.015.
- Zinzalla V, Graziola M, Mastriani A, Vanoni M, Alberghina L. (2007). Rapamycin-mediated G1 arrest involves regulation of the Cdk inhibitor Sic1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 63(5):1482-94.

## **Kasutatud veebiaadressid**

<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>

<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>

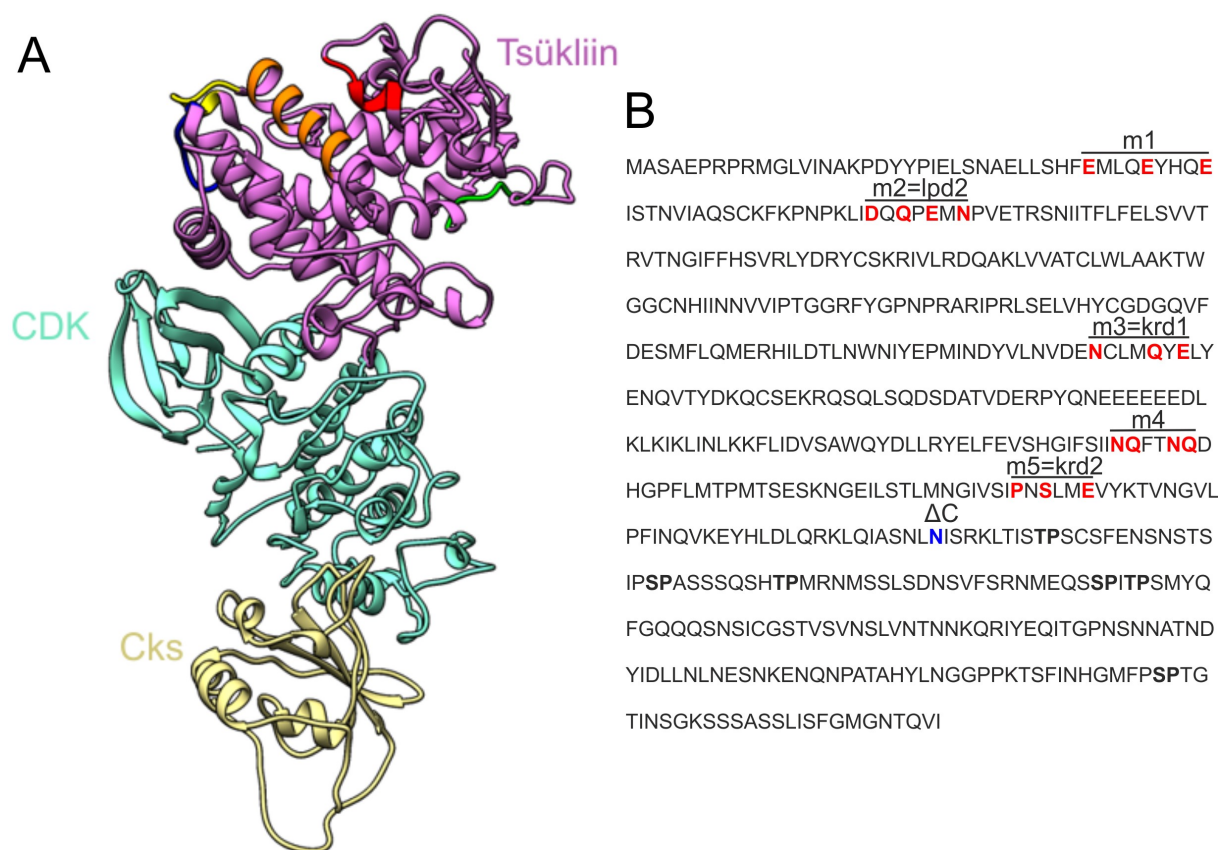
<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/>

<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/FUNGI/showAlign>

## Lisad

### Lisa 1. Kasutatud Cln2 mutandid.



**Lisa joonis 1. Tehtud Cln2 mutandid.** (A) Cln2-CDK-Cks kompleksi struktuur. Oranžilt on märgitud B-tüüpi tsükliinide hüdrofoobne seandumisala, sinisega kirjanduses avaldatud lpd1 mutatsioonid (Bhaduri jt, 2015), kollasega käesolevas töös tehtud m2 ehk lpd2 regioon, rohelisega m3 ehk krd1 regioon ning punasega m5 ehk krd2 mutantis muteeritud ala. Cln2-CDK-Cks kompleksi struktuur tehti joondades *TM-align* programmiga (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/TM-align/>) tsükliin A-Cdk2-Cks1 kompleksi struktuuri (Kõivomägi jt, 2013) tsükliini Cln2 ennustusliku struktuuriga (tehtud *I-TASSER* programmiga) ning asendades kompleksis tsükliin A tsükliiniga Cln2. (B) Cln2 järjestus, millel on näidatud tehtud mutatsioonid. Punasega on märgitud mutantides alaniinidega asendatud aminohapped. Positsiooni N362, mis on märgitud siniselt, juurest tehti C-terminaalse ala trunkeering ( $\Delta C$ ). C-terminaalses alas paiknevad Cdk1 fosforüleerimismotiivid on märgitud rasvaselt. Cln2-6A mutandis tehti järgnevad asendused: T381A, S396A, T405A, S427A, T430A, S518A.

## Lisa 2. PKA fosforüleerimissaidid ennustuslikes Cln2

### seondumismotiivides

Sli15: **R**L**KIK**KEKTL**RK**L**S**PN  
 Boi2: VDKK**S**KK**S**RSK**R**RS**S**VSAK  
 Fus1: KPL**K**R**K**K**R**R**Q**S**K**MY  
 Sac7: **D**E**E**K**R**R**R**K**I**R**H**K**R**R**L**T**R**DI  
 Bnr1: GM**K**L**S**K**A**L**Y**K**L**E**K**F**L**R**K**Q**S**FL  
 Sfh1: **K**E**E**I**Q****K**R**E**I**E****K**E**R**N**L**R**R**L**K**R**E**TDR  
 Bud3: **A**A**T**K**N**F**S**K**D****I**K**L**F**I**R**H**F**S**NV

Lisa joonis 2. Ennustuslike Cln2 seonduksimotiivide läheduses paiknevad PKA fosforüleerimismotiivid. Toodud on järjestused Sli15, Boi2, Fus1, Sac7, Bnr1, Sfh1 ja Bud2 valkudest, mis võivad sisaldada Cln2 seonduksimotiivi. Kollaselt on kujutatud  $\alpha$ -heeliksid, punaselt on märgitud positiivselt laetud aminohappejäägid, mis võivad mõjutada Cln2 seonduksimist, ning siniselt on värvitud ennustuslikud PKA fosforüleerimissaidid.

## Lisa 3. Kasutatud pärmitüved

Nimi	Kirjeldus	Allikas
DOM0090	<i>MATa bar1Δ::hisG</i>	David O Morgan
DK252	<i>MATa URA3:: P<sub>GALI</sub>-CLN3 cln1Δ::HIS3 cln2Δ::LEU2 bar1Δ::hisG</i>	Egelhofer jt, 2008
MÖ038	<i>MATa cln1Δ::LEU2 cln2Δ::URA3 bar1Δ::hisG</i>	Käesolev töö
MÖ040	<i>MATa cln1Δ::LEU2 cln2Δ::URA3 WHI5-mCherry::HIS3 SIC1-EGFP::kanMX4 bar1Δ::hisG</i>	Käesolev töö
MÖ047	<i>MATa cln1Δ::LEU2 cln2Δ::URA3 WHI5-mCherry::HIS3 SLI15-EGFP::kanMX4 bar1Δ::hisG</i>	Käesolev töö
MÖ061	<i>MATa cln1Δ::LEU2 cln2Δ::URA3 SRL3-13MYC::kanMX4 bar1Δ::hisG</i>	Käesolev töö
MÖ062	<i>MATa cln1Δ::LEU2 cln2Δ::URA3 CDC24-13MYC::kanMX4 bar1Δ::hisG</i>	Käesolev töö

Kõikide kasutatud pärmitüvede algtüvi on W303 (*leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*)

## Lisa 4. Kasutatud plasmiidid

Nimi	Algplasmiid	Kirjeldus	Allikas
pMO013	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-521)	Käesolev töö
pMO014	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-511)	Käesolev töö
pMO016	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-511; S448)	Käesolev töö
pMO025	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-511; S427)	Käesolev töö

pMO030	pET28a	6xHis-Rtt109(S168)	Käesolev töö
pMO031	pET28a	6xHis-Rtt109(T34)	Käesolev töö
pMO032	pET28a	6xHis-Rtt109(T143)	Käesolev töö
pMO035	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-454; S448)	Käesolev töö
pMO042	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-497; S448)	Käesolev töö
pMO043	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-483; S448)	Käesolev töö
pMO044	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-470; S448)	Käesolev töö
pMO056	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-511; S448 RSKK-AASA)	Käesolev töö
pMO061	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-511; S448 K496A)	Käesolev töö
pMO062	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-511; S448 KK485AA)	Käesolev töö
pMO067	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-511; S448 KNK-ANA)	Käesolev töö
pMO068	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-511 S448; RLKIKEK-ALAIAEA)	Käesolev töö
pMO071	pET28a	6xHis-Rtt109(RRLK-AALA(h1))	Käesolev töö
pMO075	pGEX-4T-1	GST-Sli15(422-511; S448 rk)	Käesolev töö
pMO076	pET28a	6xHis-Rtt109(S134)	Käesolev töö
pMO081	pET28a	6xHis-Rtt109(RKQFRAIKK-AAQFAAIAA(h2))	Käesolev töö
pPP2154	pRS413	CEN <i>HIS3 P<sub>GALI</sub>-GST T<sub>CYC1</sub></i>	Bhaduri ja Pryciak, 2011
pPP3572	pRS413	CEN <i>HIS3 P<sub>GALI</sub>-GST-CLN2 T<sub>CYC1</sub></i>	Bhaduri ja Pryciak, 2011
pMO103	pRS413	CEN <i>HIS3 P<sub>GALI</sub>-GST-CLN2(m1) T<sub>CYC1</sub></i>	Käesolev töö
pMO109	pRS413	CEN <i>HIS3 P<sub>GALI</sub>-GST-CLN2(m4) T<sub>CYC1</sub></i>	Käesolev töö

pMO110	pRS413	CEN <i>HIS3 P<sub>GALI</sub>-GST-CLN2(m2) T<sub>CYC1</sub></i>	Käesolev töö
pMO111	pRS413	CEN <i>HIS3 P<sub>GALI</sub>-GST-CLN2(1-362) T<sub>CYC1</sub></i>	Käesolev töö
pMO121	pGEX-4T-1	GST-Bud2(1001-1104)	Käesolev töö
pMO122	pET28a	6xHis-Ste7	Käesolev töö
pMO123	pRS413	CEN <i>HIS3 P<sub>GALI</sub>-GST-CLN2(m3) T<sub>CYC1</sub></i>	Käesolev töö
pMO124	pRS413	CEN <i>HIS3 P<sub>GALI</sub>-GST-CLN2(m5) T<sub>CYC1</sub></i>	Käesolev töö
pMO128	pGEX-4T-1	GST-Bud2(1001-1104 h-mut)	Käesolev töö
pMO130	pGEX-4T-1	GST-Spc29	Käesolev töö
pMO164	pRS313	<i>P<sub>ADH</sub> 10MYC-SLII5(422-511)</i>	Käesolev töö
pMO173	pRS314	<i>P<sub>CLN2</sub> CLN2(wt)-7MYC</i>	Käesolev töö
pMO174	pRS314	<i>P<sub>CLN2</sub> CLN2(krd2)-7MYC</i>	Käesolev töö
pMO178	pRS314	<i>P<sub>CLN2</sub> 7MYC</i>	Käesolev töö
pMO179	pRS314	<i>P<sub>CLN2</sub> CLN2(krd1)-7MYC</i>	Käesolev töö
pMO180	pRS314	<i>P<sub>CLN2</sub> CLN2(lpd2)-7MYC</i>	Käesolev töö
pMO183	pRS314	<i>P<sub>CLN2</sub></i>	Käesolev töö
pMO184	pRS314	<i>P<sub>CLN2</sub> CLN2(wt)</i>	Käesolev töö
pMO185	pRS314	<i>P<sub>CLN2</sub> CLN2(lpd2)</i>	Käesolev töö
pMO186	pRS314	<i>P<sub>CLN2</sub> CLN2(krd1)</i>	Käesolev töö
pMO187	pRS314	<i>P<sub>CLN2</sub> CLN2(krd2)</i>	Käesolev töö
pMO189	pRS413	CEN <i>HIS3 P<sub>GALI</sub>-GST-CLN2(6A) T<sub>CYC1</sub></i>	Käesolev töö
pMO196	pRS313	<i>P<sub>ADH</sub> 10MYC-SLII5(422-511 rk)</i>	Käesolev töö
pMO205	pGEX-4T-1	GST-Bud2(1001-1104 T1092A T1101A)	Käesolev töö
Rtt109	pET28a	6xHis-Rtt109	Mardo Kõivomägi

Sic1	pET28a	6xHis-Sic1(1-216)	Mardo Kõivomägi
Bop3	pET28a	6xHis-Bop3	Mardo Kõivomägi
Srl3	pET28a	6xHis-Srl3	Mardo Kõivomägi
Mms4	pET28a	6xHis-Mms4	Mardo Kõivomägi
Hcm1	pET28a	6xHis-Hcm1	Mardo Kõivomägi
Gic2	pET28a	6xHis-Gic2	Mardo Kõivomägi
Stb1	pET28a	6xHis-Stb1	Mardo Kõivomägi
Ash1	pET28a	6xHis-Ash1	Mardo Kõivomägi
Nrm1	pGEX-4T-1	GST-Nrm1	Mardo Kõivomägi

## Lisa 5. Katsetes kasutatud tüved ja plasmiidid

Joonis 10. (E) Tüvi: DK252. Plasmiidid: pMO173, pMO174, pMO178, pMO179, pMO180.

(F) Tüvi: DOM0090. Plasmiidid: pMO173, pMO174, pMO178, pMO179, pMO180.

Joonis 12 (A) Tüvi: MÖ038. Plasmiid: pMO173.

(B) Tüvi: MÖ061 . Plasmiidid: pMO183, pMO184, pMO185, pMO186, pMO187.

Joonis 13. Tüvi: MÖ040. Plasmiidid: pMO173, pMO174, pMO178, pMO179, pMO180.

Joonis 14. (A) Tüvi: MÖ040. Plasmiidid: pMO173, pMO174, pMO178, pMO179, pMO180.

(B) Tüvi: MÖ062. Plasmiidid: pMO183, pMO184, pMO186, pMO187.

(C, D) Tüvi: DOM0090. Plasmiidid: pPP2154, pPP3572, pMO110, pMO123, pMO124

Joonis 15. Tüvi: MÖ038. Plasmiidid: pMO164, pMO196, pMO183, pMO184, pMO185, pMO186, pMO187

Joonis 16. Tüvi: MÖ047. Plasmiidid: pMO173, pMO174, pMO178, pMO179.

# Lihtlitsents

## Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mihkel Örd

(sünnikuupäev: 09.06.1991),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „G1-faasi tsükliinist sõltuva kinaasi kompleksi Cln2-Cdk1 substraatide valiku mehhanismid”,

mille juhendaja on professor Mart Loog,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **27.05.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016