

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

Kaur Pääbo

Clb5 valgu mutagenees ja selle mõju substraatvalkude fosforüleerimisele

Magistritöö (30 EAP)

Geenitehnoloogia eriala

Juhendajad:

Prof. Mart Loog

M.Sc Rainis Venta

TARTU 2017

Infoleht

Clb5 valgu mutagenees ja selle mõju substraatvalkude fosforüleerimisele

Kaur Pääbo

Saccharomyces cerevisiae tsentraalne kinaas Cdk1 reguleerib rakutsükli progressiooni läbi erinevate substraatvalkude fosforüleerimise. Erinevatel faasi etappidel seondub Cdk1 erinevate tsükliinidega, mille pinnal asetsevad seondumismotiivid mõjutavad substraatvalkude seondumist ja fosforüleerimist. Käesolevas töös tehti B-tüüpi tsükliini Clb5 mutageneesi analüüs, mille käigus loodi mutantsed valgud, millel esinesid erinevad seondumisvõimekused valitud substraatvalkude suhtes. Leiti nii mutant, millel vähenes kõigi substraatvalkude suhtes aktiivsus, kui ka mutandid, mille puhul tekkis ühe substraadispetsiifiline seondumis- ja fosforüleerimisvõime efekt.

Märksõnad: Rakutsükkel, fosforüleerimine, mutagenees, seondumismotiivid

Mutagenesis of protein Clb5 and its effects on the phosphorylation of substrate proteins

Kaur Pääbo

The central kinase Cdk1 in *Saccharomyces cerevisiae* regulates the progression of the cell cycle by phosphorylation of different substrate proteins. At different phases of the cell cycle Cdk1 binds with different cyclins, which modulate the binding and phosphorylation of substrates through binding motifs on their surfaces. This work a mutagenesis analysis of the B-type cyclin Clb5 was carried out and mutated versions of the protein were created, which had different effects on binding our chosen substrates. A mutant was found that had a significantly lower level of binding and phosphorylation to all substrates as well as several mutants, that had substrate-specific binding and phosphorylation effects.

Key words: Cell cycle, phosphorylation, mutagenesis, binding motifs

CERCS: P310 (Proteins, enzymology)

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Rakutsükli ülevaade.....	7
1.2 Rakutsükli kulgemise lülited	8
1.3 CDK aktiivsuse ja lokalisatsiooni regulatsioon.....	9
1.4 Tsükliin-Cdk1-Cks1 komplekside substraadispetsiifilisus.....	10
1.5 B-tüüpi tsükliinide struktuur ja Clb5	13
1.6 Clb-Cdk1 inhibiitor Sic1	14
1.7 Tsükliin-Cdk1 inhibiitor Far1.....	16
1.8 Tsükliin-Cdk1 substraat Kar9.....	17
1.9 Sünteetilised võrgustikud elusrakkudes.....	18
2. Eksperimentaalosa	19
2.1. Töö eesmärgid	19
2.2. Materjal ja metoodika	20
2.2.1. Tüved, söötmed ja plaadid	20
2.2.2. Konstruktide tegemine PCR-iga.....	20
2.2.3. PCR produkti ja vektori transformatsioon pärmi	21
2.2.4. Pärmist plasmiidide eraldamine ja transformatsioon bakterirakkudesse	22
2.2.5. Plasmiidide eraldamine DH5 α rakkudest ja transformatsioon pärmi Sic1 deletsioonitüvedesse	23
2.2.6. Western blot analüüs vektorite ekspressioonikontrolliks.....	24
2.2.7. TAP-märgisega Clb5-Cks1 komplekside puhastamine.....	25

2.2.8	6xHis märgisega Sic1 variantide puhastamine.....	26
2.2.9	Katsed puhastatud valkudega	27
2.2.9.1	Clb5-Cdk1 kompleksi fosforüleerimisvõime ja spetsiifika hindamine	27
2.2.9.2	Cdk1 ensüümikoguste kalibreerimine.....	28
2.2.9.3	Clb5-Cdk1 kompleksi substraatvalkude fosforüleerimine.....	28
2.2.9.4	Clb5-Cdk1 kompleksi substraatide Michaelis Menteni konstandi mõõtmine ..	29
2.3	Tulemused ja arutelu	30
2.3.1	Clb5-Cdk1 kompleksi fosforüleerimisvõime ja spetsiifika.....	30
2.3.2	Cdk1 ensüümikoguste määramine ja võrdsustamine	31
2.3.3	Mutantsete Clb-Cdk1 komplekside substraatide fosforüleerimine	34
2.3.4	Valitud mutantidega substraatide Km konstandi mõõtmine	42
	Kokkuvõte	49
	Summary.....	50
	Kasutatud kirjandus	51
	Lisad	55
Lisa 1	Clb5-Cdk1 fosforüleerimisvõime ja spetsiifika	55
Lisa 2	Valgupreparaatide ühtlustamine Comassie ja Swel järgi	56
Lisa 3	Mutantsete Clb5-Cdk1 komplekside ja substraatidega tehtud kinaasikatsete paneel ..	57
	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	58

KASUTATUD LÜHENDID

³²-P – Raske radioaktiivne fosfor

ATP – Adenosiin trifosfaat (i.k. *Adenosine triphosphate*)

CAK – Tsükliinsõltuv kinaasi aktiveeriv kinaas (i.k. *Cyclin dependent kinase activating kinase*)

CDK – Tsükliinsõltuv kinaas (i.k. *Cyclin dependant kinase*)

CSM – Täissüntetiline sööde (i.k. *Complete synthetic media*)

DTT – ditiotreitol (i.k. ditiotreitol)

HP – Hüdrofoobne tasku (i.k. *Hydrophobic patch*)

IDP – Loomupäraselt struktuuritu valk (i.k. *intrinsically disordered protein*)

LLPP – Leutsiini ja proliinirikas motiiv, seotud G1 faasi tsükliinidega seondumisel

MBF – Mbp1 ja Swi6 kompleks

OD600 – Optiline tihedus lainepikkusel 600 nm (i.k. *Optical density at 600 nm*)

PCR – Polümeraas ahelreaktsioon (i.k. *Polymerase chain reaction*)

PMSF – Fenüülmetüülsulfonüül fluoriid (i.k. *Phenylmethyloxymethyl fluoride*)

RxL – Seondumismotiiv positiivsest, suvalisest ja hüdrofoobsest aminohappest

SBF – Swi4 ja Swi6 kompleks

TAP-tag – Tandemafiinsuspuhastamise-märgis (i.k. *Tandem affinity purification tag*)

YPD – Pärmiekstrakt, peptoon ja glükoos (i.k. *Yeast extract, peptone, glucose*)

SISSEJUHATUS

Rakutsükli käigus rakud kasvavad ja kahekordistavad oma geneetilise informatsiooni, peale mida toimub tsütokinees ehk raku jagunemine. Kõige suuremal määral juhivad tsükli kulgemist tsükliinsõltuvad kinaasid (CDK-d), mida aktiveerivad perioodiliselt akumulatuurid tsükliinid moodustades CDK-dega komplekse. Rakutsükli käigus ja selle faaside läbimiseks fosforüleerib kinaas substraatvalke, mida on vaja vastava faasi läbimiseks aktiveerida, inaktiveerida või lagundada. Substraatvalkude fosforüleerimine sõltub fosfaati aktsepteeriva saidi aminohappelisest ülesehitusest, CDK aktiivsaidist ning tsükliinil paiknevatest seondumismotiividest. Lisaks mängib multifosforüleerimisel olulist rolli CDK-tsükliin kompleksiga seonduv ja substraadil fosfaati siduv valk Cks1.

Pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* osaleb rakutsükliks üks peamine kinaas, Cdk1, ning sellega seonduvad kolm G1 tsükliini Cln1-3 ning kuus B-tüüpi tsükliini Clb1-6. Ajaliselt rakutsükli edenedes tõstavad seonduvad tsükliinid Cdk1 aktiivsust, kus kõige väiksema aktiivsusega on G1 tsükliin-Cdk1-kompleksid ning kõige suuremad mitootiliste tsükliinide Clb1,2-Cdk1 aktiivsused. Varasemate tsükliinidega kompleksid kompenseerivad oma väiksemat Cdk1 aktiivsust tugevama substraat-spetsiifilise seondumisega, mis sõltub kindlatest aminohappelistest järjestustest tsükliini pinnal.

Tsükliinidel paiknevate substraate siduvate aminohapete uurimise teel oleks võimalik kindlaks teha kindlad seaduspärasused substraatidel ja CDK-kompleksil interakteeruvatest aminohapetest. Sellel informatsioonil põhinevad kunstlikud Cdk1-tsükliin kompleksid võimaldavad elusorganismides luua tehislikke fosforüleerimisradasid. Rakutsüklist eraldiseisvad ning seda mitte mõjutavad tehiskinaasid suudaksid meid huvitavate valkudega seonduda ning neid postranlatsionaalselt modifitseerides kunstlikult muuta rakus toimuvaid protsesse.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Rakutsükli ülevaade

Rakutsükkel on protsess, kus rakud kasvavad, replitseerivad oma DNA ning jagavad selle võrdselt kahe tütaraku vahel. Raku jagunemistsükli läbimise eest kannavad hoolt tsükliinsõltuvad proteiinkinaasid (cyclin dependent protein kinase – cdk) ja neid reguleerivad valgud - tsükliinid. (Hartwell, 1973), mis on perioodiliselt ekspresseeritavad valgud, mida kontrollitakse lisaks transkriptsioonile ka läbi lokalisatsiooni ning degradatsiooni (Murray, 2004).

Üldiselt jagatakse protsess neljaks faasiks – G1 ehk kasvufaas, mille käigus rakk kasvab kuni välis- ning sisekeskkonnast pärit signaalid lubavad liikuda S-faasi, ehk DNA sünteesi juurde. Järgnevalt liiguvad rakud G2-faasi, millel kindlaid piire *S. cerevisiae*-s erinevalt *Schizosaccharomyces pombe*-st ehk poolduva pärmi rakkudest ei ole. Rakutsükli lõpetab M-faas, ehk mitoos, mille käigus jagatakse duplitseeritud kromosoomid võrdselt kahe tütaraku vahel ning protsessi edukal lõpetamisel liiguvad mõlemad jälle G1-faasi (Mendenhall ja Hodge, 1998). Edaspidi käsitlengi rakutsükli regulatsiooni pagaripärmi näitel.

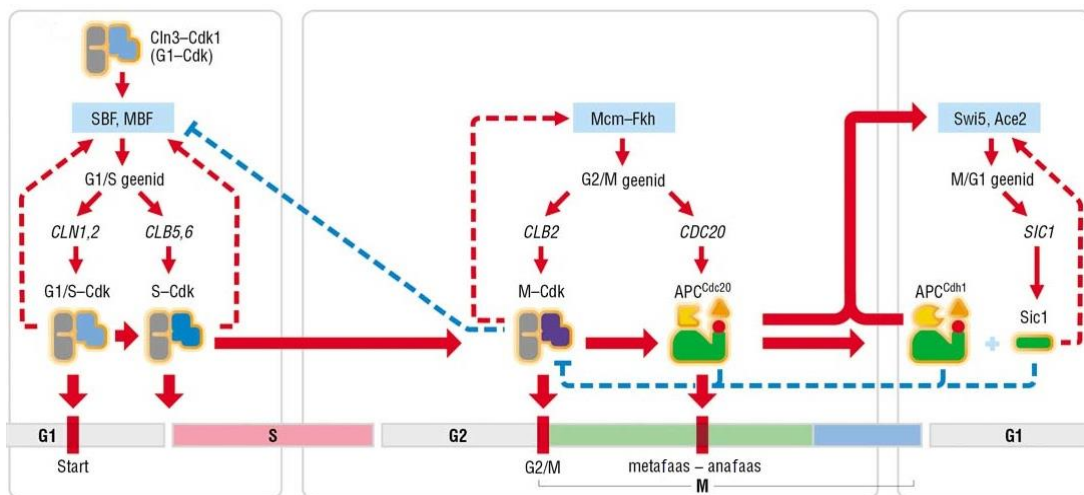
Pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* toimub rakutsükli jooksul tsükliin-Cdk1 komplekside tekkimisel järk-järguline Cdk1 aktiivsuse kasvamine. G1-faasi Cln-Cdk1 kompleksidel on kõige väiksem kinaasne aktiivsus ning mitootilistel tsükliin-CDK kompleksidel suurim aktiivsus. Selline aktiivsuse kasv tagab tsükli suunatud kulgemise ning õigetes faasides kindlate substraatide fosforüleerimise (Morgan, 2007).

Kuute pärmis leiduvat B-tüüpi tsükliini jagatakse üldiselt kolme paari – Clb5 ja Clb6 kui G1/S faasi tsükliinid, Clb3 ning Clb4 kui G2/M faasis osalejad ning Clb1 ja Clb2 M faasi algatajatena. Deletsiooniuuringud näitavad, et B-tüüpi tsükliinid kattuvad oma võimes rakutsükli läbi selle faaside edasi viia. Näiteks võib viie B-tüüpi tsükliini deletsiooniga pärmitüvi olla eluvõimeline, kui Clb1 ekspresseeritakse konstitutiivselt läbi tsükli (Haase, Reed, 1999), viidates justkui B-tüüpi tsükliinide erinemisele ainult nende ekspressiooniprofiilides. Biokeemiliste uuringute käigus on aga näidatud, kuidas Clb-Cdk1 kompleksid seovad substraate erineva afiinsusega ning neid erineva spetsiifikaga. fosforüleerivad, viidates tsükliinide spetsialiseerumisele kui protsessile, kus rakutsükli optimeeritakse läbi nende valkude lokalisatsiooni, aktiivsuse ja substraadiafiinsuste (Loog, Morgan, 2005).

1.2 Rakutsükli kulgemise lülited

Rakutsükli suunatud kulgemiseks on vaja biokeemilisi lüliteid (Joonises 1. alumises osas punaselt näidatud), mille aktiveerumisel liigub rakk pöördumatult tsükli edasi.

Esimeseks lülitiks on **Start**, mis toimub G1-faasis, kui rakk otsustab tsükli replikatsiooni ja mitoosi etappe läbida. Start lülituse aktiveerib transkriptsionaalse repressori Whi5 fosforüleerimine ja tuumaeksport Cln3-Cdk1 poolt „Selle tõttu algab G1/S faasi spetsiifiline transkriptsioon ning transkriptsioonifaktorid SBF ja MBF põhjustavad vastavalt CLN1,2 ja CLB5,6 geenide transkriptsiooni (de Bruin *et al.*, 2004). S-faas käivitub, kui B-tüüpi tsükliinide inhibiitor Sic1 lagundatakse ja akumulereeritud Clb5,6-Cdk1 aktiivsus vabastatakse (Mendenhall, 1998). S-faasi käigus seonduvad Mcm1 koos Fkh1 või Fkh2-ga transkriptsioonifaktoriga Ndd1 ning algatavad **G2/M** faasi geenide Clb2 ja Cdc20 ekspressiooni- See stimuleerib vastavalt kas mitootilist faasi või mängib võtmerolli anafaasi-viivas kompleksis (APC) mis lisaks kromatiidide eraldamisele **metafaasi ja anafaasi** piiril ka degradeerib tsükliine (Visintin *et al.*, 1997). Läbi tsükliinide degradeerimise APC^{Cdc20} vähenenud Cdk1 aktiivsuse tõttu kogunevad tuuma transkriptsionaalsed regulaatorid Ace2 ning Swi5, mis tõstavad Cln3 ekspressiooni (Di Talia *et al.*, 2009).



Joonis 1. Rakutsükli faaside ja lülituste skeem. Näidatud on Start, G1/S, G2/M ja metafaas-anafaas lülitus ning tsükliin-CDK komplekside ning neid aktiveerivate transkriptsioonifaktorite skemaatiline roll. Rakkude kasvufaasi (G1) jooksul toimub rakutsüklik valmistumine Cln3-Cdk1 aktiivsuse abil (vasakpoolne joonega piiratud ala). Peale START lülitust valmistub rakk G1/S üleminekuks ehk DNA sünteesiks (S) Cln1,2 ja Clb5,6 tsükliinide abiga. Järgnev tsütokinees

(G2/M, keskmine joonega piiratud ala) on reguleeritud Clb2 tsükliini poolt. Mitoosi (M) järel siirduvad tütar ja emarakk uue rakutsükli algusesse (G1, parempoolne joonega piiratud ala) (Joonis Morgan, 2007 baasil).

1.3 CDK aktiivsuse ja lokalisatsiooni regulatsioon

Lisaks tsükliinile vajab Cdk1 aktiveerimiseks oma pinnal ka teatud aminohapete fosforüleerimist. Selleks modifitseeritakse pagaripärmis katalüütilise tsentri kõrval T-lingul asuvat Thr169-t, mida fosforüleerib CDK-d aktiveeriv kinaas (CAK) (Morgan, 1997). Analooget inimese tsükliin A-Cdk2 fosforüleeritud ja fosforüleerimata treoniiniga kompleksi kristallstruktuurist on näha, kuidas modifitseeritud T-ling paljastab kinaasil substraati siduva tasku ning muudab ATP sidumise eest vastutavate aminohapete konformatsiooni (Russo, Jeffrey *et al.*, 1996).

Cdk1 reguleeritakse ka negatiivselt. Selleks fosforüleerib türosiinkinaas Swe1 Tyr19 ning inaktiveerib seeläbi CDK. Sama aminohapet defosforüleerib fosfataas Mih1 (Booher, Deshaies *et al.*, 1993). Mõlemad regulatoorsed valgud mängivad rolli mitoosi ajastamisel ja raku suuruse määramisel – Swe1 deletsioon põhjustab enneaegset mitoosi ja suurenenud rakke (Kellogg, 2003) ning Mih kaotamine kiirendab mitoosi saabumist ja vähendab rakkude suurust (Pal, Paraz, *et al.*, 2008). Swe1 poolne inhibitoorne fosforüleerimine mõjutab rakutsüklis tekkivaid tsükliin-Cdk1 komplekse erinevalt – G1 ja S-faasi tsükliinid on oluliselt nõrgemad substraadid Swe1-le, kui M-faasi tsükliinid (Hu ja Aparico, 2005). Swe1 on ise Clb1,2-Cdk1 substraat ning vajab aktivatsiooniks fosforüleerimist. See põhjustab M-faasi tsükliinide koguse suurenedes CDK negatiivset regulatsiooni läbi Swe1 aktiivsuse kasvu (Asano, Park *et al.*, 2005).

Kristallstruktuuranalüüsid inimese tsükliin A-Cdk2 struktuurist näitavad, et kompleksiks ühinemisel ei muutu tsükliini konformatsioon, küll aga tekivad muutused CDK aktiivsajad läbi PSTAIRE motiivi ja T-lingu omavaheliste interaktsioonide, mis aitavad kinaasi aktiveerida (Jeffrey, Russo *et al.*, 1995). Tsükliinide võime nii muuta CDK aktiivsust, kui ka võimendada substraatvalkudega seondumist annab talle kaks erinevat reguleerivat rolli, mida tsüklis mõlemat faktorit kompenseerides ära kasutatakse. Näiteks seob Clb5-Cdk1, mis on väiksema kinaasse aktiivsusega, oma substraatvalke väga tugevalt, samal ajal kui Clb1- ja Clb2-Cdk1 nii tugevalt substraatvalke ei seo. Clb1- ja Clb2-Cdk1 hoopis suurendavad kinaasi aktiivsust substraadide suhtes, kompenseerides üldise kompleksi aktiivsuse efekti. See annab rakutsükli lõpufaasides

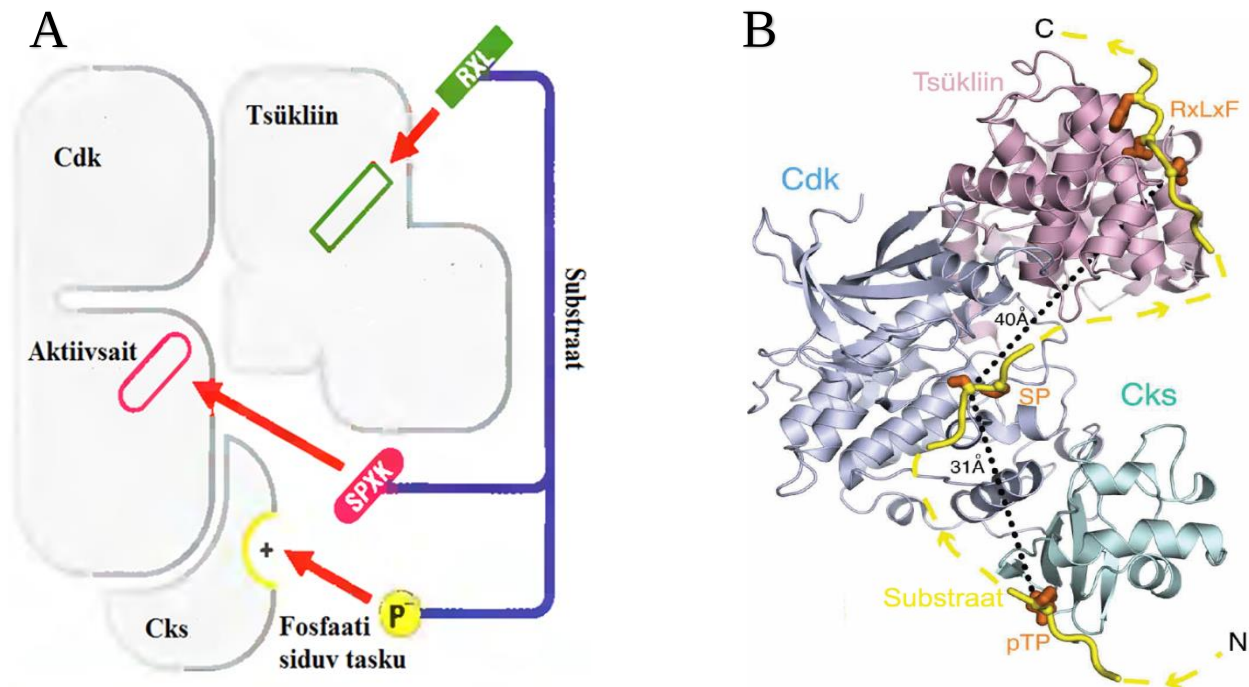
CDK-tsükliin kompleksidele madalama spetsiifilisuse ja laiema substraatide valiku (Kõivomägi *et al.*, 2011).

Cdk1 lokalisatsioon sõltub temaga seondunud tsükliinidest. Pagaripärmis toimub näiteks Cln2 ja Cln3-e paigutamine erinevatesse raku osadesse (Miller ja Cross, 2000) – Cln2 on peamiselt tsütoplasmaatiline, kuid osaliselt leidub seda ka tuumas. Täpne paiknemine sõltub valguga enda fosforüleeritusest. Näiteks Cln2 mutant, kus kõik seitse fosfosaiti olid alaniinideks muudetud, suurendas selle kohalolu tuumas. Erinevat Cln2-st, on Cln3 C-terminaalses osas tuumalokalisatsioonijärjestus (NLS), mille tõttu asetseb see valk eksklusiivselt tuumas. NLS-järjestuse eemaldamisel jääb Cln3 peale translatsiooni tsütoplasmasse (Miller ja Cross, 2001).

Mitootilistel tsükliinidel on kõigil sarnane lokalisatsioon – nad asuvad suuremal määral tuumas, kuid väike tsütoplasmaatiline kohalolu jääb neil alles, mis viitab nende tsükliin-CDK komplekside rollile ja sihtmärkidele ka tsütoplasmas, näiteks pungumise protsessi regulatsioonis (Bailly, Cabantous *et al.*, 2003). Tsükliin-CDK kompleksi lokalisatsioon võib sõltuda ka keskkonnast ja seondunud inhibiitoritest, näiteks suudab Sic1 mõjutada tsükliin-CDK paigutumist rakus: Clb-Cdk1-Sic1 kompleksid akumulereuvad oluliselt rohkem tsütoplasmas kui neid glükoosi asemel etanoolis kasvatada (Rossi, Zinzalla *et al.*, 2005).

1.4 Tsükliin-Cdk1-Cks1 komplekside substraadispetsiifilisus

CDK-d on proliini poolt suunatud seriini/treoniini kinaasid, mille konformatsioon muutub ja kinaas aktiveerub tsükliiniga seondumisel (De Bondt, Rosenblatt *et al.*, 1993) ning võimaldab sellel fosforüleerida substraatides optimaalseid saite aminohappelise järjestusega S/T-P-x-K/R (joonis 2) või suboptimaalseid saite S/T-P, kus x on suvaline aminohape ning S/T on fosforüleeritav hüdroksüülrühmaga aminohape seriin või treoniin (Songyang, Blechner *et al.* 1994). Kuigi CDK aktiivsus sõltub tema kompleksist tsükliiniga, siis hoitakse näiteks *S. cerevisiae*-s Cdk1 enda ekspressiooni konstantsena ja tsükliinidest suuremas molaarses kontsentratsioonis (Mendenhall, Jones *et al.*, 1987). Seetõttu ei peeta väga oluliseks Cdk1 transkriptsiooni ja translatsiooni, sest selle peamine kontroll toimub tsükliini sidumise ja posttranslatsioonaalsete modifikatsioonide tasemel (Mendenhall ja Hodge, 1998).



Joonis 2. Tsükliin-CDK-Cks kompleks substraadiga. Näitatud skemaatiliselt (A) ning heeliksling struktuurmodelit (B) kasutades. Substraadid seonduvad kompleksiga peamiselt kolmest kohast – tsükliini seondumismotiividega läbi RxL-i, kinaasi aktiivsaidiga läbi S/T P(x K/L)-i ning Cks katioonse taskuga läbi fosforüleeritud treoniini. (Joonis Morgan, 2007 baasil (A) ning Dr. Seth Rubini poolt tehtud (B)).

Tsükliin-CDK komplekside sihtmärgivalik on sõltuv mitmest faktorist. Esiteks on seondumiseks oluline konsensusjärjestus: Cdk1 fosforüleerib substraadis seriini või treoniini ning on suunatud nendest aminohapetest +1 positsioonis oleva proliini poolt. Konsensusjärjestuse muudab suboptimaalsest optimaalseks +3 positsioonis asetsev positiivne aminohape – kas lüsiin või arginiin (Nigg, 1993). Kuigi enamasti loetakse valkudes olulisemaks just struktureeritud osasid, mis erinevaid funktsioone omavad ning millest on võimalik kristallstruktuure moodustada, asuvad kinaasi sihtmärgid just valkude struktureerimata ning enamasti vähe konserveerunud alades (Moses, Heriche *et al.*, 2007).

Teine võimalik seondumine substraadi ja kompleksi vahel toimub tsükliini pinnal, kus näiteks B-tüüpi tsükliinides asuv konserveerunud Met-Arg-Ala-Ile-Leu (MRAIL) järjestus seondub substraadides Arg-x-Leu-Φ (RxL) järjestustega (joonis 2), kus x on suvaline ning Φ suur hüdrofoobne aminohape. Sellise RxL motiivi olemasolu suurendab oluliselt kompleksi ja

substraatide vahelist fosforüleerimist afiinsuse kasvu tõttu (Schulman, Lindstrom *et al.*, 1998). Analoogselt B-tüüpi tsükliinidega on ka G1-tsükliinide pinnalt leitud hüdrofoobseid alasid, mis seonduvad substraatides Leu-Leu-Pro-Pro (LLPP) järjestustega, suurendades nende komplekside ja faasispetsiifiliste substraatide vahelist seondumist. Osadel juhtudel asuvad substraatides tsükliin-spetsiifilised seondumismotiivid mitme erineva kompleksi jaoks. Näiteks Clb5-Cdk1 inhibiitoris, mida fosforüleerivad nii Cln2- ja Clb5-Cdk1, on neli RxL järjestust ning üks LLPP seondumismotiiv. Mutatsioonid nii tsükliini HP- kui ka substraadi RxL/LLPP alades mõjutavad tsükliini-Cdk1 ja Sic1 vahelisi interaktsioone ning nendest tulevalt Sic1 fosforüleerimist ja viimase võimet inhibeerida Clb5-Cdk1 aktiivsust (Koivomägi, Valk *et al.*, 2011).

Pärmi fosfo-adaptor subühik Cks1 mõjutab substraatidega seondumist ja nende multifosforüleerimist läbi tema fosfaati-siduva tasku, mis koosneb konserveerunud aminohapetest Arg33, Arg42, Ser82, Trp85 ning Arg102. Kuigi ühe aminohappeline mutatsioonalaniiniks selle tasku positsioonis 102 võimaldab rakkudel veel elada, siis kolmikmutant R33E, S82E, R102A puhul rakud eluvõimet ei säilita. Mutantne Cks1 on aga endiselt võimeline Cdk1-ga seonduma, kuid häiritud fosfaati siduv tasku viitab rakkudes Cks1 olulisele rollile nii Cdk1-ga kui ka fosforüleeritud substraatidega seodumisel (Bourne, Watson *et al.*, 2000). Cks1 roll sõltub tsükliin-CDK-Cks1 kompleksiga seondunud substraatidest ja nende spetsiifilisusest Cdk1 suhtes, näiteks mõjutab mutantne Cks1 oluliselt Clb5-Cdk1-ga kompleksis olles Sic1 Δ C ning Far1 multifosforüleerimist, kuid ei mõjuta näiteks Orc6 ja Sld2 Δ C multifosforüleerimist. Cks1 võime substraatides multifosforüleerimist indutseerida sõltub ka kompleksis tsükliinist. Näiteks on Swi5 multifosforüleerimine Clb5-Cdk1-Cks1 kompleksi poolt oluliselt rohkem funktsionaalsest Cks1-st sõltuv kui Cln2-Cdk1-Cks1 poolt. Katsed substraatidega, milles puuduvad fosforüleeritavad treoniinid või substraatidega, milles treoniinid on muudetud seriinideks, ei ole multifosforüleeritavad kinaasi poolt. See viitab Cks1 võimele siduda ainult fosfo-treoniine, kuid mitte fosforüleeritud seriine (Koivomägi *et al.*, 2013).

1.5 B-tüüpi tsükliinide struktuur ja Clb5

Clb5 on pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*) sünteesitav 50,4 kDa molekulmassiga S-faasi B-tüüpi tsükliin mis koosneb 435st aminohappest. B-tüüpi tsükliinide perekonnast erinevad pärmis kõige rohkem S-faasi valla päästvad valgud Clb5 ja Clb6, olles sarnased peamiselt C-terminaalses alas. Omavahel on need kaks valku 50% ulatuses sarnased, kuid erinevad näiteks mitootilise *destruction box* lagundamisjärjestuse olemasolus, mis puudub Clb6-s, kuid aitab kaasa Clb5 lagundamisele anafaasis (Epstein, Cross et al., 1992).

Clb5 ja 6 ekspresseeritakse koos Cln1 ja 2-ga, kuid neid hoitakse inhibeeritult kompleksis Sic1'ga kuni rakk on jõudnud piisavalt kasvada. Clb5 üleekspressioon kompenseerib letaalse Cln1Δ Cln2Δ Cln3Δ fenotüübi, olles ainus taolise omadusega pagaripärmi B-tüüpi tsükliin (Schwob ja Nasmyth, 1993). See viitab ka osalisele G1 ning B-tüüpi tsükliinide funktsionaalsele kattuvusele.

Clb5-Cdk1 osaleb DNA replikatsiooni reguleerimisel mitmel viisil. Esiteks algatab Clb5-Cdk1 replikatsiooni alustamiseks vajaliku signaleerimiskaskaadi, fosforüleerides Sld2, mis vabastab valgu konformatsiooni muutes selle 84. positsioonis asuva treoniini. Selle fosforüleerimise tõttu moodustub Sld2-Sld3-Dbp11 kompleks, mis aitab kaasa prereplikatiivse kompleksi moodustumisele (Tanaka, Umemori, et al., 2007). Lisaks toimub peale DNA replikatsiooni alguspunktide ühekordset aktiveerimist rereplikatsiooni vältimiseks Clb5-Cdk1 poolne Cdc6 fosforüleerimine ning selle eemaldamine replikatsioonialguspunktidest ja sellele järgnev valgu ubkivitinüleerimine ning degradatsioon (Piatti, Lengauer et al., 1995).

Clb5 valgujärjestuses asub sarnaselt teiste B-tüüpi umbes 100 aminohappeline konserveerunud kahest motiivist koosnev tsükliini volt (i.k. (i.k. *cyclin fold*) Mõlemad domeenid sisaldavad viite heeliksi, millest esimesed 5 moodustavad tsükliini motiivi (i.k. *cyclin box*), mida on vaja CDK-ga seondumiseks ja selle aktivatsiooniks. Väljaspool tsükliini volti kattuvad tsükliinide järjestused oluliselt vähem ning kõige varieeruvam on N-terminaalne osa ning selle pikkus, sisaldades mitmeid reguloorseid osasid – näiteks lagundamise- või tuumalokalisatsioonisignaale (Noble et al., 1997).

Erinevalt Clb6-st, mis degradeeritakse peale G1/S-faasi selle N-terminaalses järjestuses asuvate järjestuste tõttu SCF^{Cdc4} poolt, jääb Clb5 stabiilseks kuni mitoosini, kus see APC^{Cdc20} anafaasi-promoveeriva kompleksi poolt degradeeritakse. Degradimisjärjestuse erinevus RXXL-ist Clb5-

s KXXL järjestuseks Clb6-ks määrab vastavalt kas APC või SCF poolse kompleksi poolse degradatsiooni (Jackson, Reed et al., 2006).

1.6 Clb-Cdk1 inhibiitor Sic1

Sic1 on Clb-Cdk1 komplekside inhibiitor, mis reguleerib rakutsükli kulgemist G1/S ning ka M/G1 üleminekul. *SIC1* lugemisraam kodeerib 284 aminohappelist 32,2 kDa hüdrofoobset valku, mida liigitatakse olemuslikult struktuuritute (IDP – i.k. intrinsically disordered protein) hulka, kuigi tema C-terminaalne osa on veidi rohkem struktuurne, kui valgu N-terminus (Brocca, Samalikova et al., 2009). Sic1 järjestuses asub 9 Cdk1 konsensus fosforülatsiooni saiti, millest 7 asuvad valgu N-terminaalses osas esimese 81 aminohappe sees (Joonis 3).



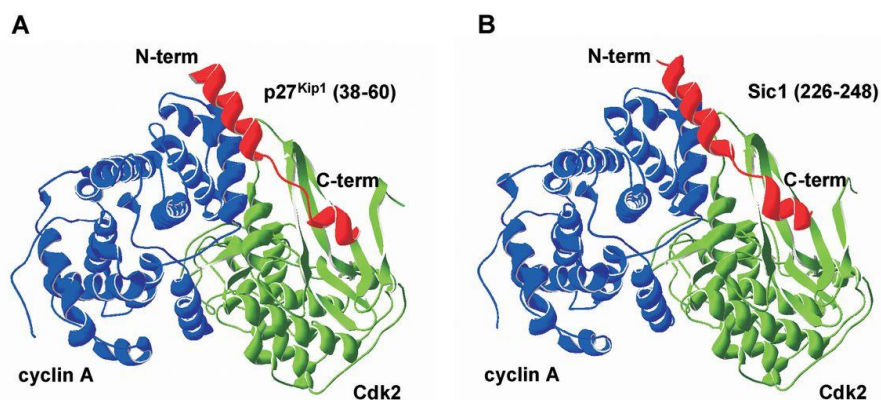
Joonis 3. Sic1 valgu primaarstruktuuri järjestus. Sic1 aminohappelise järjestuse diagramm koos Cdk1 S/T fosforüleerimissaitidega, nelja RxL ja ühe VLLPP seondumismotiiviga ning Cdk1-tsükliin-kompleksi inhibeeriva domeeniga. Violetsete ringidega on näidatud Sic1-s leiduvad difosfodegronid.

Sic1 transkriptsioon algab mitoosi lõpus ning valgu hulk kasvab kuni G1 faasi lõpuni, kus tsükliin-Cdk1 kompleksid seda kiiresti fosforüleerivad ning kiiresti ubivitiin-sõltuvatesse lagundamisradadesse suunavad. *SIC1* transkriptsioon sõltub peamiselt Swi5-st ning ka Ace2-st. Swi5 fosforüleerimine ja inaktiveerimine Clb2-Cdk1 poolt mitoosis põhjustab selle jäämist tsütoplasmasse ning peale mitootiliste tsükliinide aktiivsuse langemist M-faasi lõpus liigub Swi5 uuesti tuuma, kus lisaks Sic1 transkriptsiooni aktiveerimisele toimub tekkinud Sic1 sidumine veel alles jäänud Clb2-Cdk1-ga vähendades Swi5 fosforüleerimist ja tuumast välja viimist veelgi ja põhjustades nii positiivse tagasiside tõttu lisandunud Sic1 transkriptsiooni. (Visintin, Craig et al., 1998).

Üks peamiseid Sic1 rolle rakutsükliks on inhibeerida Clb5 ning Clb6 piisavalt kaua, et G1 faasis oleks periood ilma Clb aktiivsusega, kus oleks võimalik kasvada ja DNA replikatsiooniks valmistuda. Sic1Δ rakkudes S-faas pikeneb ning genoomne ebastabiilsus suureneb, sest DNA

süntees hakkab pihta enneaegselt ning väiksemalt arvult replikatsiooni alguspunktidelt. Replikatsioonikahvlid peavad sünteesima oluliselt pikemaid DNA-lõike ja tõenäosus replikatsioonimasinavärgi dissotsieerumiseks DNA küljest enne protsessi lõpetamist suureneb, mis põhjustab kromosoomide katkiminekut või sootuks nende kadu. (Legronne ja Schwob, 2002).

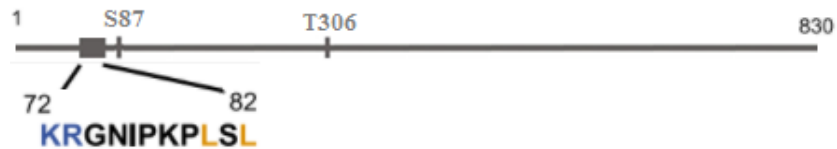
Sic1 spetsiifiline molekulaarne mehhanism, millega see Clb-Cdk1 komplekse inhibeerib, on suures osas kaardistamata. Peamiseks arvatavaks viisiks on Cdk1 aktiivsaidis juurdepääsu takistamine teistele substraatidele. Sic1 funktsionaalseks homoloogiks peetakse imetajate tsükliinsõltuva kinaasi inhibiitorit p21^{Kip1}, millel on omakorda sarnasus p27^{Cip1}-ga. Imetajates rakutsükli S-faasi käivitumine on sõltuv tsükliin A-Cdk2 kompleksist, millest on tehtud koos p27^{Kip1} inhibitoorse osaga ka kristallstruktuuranalüüs. Sealt ilmneb, et inhibiitori N-terminaalne osa seondub tsükliin A-Cdk2 pinnaga läbi hüdrofoobsete kontaktide nii tsükliinil kui ka kinaasil. Esmalt toimub seondumine substraate siduva osaga tsükliinil ning järgnevalt Cdk2 N-terminaalse osaga, kus inhibiitor siseneb ka ATP-d siduvasse aktiivsaiti (Russo, Jeffrey, *et al.*, 1996). Kuna pärmi Sic1 seondub sarnaselt ka imetaja tsükliin A-Cdk2 kompleksiga (joonis 4.) (Barberis, De Gioia *et al.*, 2005) annab see alust eeldada, et ka pärmis toimub Clb5-Cdk1 kinaasi inhibeerimine Sic1 poolt sarnastel mehhanismidel.



Joonis 4. Homoloogilise modelleerimisega saadud tsükliin A-Cdk2-p27^{Kip1}/Sic1 võrdlus. Kahe struktuuri analüüs näitab, et Tsükliin A-Cdk2 kompleksile seondunud p27^{Kip1} (A) ning Sic1 (B) inhibitoorsed alad seovad tsükliin-CDK-s sarnaseid piirkondi. (Joonis Barberis, De Gioia *et al.*, 2005 põhjal).

1.7 Tsükliin-Cdk1 inhibiitor Far1

Pagaripärmis asuv Cdk1 inhibiitor Far1 vastutab rakus toimuva rakutsükli seiskamise eest peale ristamisferomooni seondumist transmembraansele G valguga seondunud retseptorile. Peale signaleerimiskaskaadi seondub Far1 Cln-Cdk1 kompleksidega (Valtz, Peter *et al.*, 1995). Far1 funktsioneerib peamiselt ainult G1 faasis, peale mida kontrollitakse selle ekspressiooni nii transkriptsionaalselt kui ka posttranslatsionaalsete modifikatsioonide teel (Elion, Sattenberg *et al.*, 1993).



Joonis 5. Far1 valgu järjestus. Far1 kahe fosfosaidi T306 ja S87 ning Fus3 seondumissaidiga. Läbi T306 fosforüleerimise aktiveerib Fus3 valku, kinnitades enne selle R/Kxxxx(xx)LxL MAPK seondumismotiiviga. Läbi S87 fosforüleerimise Tsükliin-CDK-Cks komplekside poolt toimub Far1 suunamine degradatsiooniradadesse.

Enamus Far1 valgust asub tuumas, kus seda rakutsükli arrestiks vaja on, kuid pidevalt toimub ka selle transport tsütoplasmasse, kus Far1 aitab kaasa polariseeritud kasvule sõltuvalt alfa-faktori kontsentratsioonist (Blondel, Alepuz *et al.*, 1999). Peale feromooni tundmist, kasvab Far1 transkriptsioon märgatavalt ning toimub Far1 Thr306 fosforüleerimine Fus3 poolt, mis on peale rakumembraaniretseptorile seondunud alfa-faktori tõttu alanud signaleerimiskaskaadi MAPK viimane kinaas (Gartner, Jovanovic *et al.*, 1998). Far1 fosforüleerimine 306. positsioonis Fus3 poolt toimub mitogeeni poolt aktiveeritava proteiinkinaasi (MAPK) seondumismotiivi R/Kxxxx(xx)LxL tõttu Far1-s (Joonis 5.). Fosforüleeritud Far1 on võimeline inhibeerima nii Cln2-Cdk1 komplekse tavalistes tingimustes, kui ka Clb-Cdk1 komplekse situatsioonides, kus Far1 ekspressiooni indutseeritakse kunstlikult koos feromooni kontsentratsiooni tõstmisega peale G1 faasi (McKinney ja Cross, 1995).

Isegi peale Far1 poolset seondumist ja Cln-Cdk1 komplekside inhibitsiooni, jääb neil alles võime fosforüleerida Far1-te, mille degradeerimine toimub Cln-Cdk1 poolse Ser87 fosforüleerimise tõttu, mille tõttu valk ubiquitinüleeritakse ja degradeerimisradadesse suunatakse. Far1 ja Cln-Cdk1 vahel toimib seetõttu topelt-negatiivne tagasiside, kus rakk valib kas mitoosi või ristumise vahel teise

pärmirakuga ning puudub mingisuguse vahepealse seisundi võimalus (Doncic, Falleur-Fetting *et al.*, 2011).

Üheks potentsiaalseks mehhanismiks, kuidas MAPK poolne fosforüermine võib mõjutada tsükliin-CDK-Cks substraatide degradeerivatesse radadesse suunavat fosforüerimist eemale toimib läbi diversiooni põhimõtte. Sellistel juhtudel fosforüeerib näiteks Fus3 Far1-te ning tsükliin-Cdk1 kompleksides asuv Cks1 seondub fosforüeeritud T306aminohappega, juhtides seda eemale degradeerimist põhjustava S87 fosforüermisest (Valk *et al.*, 2014).

1.8 Tsükliin-Cdk1 substraat Kar9

Kar9 on mitte-essentsiaalne 74-kDa valk, mis osaleb tuumamigratsioonis ning tsütoplasmaatiliste mikrotuubulite orientatsiooni määramisel, mis on olulised asümmeetrilise rakujagunemise korrektseks toimumiseks. Kar9 liidab ühe käävikehaga seondunud tsütoplasmaatilised mikrotuubulid punga polariseeritud aktiinivõrgustikuga ning suunab ühe käävikeha moodustuva tütaraku poole (Moore *et al.*, 2007).

Kar9 fosforüeeritakse lisaks Dbf2/Dbf20-le ka Cdk1 poolt, mis takistab selle laadimist vana käävipooluse tsütoplasmaatilistele mikrotuubulitele, et võimaldada samaaegset käävide joondumist ema- ja tütarakkude teljega (Hotz *et al.*, 2012). Kar9 sisaldab kahte fosfosaiti – seriin 496 fosforüerimine võimaldab valgu laadimist ühele käävikehale ning fosfomimeetiline mutatsioon selles saidis võimaldab kar9 seondumist ka ilma Clb5 ning Bik1 kohaloluta. Clb4-Cdk1 fosforüeerib Kar9 pinnal seriini positsioonis 197, mis võimaldab sellel tsütoplasmaatilised mikrotuubulid punga juurde suunata (Moore *et al.*, 2007). Clb4 ja Clb5 deleteerimised mängivad rolli korrektse Kar9 seondumises ühe käävikehaga, mõlema geeni puudumisel on märgata Kar9 seondumist mõlema käävikehaga (Liakopoulos *et al.*, 2003).

Kar9 laadimist tsütoplasmaatilistele mikrotuubulitele medieerivad kaks mikrotuubulitega seondunud valku – Bim1 ning Bik1. Endogeense Kar9 ekspressioonitaseme juures ning Bim1 puudumisel ei ole käävikehade juures Kar9 valk tuvastatav, sest Bim1 on vajalik selle seondamiseks käävikehadega (Liakopoulos *et al.*, 2003). Kuigi Bik1 ei ole vaja Kar9 seondumiseks mikrotuubulitega, mängib see olulist rolli Kar9 asümmeetrias, piirates selle seondumist ainult ühe käävikehaga (Moore *et al.*, 2006).

1.9 Sünteetilised võrgustikud elusrakkudes

Sünteetilise bioloogia üheks eesmärgiks on muuta ja manipuleerida rakus toimuvaid protsesse vastavalt sellele, mis on soovitatavad väljundid. Enamasti tehakse seda läbi geeniregulatsioonivõrgustike manipuleerimise, kus kindlate geneetiliste fragmentide või moodulite lisamisel on võimalik panna rakke täitma uudseid funktsioone. Rakkude manipuleerimise aluseks on suure koguse hästi kirjeldatud ja häälestatavate moodulite loomine, mida saab elusrakkudes üksteisega koos sünteetiliste võrgustike üles seadmiseks kasutada, mis võimaldavad omakorda modifitseerida raku metabolismi, tekitada vastuseid erinevatele keskkonnatingimustele või mõjutada raku arengut. Taoliste moodulite kasutamine võimaldab elusorganismide kasutamist bioloogiliste masinatena, mis oleks võimelised täitma suurt hulka kasulikke funktsioone (Kobayashi *et al.*, 2004).

Erinevalt DNA järjestusel baseeruvatest geeniregulatsioonivõrgustikest, ei ole rakkude manipuleerimiseks sünteetilisi fosforüleerimisvõrgustikke nii palju kasutatud, kuigi suurt osa valkusi fosforüleeritakse nii pärmi- kui ka inimese rakkudes, mis näitab elus süsteemid fosforüleerimise tähtsust reguleerijana. Üheks potentsiaalseks moodul-kompleksiks sünteetilise fosforüleerimisvõrgustiku loomisel oleks tsükliin-CDK-Cks kompleks, milles on hästi ära kirjeldatud Cks ning CDK seondumismotiivid ning tsükliini ja CDK ning Cks-i vahelised kaugused (Valk *et al.*, 2014). Üsna vähe on teada tsükliinil paikevatest seondumismotiividest ja sellest, kui palju neis teatud aminohapete muteerimine substraatide seondumist ning nende fosforüleerimist mõjutab. Tsükliini baasil stabiilse valguga loomine, mis kompleksis CDK ja Cks-iga ei seonduks oma tüüpiliste substraatidega olles eraldiseisev rakutsüklist, kuid säilitaks võime kinaasi aktiveerida annaks tööriista sünteetiliste fosforüleerimisvõrgustike loomiseks, kus uute sihtmärk-substraatide suhtes spetsiifiliste seondumismotiivide lisamisel oleks võimalik neid valke omal soovil modifitseerida.

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks on läbi B-tüüpi tsükliini Clb5 pinnal olevate aminohapete muteerimise hinnata:

1. Millised aminohapped mõjutavad seondumist:
 - a. Sic1 ja Sic1 Δ C-ga
 - b. Far1 Δ C-ga
 - c. Kar9-ga
2. Vastavate tulemuste põhjal hinnata, millised seondumismotiivid mängivad suuremat rolli erinevate substraatidega seondumisel ning milliseid neist oleks tulevikus võimalik kasutada kunstlikes fosforüleerimisradades, kus subtraadi ja ensüümi vahelise seondumise eripärade baasil oleks võimalik luua modifitseeritud tsükliinid, mis kinaasiga seondumisel võimaldaks fosforüleerida suunatult ja spetsiifiliselt substraatvalkusid.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Tüved, söötmed ja plaadid

Antud töös loodud Clb5 mutantide kloneerimisel kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α (supE44, Δ lacU169(Φ lacZ Δ M15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1). Clb5 plasmiidide tegemiseks insertide ja vektorite rekombinatsiooni abil kasutati pärmitüve DOM90 (MATa {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1::hisG}[phi+]). Valkude puhastamiseks kasutati pärmitüvesid DOM68 (MATa {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1::hisG, sic1 Δ ::LEU2}[phi+]) ning DOM69 (MATa {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1::hisG, sic1 Δ ::LEU2, cdc28-as1}[phi+]), kuhu enne olid transformeeritud erinevate Clb5 variantidega pRSAB1234 plasmiidid. DOM tüved olid kingitused David Owen Morgani laborist. Substraatide Sic1 ja Sic1 Δ C transformatsiooniks ja puhastamiseks kasutati BL21-CodonPlus(DE3)-RP (*E. coli* B, F-, ompT, hsdS(rB-,mB-), dcm+, Tetr, gal, λ (DE3), endA, Hte, [argU proLCamr]) rakke.

E. coli DH5 α ning BL-21 bakterirakke kasvatati Luria Bertani (LB) söötmes (5 g/l pärmiekstrakti ja 10g/l baktotrüptooni ning 10 g/l NaCl), kuhu lisati selektsiooniks DH5 α rakkudele 100 μ g/ml ampillitsiini (LB+Amp) või BL-21 rakkudele 100 μ g/ml kanamütsiini ja 50 μ g/ml klooramfenikooli (LB+Km+Cam). Pärmitüve DOM90 kasvatati pärmiekstrakti peptooni glükoosi (YPD) (i.k. *yeast extract peptone dextrose*) söötmel (20 g/l peptoon, 10 g/l pärmiekstrakti, 20 g/l glükoosi ning valkude puhastamiseks kasvatati DOM68 ning DOM69 tüvesid CSM-Ura (i.k. *complete synthetic media without uracil*) söötmes (1,9 g/l CSM-Ura pulbrit, 70g/l pärmi lämmastiku alust, 2% rafinoosi). Transformeeritud DOM90 tüvesid kasvatati CSM-Ura söötmel koos 2% glükoosiga. Plaatide kasutamisel lisati ära mainitud söötmetele 1% agaroosi.

2.2.2. Konstruktide tegemine PCR-iga

Clb5 mutantide valmistamiseks kasutati pRSAB1234 vektorit, kuhu oli galaktoosi poolt indutseeritava promootori kontrolli alla koos N-terminaalse tandem-afiinsus puhastamise (TAP) märgisega kloneeritud Clb5wt, millelt amplifitseeriti esimeses polümeraas ahelreaktsiooni (PCR) etapis ühe mutantse Clb5 tegemiseks kaks fragmenti - üks Clb5 N-terminaalsest osast kuni mutatsioonini ning teine Clb5 C-terminaalsest osast mutatsioonini, mis andis kaks fragmenti, millel

oli nii homoloogne osa omavahel, kui ka homoloogne osa vektori galaktoosi promootori ja TAP-märgisega. Teises PCR etapis liideti kaks fragmenti, mille tulemuseks oli täispikk mutantne Clb5 homoloogsete aladega vektori suhtes.

PCR reaktsioonid viidi läbi 40 µl mahus, mis sisaldas 1x *Phusion*TM *High Fidelity* puhvrit, 250 µM nNTP-sid, 1 u *Phusion*TM polümeraasi, 250 pM praimereid ning 20 ng matriits DNA-d, milleks esimeses PCR etapis oli pRSAB1234 plasmiid Clb5wt inserdiga ning teises etapis eelnevast saadud fragmendid. Reaktsioon viidi läbi AeriTM Esco PCR masinas sulamistemperatuuril (T_m) vastavalt praimerite seondumistemperatuuridele ning 30 tsükli juures elongatsiooniga 72°C juures vastavalt eeldatava fragmendi pikkusele. Teises PCR etapis lisati oligonukleotiidid segusse peale kolme PCR tsükli toimumist.

Esimese ja teise PCR reaktsiooni produktidele lisati 6x *Orange DNA Loading Dye*, laeti 1% agarosgeelile, millele oli lisatud 0,3 µg/ml etiidiumbromiidi ning jooksutati geelelektroforeesil BioRad Sub-Cell GT vannis Amersham Biosciences elektroforeesi EPS 601 toiteallikaga. Geelist lõigati välja 1. PCR reaktsioonis ühe Clb5 inserdi kohta 2 fragmenti – selle N- ja C-terminaalne osa ning 2. PCR reaktsioonis ühendatud fragmentidest tekkinud täispikk mutatsiooniga tsükliini fragment. Kokku valmistati sellel meetodil 13 erinevat Clb5 fragmenti – 10 mutantset Clb5 ning üks Clb5wt. Fragmendid puhastati geelist Favorgen geelipuhastuskomplektiga. Geelitükke inkubeeriti 54°C juures FADH lahuses 15min ning vortex-iti selle aja jooksul 2 korda. Järgnevalt pipeteeriti proovid FADF kolonni, mis asetati 2 ml kogumistuubi ja Eppendorf 5215D tsentrifuugiti 13000 rpm 1 min. Kolonne pesti kaks korda 700 µl pesemispuhvriga, tsentrifuugides mõlemal korral 30 sekundit 13000 rpm-il ning kolonnid kuivatati samadel pööretel 3 minutit. Kolonnid viidi uuesti 1,5ml Eppendorf tuubidesse ning DNA elueeriti 40 µl elueerimispuhvril 13000 rpm-il 2 minutiga.

2.2.3. PCR produkti ja vektori transformatsioon pärmi

Sobivate restriksioonisaite puudumise tõttu transformeeriti Clb5 PCR produktid koos lineariseeritud pRSAB1234 vektoritega pärmi, kus pämirakk need fragmendid homoloogsete alade ja rekombinatsiooni abil plasmiidiks kokku pani. Transformatsiooniks kasvatati w303-l baseeruvat tüve DOM90 YPD vedelsöötmel 50 ml-is kuni OD₆₀₀ = 0,8 ning rakusade tsentrifuugiti 50 ml Falcon tuubis 4000 rpm 1 min jooksul põhja. Sööde eemaldati ning sellele lisati 1 ml 10 mM

Tris, 1 mM EDTA, 100 mM LiOAc (TE/LiOAc) ning peale nende suspendeerimist viidi 1,5 ml Eppendorf tuubi. Suspensioonid tsentrifuugiti Eppendorf 5415D tsentrifuugis 4200 rpm 1 min, peale mida eemaldati TE/LiOAc ning lisati kahekordne rakusademe kogus TE/LiOAc lahust ning rakususpensioonil hoiti toatemperatuuril 10 min. Samaaegselt kuumutati üheaahelalist DNA-d 10 min 100 °C juures ning viidi jäävannile. Uutesse 1,5 ml Eppendorf tuubidesse pipeteeriti kokku 2 µl (50 ng/ µl lineariseeritud pRSAB1234 vektorit ning 10 µl (40 ng/µl) PCR protsessist saadud Clb5 inserti, millele lisati 100 µl TE/LiOAc-s rakususpensiooni, 700 µl PEG/TE/LiOAc (40% PEG, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM LiOAc) ning 48 µl DMSO-d. Suspensioon viidi 42 °C juurde inkubeerima 30-ks minutiks, peale mida rakusade põhja fuugiti 6000 rpm juures 1min, eemaldati supernatant ning lisati 1 ml TE lahust, suspendeeriti ning rakusade fuugiti uuesti põhja 4200 rpm juures 1 min, peale mida eemaldati uuesti supernatant, lisati 200 µl TE lahust ning plaaditi –URA glükoosiga agarosplaatidele ning asetati 30 °C inkubaatorisse umbes kaheks päevaks, kuni tekkisid kolooniad.

2.2.4. Pärmist plasmiidide eraldamine ja transformatsioon bakterirakkudesse

Transformatsioonist saadud pärmikolooniad inokuleeriti CSM-Ura vedelsöötmesse koos 2% glükoosiga ning kasvatati OD₆₀₀=1,0-ni. Kultuurid pipeteeriti 2 ml Eppendorf tuubidesse ning tsentrifuugiti 5415D masinal põhja 4200 rpm juures 5 min. Rakkusadet pesti 0,5 ml ddH₂O-ga ning tsentrifuugiti uuesti samadel parameetritel põhja ning resuspendeeriti 200 µl TSENT puhvris (2% Triton X-100, 1% SDS, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0), millele lisati 200 µl silikaatkuulikesi ning tõmbekapi all 100 µl fenooli, 96 µl kloroformi ning 4 µl isoamüülalkoholi, mida vortexiti Fastprep®-24 homogenisaatoris 20 sekundit 5 m/s. Segu tsentrifuugiti Eppendorf 5415D-s 13000 rpm juures 5 min ning ülemine vesifaas tõsteti uutesse 1,5 ml tuubidesse, kuhu lisati 1ml -20 °C 96% etanooli, vortexiti ning tsentrifuugiti 13000 pöörde ja 4 °C juures Thermo Scientific MicroCL 21R masinas 5 min. Supernatant eemaldati ning sade võeti üles 50 µl TE-s.

E. coli DH5α rakkudesse transformeeriti saadud 12 mutantset ning üks Clb5wt pRSAB1234 plasmiidi. BL21 rakkudesse transformeeriti plasmiidid substraatide Sic1 täispika versiooniga ning Sic1 selle C-terminaalse Clb-Cdk1 inhibeeriva alata (Sic1ΔC) (Sic1 plasmiidid saadud Rainis Ventalt).

Kompetentsed *E. coli* rakud asetati jäävannile ning lasti neil sulada 10 min. Transformeerimiseks pipeteeriti 1,5 ml tuubi 50 µl rakke ning 2 µl plasmiidilahust, mida hoiti jääl 30min ning tehti kuumašokk DH5α puhul 2 min ning BL-21 puhul 45 s 42 °C termostaadil. Rakud tõsteti 2 minutiks jääle, lisati 700 µl LB söödet ning kasvatati ~60min 37 °C juures loksutil. Rakud tsentrifuugiti põhja 5415D masinas 4200 rpm-il, eemaldati 600 µl söödet ning plaaditi ~150 µl rakususpensiooni LB+Amp (DH5α) või LB+Km+Cam (BL-21) selektsiooniplaatidele ning asetati 37 °C inkubaatorisse kuni kolooniate tekkimiseni.

2.2.5. Plasmiidide eraldamine DH5α rakkudest ja transformatsioon pärmi Sic1 deletsioonitüvedesse

Bakterirakkudes paljundati plasmide, sest pämirakkudest eraldatud plasmiidide kontsentratsioon oli väike ning sisaldas puhastusprotsessist tulenevaid ebapuhtuseid.

Transformeeritud *E. coli* rakud pandi üleöö 3 ml LB+Amp vedelsöötmesse kasvama. Rakud fuugiti 1,5 ml Eppendorfi tuubides 5415D masinas põhja ning eemaldati supernatant. Eralduseks kasutati Favorgen plasmidse DNA eraldamise komplekti. Rakusademele lisati 200 µl FAPD1 suspensioonipuhvrit, 200 µl FAPD2 lüüsipuhvrit ning keerati 5 korda ja lasti 2 min laual istuda. Seejärel lisati 300 µl FAPD3 neutralisatsioonipuhvrit, keerati 5 korda ning tsentrifuugiti 13000 rpm 5 min. Supernatant viidi FAPD kolonni, mis asetati 2 ml kogumistuubi, mida tsentrifuugiti 13000 rpm 1min. FAPD kolonnile lisati 400 µl W1 puhvrit, tsentrifuugiti 30 s 13000 rpm, lisati 700 µl pesemispuhvrit, tsentrifuugiti 30 s ning kuivatati kolonn 13000 rpm juures 3min. FAPD kolonnid asetati 1,5 ml Eppendorf tuubidesse ning elueeriti kolonni kinni jäänud DNA 50 µl elueerimispuhvriga fuugides 2 min 13000 rpm. DNA kontsentratsiooni ja puhtust kontrolliti nanodropil, viidi läbi restriksioonikontroll NheI/SacI ensüümidega (5 U mõlemat ensüümi), mille käigus veenduti inserdi olemasolus ning plasmiidid saadeti biokeskusesse sekveneerimisse, et veenduda tekitatud mutatsioonide olemasolus.

Sic1 deletsioonitüvedesse DOM68 10 mutantse Clb5- ning Clb5wt- ja DOM69-sse Clb5wt-prS1234 plasmiidide transformeerimiseks kasvatati neid tüvesid 50 ml-is CSM-Ura 2% glükoosis kuni OD600=0,8. Ülejäänud transformatsioon toimus vastavalt punktis 2.2.3 kirjeldatule, kuid transformeeriti 1 µl (~500 ng) plasmidi.

2.2.6. Western blot analüüs vektorite ekspressioonikontrolliks

Clb5 plasmiididega transformeeritud Sic deletsioonitüvede Western blot analüüsiks kasvatati 4-8 kolooniat igast mutantse Clb5 plasmiidiga transformeeritud tüvest 5 ml-is CSM-Ura koos 2% rafinoosiga kuni $OD_{600}=0,8$. Seejärel indutseeriti ekspressioon lisades 2% galaktoosi. Rakukultuurid fuugiti põhja 15 ml Falcon tuubides Eppendorf 5810R tsentrifuugis A-4-81 rootoriga 4000 rpm 2 min. Sööde eemaldati ning rakusademed külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80 juures või jätkati koheselt nendest valkude eraldamisega. Selleks lisati sademele jääl 200 μ l 7 M urea-lüsiipuhvrit (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 7 M urea, 2 M tiourea, 65 mM 3-[(3-kolamidopropüül)dimethüülammonio]-1-propaansulfonaat (CHAPS), 65 mM DTT, 1 mM PMSF, 180 μ g/ml Na_3VO_4 , 2,1 mg/ml NaF, 17,3 mg/ml β -glütserofostaat) ning tõsteti 1,5 tuubi. Segule lisati 200 μ l Silibead klaaskuule läbimõõduga 0,4–0,6 mm ja asetati Fastprep®-24 homogenisaatorisse 5 m/s 40 sekundiks. Tuube torgati põhjast kuumsteriliseeritud nõelaga ning asetati need uute 1,5 ml tuubide peale. Tuube tsentrifuugiti ~10-ks sekundiks ~2000 rpm juures, mille jooksul lüsaat alumistesse 1,5 ml tuubidesse valgus. Lüsaadiga tuube tsentrifuugiti 13000 rpm juures 10 min ning pealmine 100 μ l lüsaati viidi uutesse 1,5 ml tuubidesse. *Bradford* kontsentratsiooni järgi valkude koguse kalibreerimise etapp jäeti vahele, sest antud katses oli oluline ühe rakukultuuri valguekspressiooni olemasolu ja mitte ekspressioonitasemete võrdlemine. 12 μ l lüsaadile lisati 6 μ l 3x SDS ning pipeteeriti akrüülamiidgeelile, kus jooksutati Amersham Biosciences elektroforeesi EPS 601 toiteallikal 300 V ja 15 mA geeli kohta poolteist tundi 25 mM Tris, 192 mM glütsiin ning 0,1% SDS sisaldavas puhvril. Geeli loksutati 10 min *semi-dry* puhvril (5,8 g/l Tris, 2,9 g/l glütsiin, 0,37 g/l SDS, 20% metanool) ning valkude ülekandeks geelilt nitrotselluloosmembraanile kasutati Thermo Scientific PierceG2 fast blotterit, kuhu see mõlemalt poolelt kolme filterpaberi vahele koos nitrotselluloosmembraaniga pandi ning jooksutati 25 V ja 1 A 60 min. Membraan tõsteti blokeerimislahusesse (5% lõssipulber TBS-Tw puhvril (50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20)) ja loksutati aeglaselt 30 min. Korraaks pesti membraani TBS-Tw lahuses ning membraanile valati primaarse antikeha lahus (C-myc (A-14) sc-789 küüliku polükloonaalne IgG antikeha) (1:500) TBS-Tw puhvril koos 0,03% Na_3N -iga. Membraani pesti kolm korda TBS-Tw puhvril 15-5-5 min kiirelt loksutades. Membraanile valati TBS-Tw lahuses 3% lõssis koos küüliku IgG vastaste kitse antikehadega (1:7500) ning loksutati aeglaselt 30 min. Membraani pesti TBS-Tw puhvril kolm korda 15-5-5 min kiirelt loksutades.

Ilmutamiseks kasutati Supersignal West Pico detektsioonikomplekti, millest valati 800 µl kahe lahuse 1:1 segu kaante vahele kleebitud membraanile ning ilmutati see pimeruumis 45 sekundilise säriaajaga.

2.2.7. TAP-märgisega Clb5-Cks1 komplekside puhastamine

Tap-märgisega puhastati antud töös 12 Clb5 valku, nende seas Sic1 deletsioonitüves (DOM68) 10 mutantset Clb5 ja Clb5wt ning Sic1 deletsioonitüves koos CDK inhibiitori NP-PP-1 suhtes tundliku Cdk1as1-ga (tüves DOM69) Clb5wt. TAP-Clb5 valkude puhastamiseks kasvatati need tüved koos transformeeritud konstruktidega esmaselt 50ml –URA söötmel 2% rafinoosikontsentratsiooni juures üleöö temperatuuril 30 °C OD600=2,0 ning lahjendati 1 liitrisse –URA 2% rafinoos söötmesse OD600=0,1. Kultuurid kasvatati OD600=0,8 ning indutseeriti 2% galaktoosiga 3h. Kultuurid tsentrifuugiti esmaselt 400 ml Sorvalli tuubides Sorvall RC5B masinas Herolab A6.9 rootoriga 5000 rpm 10 min ning seejärel Eppendorf 5810R tsentrifuugis A-4-81 rootoriga 50 ml Falcon tuubides 4000 rpm 2 min. Sademed segati võrdses koguses TAP lüüsipuhvriga (Tabel x), mis sisaldas proteaasi inhibiitoreid (1µg/ml Leupeptiin, 1 µg/ml Pepstatiin, 1 µg/ml Aprotiniin ning 1mM PMSF) ning 5 ml pipetiga pipeteeriti vedelasse lämmastiku keradena, mis seejärel -80 °C juures säilitati.

Tabel 1. Valgu puhastamise protsessis kasutatud TAP lüüsipuhvril ja TEV lõikamise puhvril kasutatud reagentid ning nende kontsentratsioonid. Proteaaside inhibiitorid TAP Lüüsipuhvrilisse ning DTT TEV lõikamise puhvrilisse lisati vahetult enne puhvrite kasutamist.

TAP Lüüsipuhver	TEV lõikamise puhver
25 mM Hepes, pH 8,0	10 mM TRIS-HCl, pH 8,0
1 M NaCl	150mM NaCl
0,1% NP-40	0.1% NP-40
1 mM EDTA	0,5 mM EDTA
30mM EGTA	1mM DTT
80 mM β-glütserool fosfaat	
50 mM NaF	
1 mM Na3VO4	

Rakusademed lüüsipuhvri ja inhibiitoritega valati eelnevalt vedelas lämmastikus külmutatud Retsch MM400 veski metalltopsidesse, kus need veskis 4 korda 2 min 30 Hz juures purustati,

asetades metalltopsid vaheaegadel tagasi vedelasse lämmastikku. Edasine puhastamine toimus vastavalt publitseeritud TAP-märgisega puhastamise protokollile (Puig et al., 2001). Purustatud rakusademele lisati 25 ml lüüsipuhvrit koos inhibiitoritega ning viidi 4 °C juurde 1 h keerlema. Ülejäänud tsentrifuugimised ja valgu puhastamine viidi läbi 4 °C juures. Lüsaaat valati 30 ml sorvalli tuubidesse ning tsentrifuugiti RC5B masinas Sorvall SS-34 rootoriga 10 min 10000 rpm juures. Supernatant valati uutesse Sorvall 30 ml tuubidesse ning tsentrifuugiti sama masina ja rootoriga 18000 rpm 60 min. Järgnevalt pipeteeriti lüsaaadis tekkinud lipiidikihi ning sademe vahelt 3 ml Pasteuri pipetti kasutades ~25 ml 50 ml-sse falcon tuubi. Samal ajal valmistati ette valgupuhastamise kolonnid, kuhu pipeteeriti 250 µl IgG Sepharose Fast Flow keraid, mida pesti 10 ml lüüsipuhvriga. Kolonnide läbivool korgiti kinni ja suspendeeriti lüsaaati kasutades IgG kerad ning pipeteeriti see lüsaaati sisaldanud 50 ml-sse Falcon tuubi, mis seejärel tunniks ajaks keerlema viidi. Lüsaaat koos IgG keradega pipeteeriti kolonni ning lasti elueeruda, peale mida pesti kolonne 3 korda 10 ml lüüsipuhvriga ning 10 ml TEV-lõikamise puhvriga, millesse DTT lisati vahetult enne pesemist. Kolonnid korgiti kinni ning suspendeeriti kolonnis olevaid IgG Sepharose keraid 400 µl TEV-lõikamise puhvriga ning pipeteeriti 2 ml tuubi, millele lisati 10 µl TEV-proteaasi (100 ühikut). 2 ml tuubid viidi 18 °C juurde keerlema 1,5 tunniks, peale mida need tagasi kolonnidesse pipeteeriti ning elueeriti lõigatud valk 2 ml tuubidesse, millele lisati 20% lõppkontsentratsioonis glütserooli, pipeteeriti 10 µl kaupa 0,5 ml tuubidesse ning kiirkülmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80 juures.

2.2.8 6xHis märgisega Sic1 variantide puhastamine

Täispika Sic1 ning Sic1ΔC (aa 1-215) puhastamiseks kasvatati punktis 2.2.5 transformeeritud BL21 rakke alguses 37°C loksutil 5 ml LB+Km+Cam söötmes kuni OD₆₀₀=2,0 ning seejärel 50 ml-is LB+KM söötmel. OD₆₀₀=0,6 juures indutseeriti geeniekspressioon Isoproöül β-D-1-tiogalakto-püranosiidiga (IPTG) kolmeks tunniks. Rakusade koguti kokku Eppendorf 5810R tsentrifuugis A-4-81 rootoriga 50 ml Falcon tuubides pööreldes 4000 rpm-il 2 minutit. Rakkude sade külmutati vedelas lämmastikus ning järgvalt säilitati -80 juures. Rakkude sade sulatati ning suspendeeriti 10 ml lüüsipuhvris (25 mM Hepes, pH 7,4, 300 mM NaCl, 10% glütserool), millele lisati 0,1 U/µl Dnaas I ning proteaaside inhibiitorid (1 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatiin A, 1 µg/ml aprotiniin, 1 µg/ml leupeptiin). Lüüsipuhvris rakusademe suspensioonile lisati lüsotsüümi

lõppkontsentratsioonis 1 mg/ml ning viidi 4 °C juurde lüüsuma end-over-end segajale. Rakke sonikeeriti Bandelin Sonoplus HD 2070 sonikaatoril 50% võimsuse juures 3 korda 30 sekundit pauside kestvusega 1 min, mil suspensiooni hoiti jääl. Sonikeeritud rakususpensioon valati Sorvall 30 ml tuubidesse ning tsentrifuugiti RC5B masinas 4 °C juures 15000 rpm 10 minutit SS-34 rootoriga. Valgu puhastamise kolonnide ettevalmistamiseks pipeteeriti sinna 250 µl Chelating Sepharose kerasid (GE Healthcare) ning pesti 10 kolonni ruumalaga ddH₂O-ga, laeti üks kolonni ruumala 200 mM CoCl₂ ning pesti 10 kolonni ruumala lüüsipuhviga, milles puudusid proteaasi inhibiitorid ning DNAas I. Lüsaa pipeteeriti kolonnile 4 °C juures ning pesti kolm korda 10 ml lüüsipuhvriga. 6xSic1 variandid elueeriti toatemperatuuril kolonnilt kasutades lüüsipuhvrit, milles oli 200 mM imidasool. Elueeriti ühekordse kolonni ruumalaga kolm korda ning eluaadid koguti eraldi tuubidesse, kiirkülmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80 °C juures.

2.2.9 Katsed puhastatud valkudega

2.2.9.1 Clb5-Cdk1 kompleksi fosforüleerimisvõime ja spetsiifika hindamine

Puhastatud Clb5-Cdk1 komplekse ja substraadi histoon H1-ga tehti kinaasikatse, et veenduda puhastatud kinaas-kompleksi võimes fosforüleerida spetsiifilist substraati ning veenduda kõrvaliste potentsiaalsete substraatide mittefosforüleerimises. Kinaasikatse koosnes 20 µl reaktsioonisegust, mis sisaldas 50 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl, 0,5 mM ATP, 0,2 mg/ml vesise seerumi albumiini (BSA), 500 nM Cks1wt, 0,04 mg/ml histoon H1, 0,1 µCi/µl [γ -³²P] ATP ja umbes 2 nM Clb5-Cdk1 ensüümi. Ensüümi kontsentratsioon oli katses oluliselt madalam substraadi kontsentratsioonist ning fosforüleerimisel ei kasutatud ära rohkem kui 10-30% substraadist (Koivomagi et al., 2013). Analoog-sensitiivse Cdk1-ga tüves puhastatud Clb5wt kontrollkatsele lisati ka 1mg/ml 1-NM-PP-1 kinaasi inhibiitorit. Katse viidi läbi kolmes ajapunktis 7, 14, 21 min, kus iga ajapunkti kohta pipeteeriti 6 µl kinaasikatse segu reaktsiooni peatamiseks 3x SDS-i, laeti 10% polüakrüülamiidgeelile ning jooksutati 25 mM Tris, 192 mM glütsiin ning 0,1% SDS sisaldavas puhvris 15 mA voolutugevusel. Geel värviti *Coomassie Brilliant Blue R-250*-ga 1h, pesti 40% metanooli ja 7% äädikhapet sisaldava lahusega 20min ja ddH₂O-ga 30 min geele vahepeal kuumutades ~60 °C-ni. Geelid kuivatati ning asetati Storage Phosphor Screen kassetidesse 24 h-ks ning skanneeriti sisse Typhoon TRIO visualiseerijas ning signaalid kvantiseeriti ImageQuant TL tarkvaras.

2.2.9.2 Cdk1 ensüümikoguste kalibreerimine

Valgupuhastusest saadud Clb5-Cdk1 komplekside kontsentratsioonide võrdustamiseks kasutati kahte meetodit – valkude värvimist *Coomassie Brilliant Blue G-250*-ga ning Cdk1 fosforüleerimist selle inhibiitori Swe1 poolt, mille tulemusi võrreldes hilisemates kinaasikatsetes ensüümikogused võrdsustati.

Valgukoguse kvantiseerimiseks *Coomassie Brilliant Blue G-250* abil laeti 10% polüakrüülamiid geelile 30 µl valgupreparaati koos 6 µl 6x SDS-iga ning foreesiti 15 mA geeli kohta 1,5 h. Valgud fikseriti geelile 30% etanooli ja 30% äädikhapet sisaldavas lahuses 15 min, pesti H₂O-ga ning värviti *Coomassie Brilliant blue G-250*-ga üleöö. Geelid pesti ddH₂O-ga ning skanneeriti sisse ja kvantiseeriti ImageQuant TL tarkvaraga.

Swe1 poolse fosforüleerimise abil Cdk1 koguse hindamise kinaasikatses kasutati 2.2.9.1. kirjeldatud reaktsioonisegu, kuid kasutati 200 nM Swe1 ensüümi ning substraatidena umbes 20 nM Clb5-Cdk1 variante. Katses kasutati ühte ajapunkti, ensüümidel lasti töötada 1h, mille jooksul teoreetiliselt peaaegu kõik katses sisalduv substraat täis fosforüleeriti. Valgud laeti 10% polüakrüülamiidgeelile, foreesiti, värviti, skanneeriti ja kvantiseeriti eelnevalt kirjeldatud viisil.

2.2.9.3 Clb5-Cdk1 kompleksi substraatvalkude fosforüleerimine

Katses vaadeldi puhastatud Clb5-Cdk1 komplekside poolset võimet fosforüleerida substraatvalke Sic1, Sic1ΔC, Far1ΔC ja Kar9. Substraatvalkudest Far1ΔC puhastajaks oli Ervin Valk ning Kar9 puhastati Mihkel Ördi poolt. Lisaks vaadeldi kinaasi poolset histoon H1 põhjal disainitud substraatpeptiidi PKTPKKAKKL (TPKK) fosforüleerimist. Katsetes kasutati punktis 2.2.9.2 rakendatud meetodite abil võrdustatud (~1nM) Clb5-Cdk1 koguseid. Katsete peatamiseks sobivad ajapunktid valitis ellised, et substraadi kulu ei ületaks 10-20% kogusubstraadi hulgast. Reaktsioonisegud sisaldasid substraatidena 1 µM TPKK, 1 µM Sic1, 1 µM Sic1ΔC, 1 µM Far1ΔC ning 0,5 µM Kar9. Substraatvalgud foreesiti, skanneeriti ja kvantiseeriti. TPKK kinaasikatses reaktsioon peatati Whatman filterpaberile, mis asetati 100 mM fosforhappe lahusesse ning pesti samas lahuses 3 korda 10 min loksutades, paberid kuivatati ning sarnaselt foreesitud valkudele

visualiseerijas Typhoon TRIO skanneeriti ja Imagequant TL-iga kvantiseeriti. Katses akrüülamiidgeelis foreesitud valgud skanneeriti ja kvantiseeriti vastavalt 2.2.9.1 kirjeldatule.

2.2.9.4 Clb5-Cdk1 kompleksi substraatide Michaelis Menteni konstandi mõõtmine

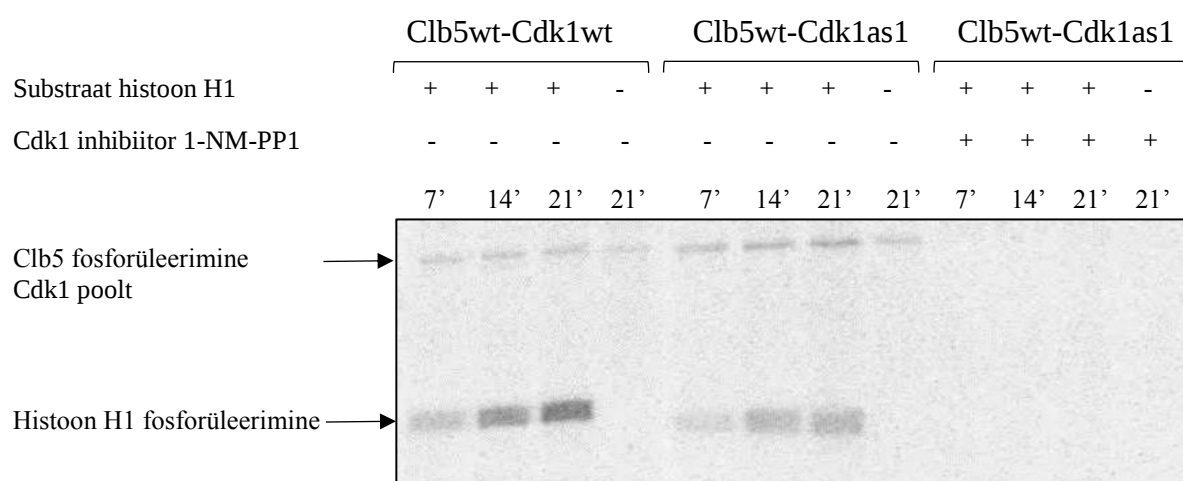
Punktis 2.2.9.3 kirjeldatud mutantide ja substraatide katse tulemuste baasil mõõdeti osade efekti näidanud mutantidega substraadi suhtes K_m -i, ehk mõõdeti varieeruva substraadi kontsentratsiooni juures, millal jõuab ensüümi aktiivsus 50%-ni oma maksimumkiirusest ehk 50% V_{max} -ist. Kinaasikatse reaktsioonisegu koosnes vastavalt punktis 2.2.9.1 kirjeldatud komponentidele ning punktis 2.2.9.2 ühtlustatud ensüümide kogusele, kuid substraadisegusse pipeteeriti pool katses kasutatud BSA-st. Substraadi kontsentratsioonid Sic1 katses olid lõppmahus 10000 nM, 3333 nM, 1000 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM ja 0,33 nM. Sic1 Δ C kontsentratsioonid olid lõppmahus 22750 nM, 6825 nM, 2275 nM, 683 nM, 228 nM, 68 nM, 23 nM ja 7 nM. Far1 ja Kar9 substraatide katsetes kasutati 8 substraadikontsentratsiooni asemel nelja kontsentratsiooni. Far1 – 2450 nM, 735 nM, 245 nM ja 74 nM. Kar9 katses – 5950 nM, 1785 nM, 595 nM, ja 178,5 nM.

Kinaasireaktsioonid tehti Sic1 suhtes M1- ja Clb5wt-Cdk1 kompleksidega, Sic1 Δ C suhtes M1-, M3- ja Clb5wt-Cdk1-ga, Far1 Δ C suhtes M1-, M3-, M7- ja Clbwt-Cdk1 kompleksidega ning Kar9 suhtes mõõdeti K_m -i lisaks Clb5wt-Cdk1-le M1-, M3-, M6- ja M10-tsükliin-kinaas kompleksidega. Kinaasireaktsioonid foreesiti, skanneeriti ja kvantiseeriti vastavalt punktis 2.2.9.1 kirjeldatule. K_m joonised vormistati Graphpad Prism 7 tarkvaras.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Clb5-Cdk1 kompleksi fosforüleerimisvõime ja spetsiifika

Peale Clb5-Cdk1 komplekside puhastamist veenduti kõigepealt nende valkude puhastusprotsessi efektiivsuses ning puhtuses. Selle jaoks sooritati punktis 2.2.9.1 kirjeldatud kinaasikatse mutantidega (lisa 3) ja nii Sic1 deletsioonitüves puhastatud Clb5wt-Cdk1wt-ga kui ka Sic1 deletsioonitüves koos inhibiitorile tundliku analoog-sensitiivse Cdk1-as1-ga Clb5wt valkudega (joonis 7). Katse eesmärgiks oli näidata Clb5 variantide puhastamisel rakkudest kaasa tulnud Cdk1 olemasolus ning kinaas-komplekside võimet fosforüleerida progresseeruvalt substraati erinevatel ajapunktidel ning veenduda potentsiaalsete mitte-spetsiifiliste, valgupuhastamise protsessist potentsiaalselt kopretsipiteeruvate valkude mitte-fosforüleerimises. Joonisel 7 on ära näidatud Clb5wt-Cdk1wt ning Clb5wt-Cdk1as1 komplekside võimet fosforüleerida katsesse lisatud substraati histoon H1 ja tsükliiniga aktiveeritud kinaaside autofosforüleerumist. Inhibiitori 1-NM-PP-1 lisamisel Clb5wt-Cdk1as1 reaktsioonisegusse koos radioaktiivse ATP-ga näitab, et inhibiitor peatab igasuguse substraadi ja autofosforüleerimise võimekuse. Substraadita ja inhibiitorita katsetes toimub ainult kinaaside omavaheline autofosforüleerimine. Peale fosforüleerimisvõime ja spetsiifika näitamist kasutati edaspidi mutantsete Clb5 valkude võrdluseks DOM68 tüvest puhastatud Clb5wt-Cdk1wt-i (alates punktist 2.3.2 joonistel viidatud kui WT).



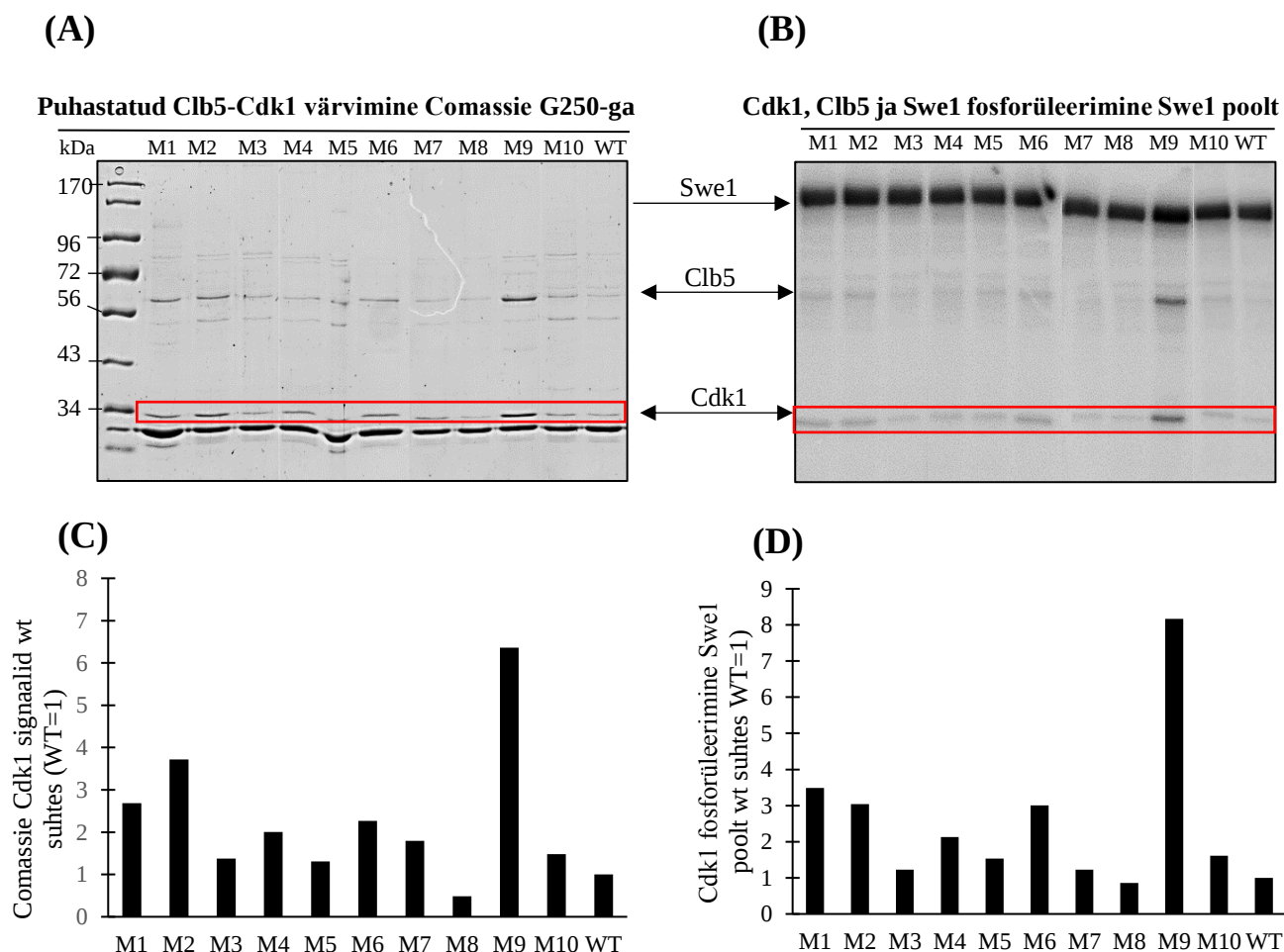
Joonis 7. Substraadi histoon H1 progresseeruv fosforüleerimine Cdk1 poolt. Cdk1wt ja inhibiitor 1-NM-PP-1 suhtes tundliku Cdk1as1 poolne Clb5 autofosforüleerimine ja substraadi histoon H1 progresseeruv fosforüleerimine ajapunktide kaupa. Analoog-sensitiivse Cdk1as1 koos inhibiitori 1-NM-PP-1-ga puudub nii histooni- kui ka autofosforüleerimise võimekus.

2.3.2 Cdk1 ensüümikoguste määramine ja võrdsustamine

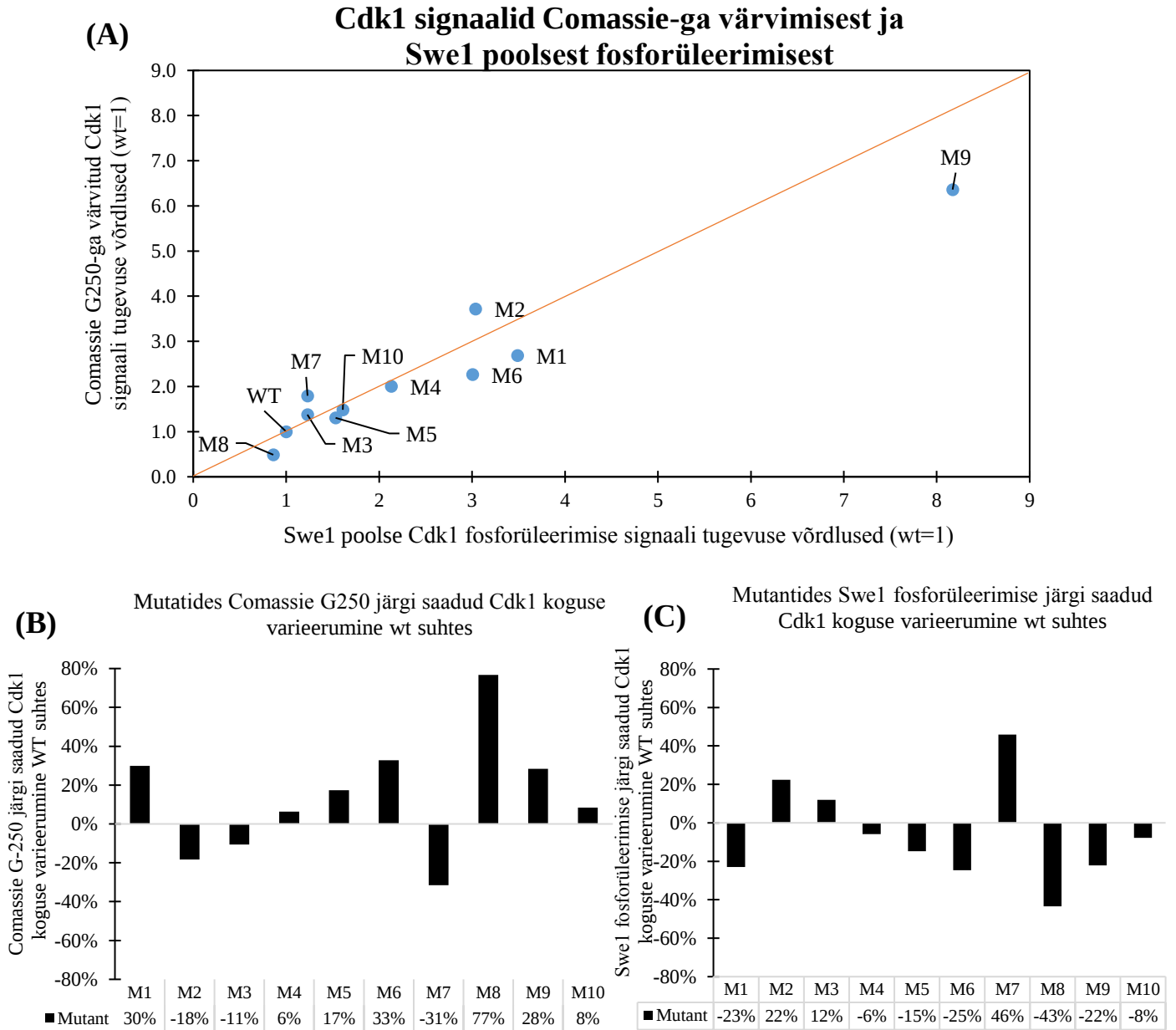
Clb5-Cdk1 komplekside puhastamisel saadi varieeruvad ensüümikontsentratsioonid, mida järgnevatel meetoditel detekteeriti, kvantiseeriti ja kalibreeriti võimalikult sarnasele kontsentratsioonile hilisemate katsete jaoks punktides 2.3.3 ja 2.3.4. Ensüümikoguse võrdustamiseks kasutati Clb5 signaalide asemel Cdk1-te, sest kinaas on tegelik fosforüleerimisreaktsiooni põhjustaja ning puhastamisel võis kas tugeva galaktoosi promootori poolse induktsiooni või kopretsipiteerumise osalise võimetuse tõttu Clb5 valku rohkem ensüümipreparaati sattuda, kui kinaasi. Ensüümikoguste kalibreerimiseks kasutati punktis 2.2.9.2 kirjeldatud kahte meetodit – esimeseks meetodiks oli akrüülamiidgeelis foreesitud valkude värvimine *Coomassie Brilliant Blue G-250*-ga (joonis 8A) ning geelil 34 kDa Cdk1 signaalide kvantiseerimine (joonis 8C). Teiseks Cdk1 kvantiseerimise meetodiks oli kinaasireaktsioon, kus ülemahus katsesse võetud Cdk1 inhibiitor ja türosiinkinaas Swe1 fosforüleeris iseennast, Cdk1-te ning Clb5. Kuigi Swe1 spetsiifika varieerub metsiktüüpi tsüliin-Cdk1 komplekside fosforüleerimisel ning ka töös loodud mutatsioonid Clb5 pinnal võivad seda spetsiifikat muuta, suutis suure tõenäosusega ülemahus võetud Swe1 kõik katsesse võetud kinaasid fosforüleerida. Peale reaktsioonisegu akrüülamiidgeelil foreesimist detekteeriti radioaktiivse fosfaadi 32-P signaalid (joonis 8B) ning kvantiseeriti nendest Cdk1-d (Joonis 8D). (Mõlemad Cdk1 kvantiseeritud signaalide pildid joonisel 8A ja 8B tähistatud punaste kastidega). Foreesitud ja *Coomassie Brilliant Blue G-250*-ga värvitud valkude geelilt on näha lisaks Cdk1-le ka Clb5 valkusid ning puhastusprotsessis Clb5 küljest lõigatud TAP-märgist (~29 kDa). Lisaks on näha ka muid kopretsipiteerunud valke, mis suure tõenäosusega on tsükliin-Cdk1-ga seondunud tsäperonid. Kinaasikatses on näha lisaks Swe1 poolt fosforüleeritud Cdk1 signaalile ka Swe1 autofosforüleerumist ning Clb5 fosforüleerimist.

Coomassie Brilliant Blue G-250-ga värvitud ning kinaasikatses fosforüleeritud Cdk1 signaalid varieerusid küllaltki palju, kuid suuremas osas olid mõlemast meetodist saadud tulemused omavahel korrelatsioonis, nagu on näha jooniselt 9A, kus võeti nii *Comassie*-ga värvitud kui Swe1 poolt fosforüleeritud Clb5wt-ga seondunud Cdk1 signaalid võrdseks väärtusega 1. Mõlema Cdk1 kvantiseerimise meetodi puhul arvutati erinevused joonisel 9A Clb5wt-Cdk1 järgi tehtud $x=y$ sirgest (Joonised 9B ja 9C). Swe1 poolse Cdk1 fosforüleerimissignaali puhul (Joonis 9C) oli kumulatiivne protsentuaalne erinevus sirgest saadud Clb5wt-le taandatud väärtustest väiksem kui *Coomassie Brilliant Blue G-250*-ga värvitud Cdk1 signaalide puhul (Joonis 9B), mille tõttu valiti

järgnevates katsetes mutantsete Clb5-Cdk1 ensüümide võrdsustamiseks Clb5wt-Cdk1-ga Swe1 poolse Cdk1 fosforüleerimisest saadud signaalide suhted Clb5wt-Cdk1 preparaadist kvantiseeritud Cdk1-ga.

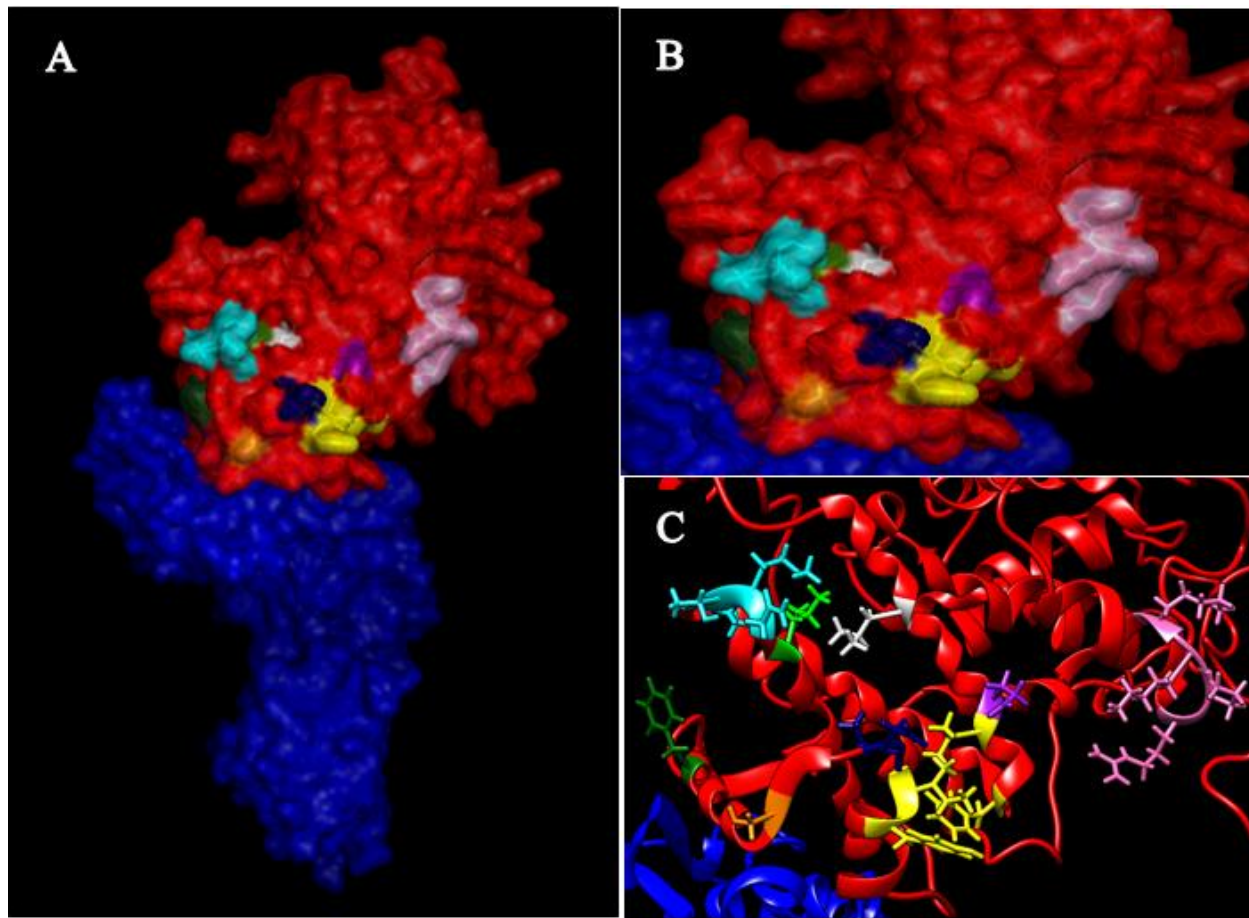


Joonis 8. Puhastatud preparaatides Cdk1 kontsentratsiooni hindamine. Puhastatud Clb5-Cdk1 variantide foresitud ja *Coomassie Brilliant Blue G-250*-ga värvitud kompleksid koos geelil näha oleva valkude suurusmarkeriga ning kvantiseeritud Cdk1 valgud (märgitud punase kastiga)(A). Coomassie meetodil kvantiseeritud Cdk1 koguste suhtelised väärtused Clb5wt-iga puhastunud Cdk1-ga võrdlusel (B). Swe1 poolt fosforüleeritud Cdk1, Clb5 ja Swe1 32-P signaalid (Cdk1 märgitud punase kastiga) (C). Kvantiseeritud mutantsete tsükliinidega koos puhastunud Cdk1 32-P signaalide suhteliste väärtustega Clb5wt-iga puhastunud Cdk1 valku (D). Modifitseerimata joonisel 8A ja 8B kasutatud joonised lisa 2 lisa joonistel 2 ja 3.



Joonis 9. Cdk1 signaalide võrdlus valgu värvimisel ning fosforüleerimisel. Cdk1 signaali tugevuste võrdlus regressioonanalüüsil *Comassie Brilliant Blue R250*-ga värvimisel ning Swe1 poolsest fosforüleerimisest, kus värvimisel ja fosforüleerimisest Clb5wt-ga puhastunud Cdk1 normaliseeritud väärtusele 1 (A). Mutantsete tsükliinidega puhastunud Comassie G-250-ga värvitud ja kvantiseeritud Cdk1 signaalide suhteline erinevus Clb5wt-Cdk1 põhjal saadud regressioonsirgest $x=y$ (B). Mutantsete tsükliinidega puhastunud Swe1 poolsest fosforüleerimisest ja kvantiseeritud Cdk1 signaalide suhteline erinevus Clb5wt-Cdk1 põhjal saadud regressioonsirgest $x=y$ (C). Joonised 9a ja 9c näitavad, kui palju erinevad mõlema meetodi juures kvantiseeritud Cdk1 signaalid joonise 9a lineaarsele $x=y$ sirgele taandatud väärtustest.

2.3.3 Mutantsete Clb-Cdk1 komplekside substraatide fosforüleerimine



Clb5	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Muteeritud amino-happed	V208A	L201A	T269A	E207A	V235A	M237A	L240A	S274A	F284A	K408A
	F212A		D270A		T236A	N238A				K409A
	Y267A				M237A					R411A
	I268A									

Joonis 7. Clb5-Cdk1-Cks1 struktuurimudel koos muteeritud aminohapetega. Joonisel 7A toodud Clb5-Cdk1-Cks1 struktuurimudel (Cdk1 ja Cks1 värvitud siniseks ning Clb5 punaseks. Tsükliini pinnal tehtud mutatsioonide lähivaade (B). Joonised 7A ja 7B näitavad valgu pinnakujutist. Joonisel 7C Clb5 heeliks-ling struktuurimudelil näidatud sama ala, mis joonisel 7B. Kolmel alamjoonisel näidatud värvitud aminohapped vastavad joonise tabelis värvkodeeritult toodud mutantidele, kus vastavad aminohapped onalaniiniks muteeritud. Joonisel 7C on näidatud muteeritud aminohapped ling-heeliks struktuurimudelil aatomstruktuuridena.

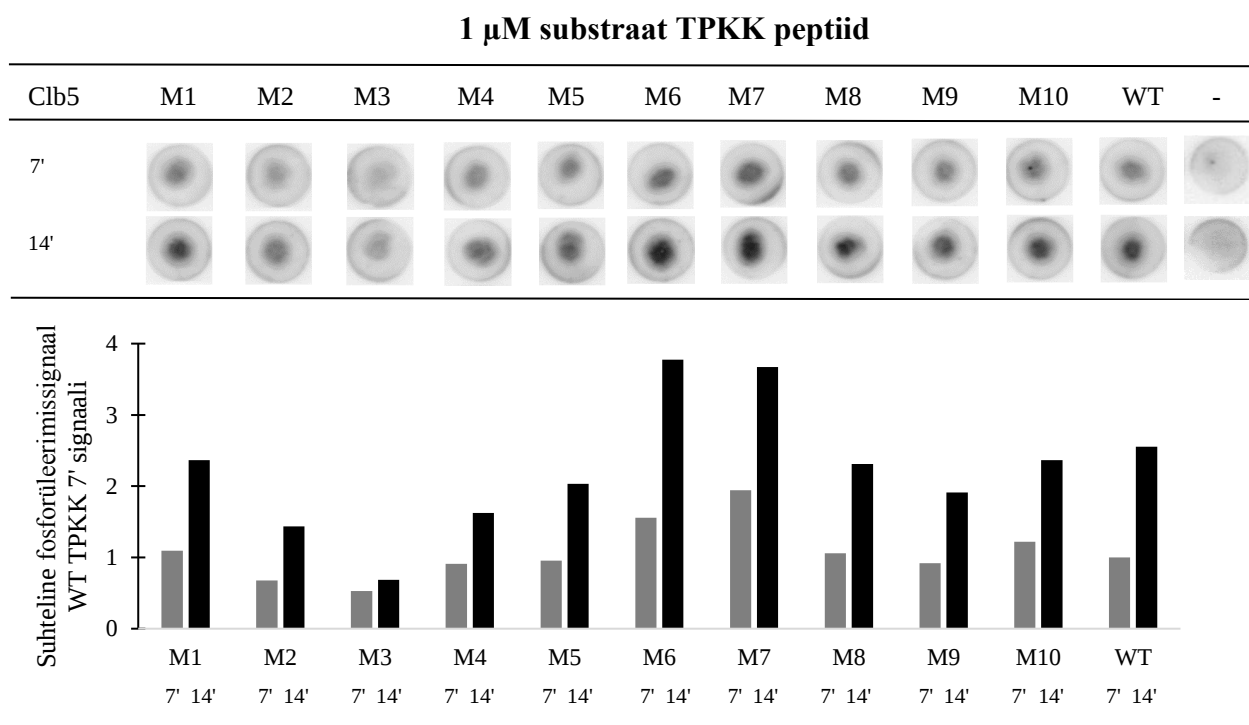
Peale ensüümikoguste võrdsustamist tehti kinaasikatsed viie substraadi ja kümne mutantse Clb5-Cdk1 kompleksiga ning võrreldi neid Clb5wt-Cdk1 suhtes (Tabel 2). Substraatideks olid 1 μ M TPKK peptiid, 1 μ M Sic1, 1 μ M Sic1 Δ C, 1 μ M Far1 Δ C ning 0,5 μ M Kar9. Katses võeti iga mutandiga kõikide substraatide fosforüleerimisel kaks ajapunkti 7 ja 14 min. Edaspidi mutantse Clb5 aminohappelised muutused mainiti üks kord lõigus kui mutanti mainiti eraldiseisvalt.

Kinaasikatse substraatpeptiidi TPKK-ga sooritati Clb5-Cdk1 komplekside aktiivsaidi aktiivsuse mõõtmiseks. Peptiidi fosforüleerimine ei sõltu erinevalt teistest substraatidest seondumismotiividest tsükliinil ning katse annab lisainformatsiooni kinaasi spetsiifilisest aktiivsusest järgnevates katsetes. Kuigi eelnevas punktis ühtlustati Swe1 fosforüleerimise järgi kinaasi Cdk1 kogused, siis on näha jooniselt 10, kuidas peptiidi fosforüleerimine varieerus erinevate mutantide vahel. Erinevatel pärmirakus olevatel metsiktüüpi tsükliinidel on erinev võime seondunud kinaasi aktiivsust moduleerida, mistõttu võib varieeruv aktiivsus töös uuritud mutantides tuleneda ka aminohappelistest muutustest ning selles tulenevalt kergelt erinevas tsükliini struktuuris, mis Cdk1 aktiivsaidi konformatsiooni ja seeläbi aktiivsust muuta suudab.

Kuigi TPKK fosforüleerimine varieerus mutantide vahel, siis toimus ensüümikoguste ühlustamisel kindel võrdestav efekt, näiteks M9(F284A) puhul, mille kontsentratsioon esialgu Clb5wt oma pea 9 kordselt ületas, andis TPKK katses sellest veidi väiksema fosforüleerimissignaali. Mutantidest M6(M237A N238A) ning M7(L240A) olid Clb5wt-Cdk1 suhtes TPKK suuremad fosforüleerijad ning kõige suurem fosforüleerimisaktiivsuse kadu esines mutantides M2(L201A) ning M3(T269A D270A). Viimase aktiivsuses on täheldatav ka selle kadu 7. ja 14. ajapunkti vahel, mis võib viidata selle ensüümkompleksi ebastabiilsusele.

Tabel 2. Töös kasutatud Clb5 variandid koos muteeritud aminohapetega ning nende uurimiseks kasutatud substraadid.

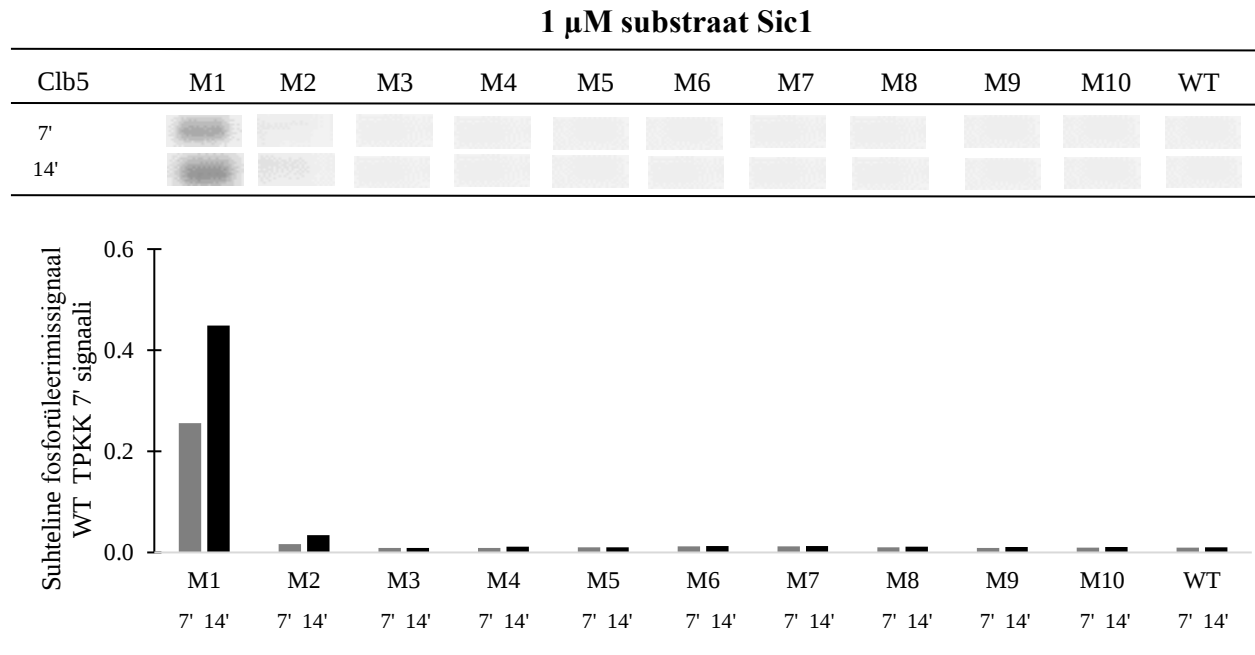
Clb5	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	WT
Muteeritud amino-happed	V208A F212A Y267A I268A	L201A	T269A D270A	E207A	V235A T236A M237A	M237A N238A	L240A	S274A	F284A	K408A K409A R411A	DOM68 WT
Substraadid	H1 peptiid		Sic1		Sic1 Δ C		Far1 Δ C		Kar9		



Joonis 10. TPKK peptiidi fosforüleerimine mutantsete Clb5-Cdk1 valkude poolt. Whatman filterpaberile immobiliseeritud substraatpeptiidi radioaktiivse 32P-märgisega fosfaadi signaal. Toodud erinevate Clb5-Cdk1 komplekside poolt fosforüleeritud 1 μ M peptiidi 32-P signaali pildid kahel ajapunktil ning nende signaalide võrdlused Clb5wt-Cdk1 poolt fosforüleeritud TPKK 7. minuti ajapunkti signaali. Eelnevalt ühtlustatud Cdk1 kontsentratsioonidega ilmesid endiselt variatsioone substraadi TPKK fosforüleerimisvõimes, mis võisid tuleneda tsükliini aminohappeliste mutatsioonide mõjust Cdk1 aktiivsaiidi konformatsioonile ja seeläbi selle aktiivsusele. Modifitseerimata 32-P signaalide pildid lisas 3.

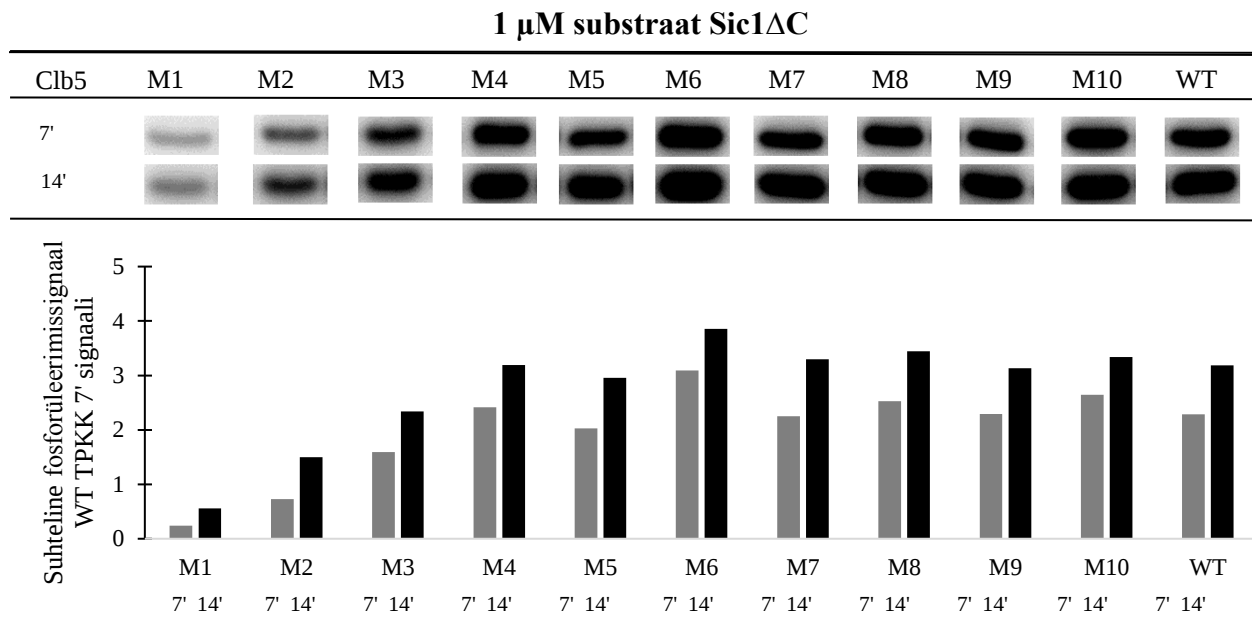
Kinaasikatses Clb5 mutantidega inhibiitori Sic1 suhtes, millel oli erinevalt Sic1 Δ C-st alles selle C-terminaalne Clb-Cdk1 kompleksi inhibeeriv ala on jooniselt 11 näha, kuidas nii Clb5wt-Cdk1 kui ka mutantsete Clb5-Cdk1 kompleksides toimub peaaegu täielik kinaasi inhibeerimine Sic1 poolt. Mutantidest on fosforüleerimisaktiivsus säilinud kompleksidel M1(V208A F212A Y267A I268A) ning vähemal määral ka M2(L201A), mis viitab eriti M1-s muudetud aminohapete olulisusele Sic1 inhibitoorse ala seondumises kompleksile ja selle aktiivsuse vaigistamisele. M1 puhul on selle aktiivsus täispika Sic1 ning Sic1 Δ C (joonis 12) suhtes sarnane, mis annab alust arvata selle tsükliin-CDK kompleksi pea täielikus võimes Sic1 inhibitsioonist vabaneda. Kuna M1 aktiivsus on võrreldes teiste mutantidega väiksema aktiivsusega ka ülejäänud substraatide Sic1 Δ C, Far1 Δ C ning

Kar9 suhtes, ei saa ka välistada nende mutatsioonide sisse viimisel tsükliini struktuuri suuremaid muutuseid, mis läbi seondumismotiivide kao neid vajavate substraatide fosforüleerimist oluliselt vähendab. Suure tõenäosusega on aga selle mutandi substraadispetsiifilised efektid tingitud muteeritud aminohapete tähtsusest substraatidega seondumisel, sest suuremad konformatsioonimuutused tsükliinis tühistaks ka selle võime Cdk1-te aktiveerida, mis on aga M1 TPKK katses selgelt olemas.



Joonis 11. Sic1 fosforüleerimine mutantsete Clb5-Cdk1 komplekside poolt. Akrüülamiid geleelektroforeesil lahutatud substraatvalgu Sic1 32-P radioaktiivne signaal. Akrüülamiidgeelil lahutatud ja sisse skanneeritud 1 μ M Sic1 radioaktiivsed signaalid katse 7. ja 14. ajapunktidel ning nende väärtuste suhted TPKK 32-P 7. min ajapunkti signaali. Täispikk Sic1 inhibeerib täielikult M3-M10 ja Clb5wt-Cdk1 aktiivsust ning osaliselt M2(L201) aktiivsust. M1(V208A F212A Y267A I268A) suhtes inhibiitor suures osas kaotab oma inhibitsioonivõime ning see fosforüleeritakse. Modifitseerimata 32-P signaalide pildid lisas 3.

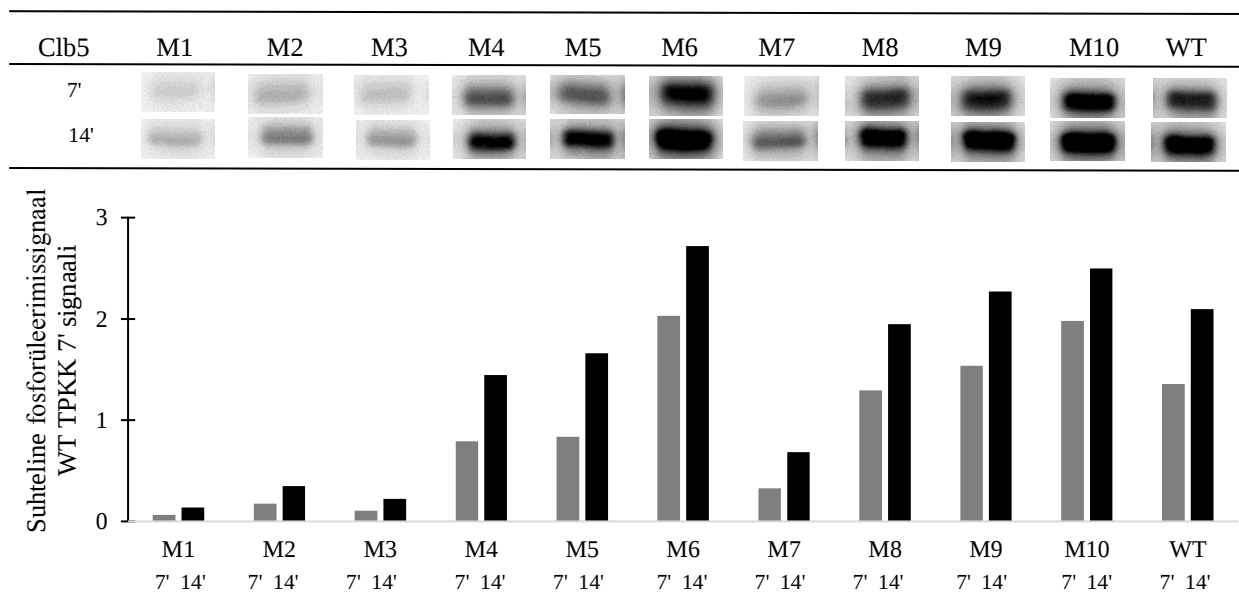
Substraadi Sic1 Δ C fosforüleerimine M4-M10 ja WT Clb5 poolt oli suhteliselt sarnane. Vähemal määral toimus substraadi suhtes aktiivsuse kadu M3(T269 D270), keskmist kadu täheldati M2(L201) puhul ning suuremat võimetust Sic1 Δ C-d fosforüleerida oli näha M1(V208A F212A Y267A I268A) Clb5 mutandis (Joonis 12).



Joonis 12. Mutantsete Clb5-Cdk1 komplekside Sic1 Δ C fosforüleerimine. Akrüülamiid geelelektroforeesil lahutatud Sic1 Δ C valgu radioaktiivse 32 P-ga märgitud fosfaadi signaal. Geelelektroforeesil lahutatud 1 μ M substraatvalgu sisse skanneeritud radioaktiivsete 32 -P signaalide pildid ning nende signaalide suhted Clb5wt-Cdk1 poolt fosforüleeritud TPKK 7' signaali. M4-M10 fosforüleerivad Sic1 Δ C-d sarnaselt. Vähenev aktiivsus M3, M2 ja M1-l substraadi Sic1 Δ C suhtes. Modifitseerimata 32 -P signaalide pildid lisas 3.

Substraat Far1 Δ C-d (Joonis 13) fosforüleeriti M4,5,6 ja M8,9,10 poolt sarnaselt Clb5wt-Cdk1-le. Mutandid, milles esinesid suuremad aktiivsuse erinevused, olid M7(L240A) ning M1-M3. Nendest mutantidest on M1(V208A F212A Y267A I268A) madal aktiivsus eeldatav selle mutandi tsükliinispetsiifiliste seondumiste kao tõttu, mis on nähtav ka teiste substraatide juures. M2 (L201) ja M3 (T269 D270) aktiivsused osutusid oluliselt madalamaks WT-st ka TPKK peptiidi suhtes, mis viitab nende mutantide kinaasi aktiivsuse vähenemisele või väiksema koguse tegeliku aktiivse ensüüm-kompleksi olemasolule. Saadud efektid nende kahe mutandiga Far1 Δ C suhtes võivad olla seetõttu tingitud nii toodud põhjustest või Far1 Δ C pinnal asuvate seondumismotiivide võimetusele Clb5 mutatsioonide tõttu kinaas-kompleksiga seonduda ja fosforüleerimise tõenäosust suurendada. Mutant M7 poolne substraadi TPKK fosforüleerimine oli kõrgem kui samas katses Clb5wt-Cdk1 puhul, kuid Far1 Δ C suhtes võis täheldada olulist M7 ensüüm-kompleksi aktiivsuse vähenemist, mis võib viidata potentsiaalse tsükliini pinnal asetseva Far1 Δ C-ga seondumiseks vajaliku aminohappe või motiivi leidmisele.

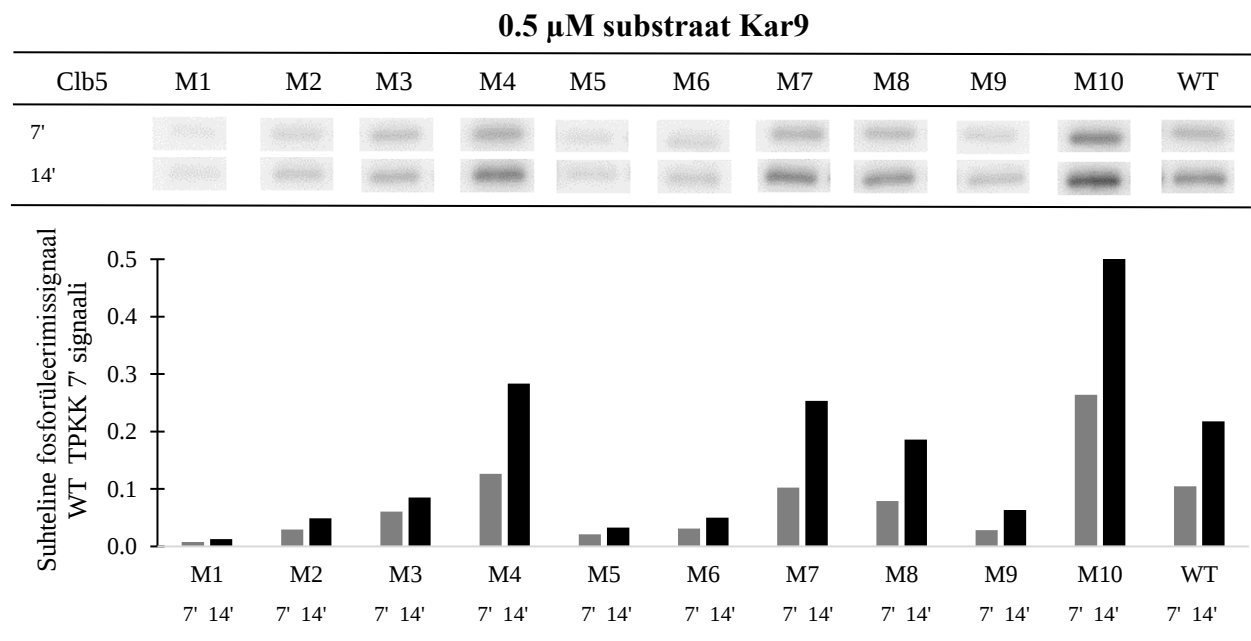
1 μ M substraat Far1 Δ C



Joonis 13. Mutantsete Clb5-Cdk1 komplekside Far1 Δ C fosforüleerimine. Akrüülamiid geelelektroforeesil lahutatud Far1 Δ C valgu radioaktiivse 32P-ga märgitud fosfaadi signaal. Näidatud geelelektroforeesil lahutatud 1 μ M Far1 Δ C sisse skanneeritud radioaktiivsete signaalide pildid katse 7. ja 14. min ajapunktidel ning nende suhe Clb5wt-Cdk1 poolt fosforüleeritud TPKK 7' signaali. M4,5,6,8,9,10 aktiivsused Far1 Δ C suhtes on Clb5wt-Cdk1-ga sarnased. M1,2,3,7 Clb5-Cdk1 komplekside puhul on näha substraadispetsiifilist kinaasse aktiivsuse kadu, mis võib olla tingitud nii tsükliini võimest Cdk1 aktiivsust vähendada, väiksemast kogusest aktiivsest Clb5-Cdk1 kompleksist või Far1 Δ C seondumist vähendavate seondumismotiivide muteerimisega tsükliini pinnal. Modifitseerimata 32-P signaalide pildid lisas 3.

Substraat Kar9 fosforüleerimisel töös kasutatud mutantsete tsükliin-Cdk1 kompleksidega (Joonis 14) oli näha küllaltki ulatuslikku fosforüleerimisvõime kõikumist erinevate mutantide vahel. M4(E207A), M7(L240A) ning M8(S274A) näitasid Clb5wt-Cdk1-le sarnast substraadi modifitseerimist. Oluliselt väiksem fosforüleerimine toimus M1, M2, M3, M5, M6, M9 puhul. M10(K408A K409A R411A) Clb5 mutant suutis kompleksis Cdk1-ga substraati oluliselt rohkem fosforüleerida. Võrreldes sellega Sic1 Δ C fosforüleerimist (Joonis 12), käituvad M1-M3 sarnaselt mõlemas katses, näidates vähest, kuid vastavalt suurenevat võimet substraati fosforüleerida. Kar9 spetsiifilised negatiivsed efektid paistavad Clb5 mutantide M5(V235A T236A M237A), M6(M237A N238A) ja M9(F284A) puhul. Nendest kahe esimese mutandialaniiniks muudetud

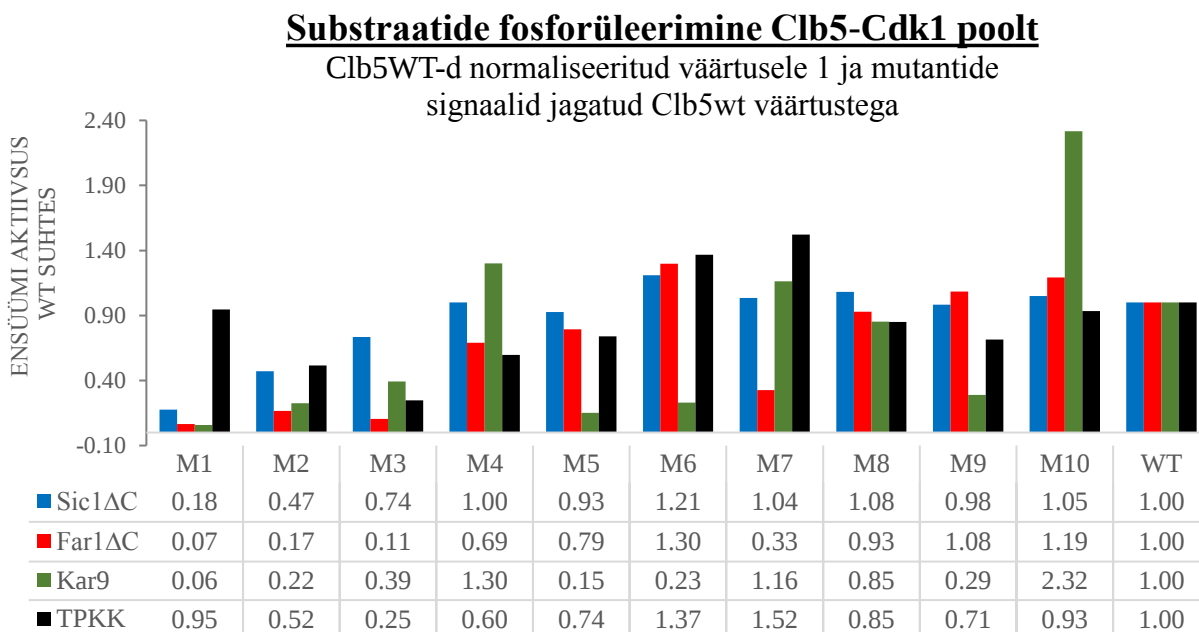
aminohapped positsioonis M237A kattuvad, mis viitavad selle või seda tüüpi aminohappe olulisusele Kar9-ga seondamisel. Ei saa ka välistada mutantides M5 ja M6 teiste, mittekattuvate aminohapete sarnast mõju substraatvalgu Kar9-ga seondumisele, näiteks M5-s T236 ning M6-s N238, mis on mõlemad polaarsed laenguta aminohapped, võivad substraadile seondumisele kaasa aidata ning nende kadu vähendab fosforüleerimist. Sarnaselt tugev efekt on ka suure hüdrofoobse aminohappe fenüülalaniini muteerimiselalaniiniks Clb5 valgu positsioonis 284 (muteeritud M9-s), mis sarnaselt M5 ja M6-ga Kar9 spetsiifilist fosforüleerimist vähendas. Substraadi fosforüleerimise suurenemine tekkis positiivsete aminohapete muteerimiselalaniiniks mutandis M10 (K408A K409A R411A), mis viitab selle positiivselt laetud piirkonna inhibitoorses mõjus Kar9-ga seondumisele Clb5wt valgus. Nagu on näha jooniselt 15, siis võrreldes TPKK signaaliga, kasvavad ka M3(T269A D270A) ning M4 (E207A) fosforüleerimisvõimekused substraadi Kar9 vastu. Mõlema mutandi puhul on sarnaselt M10-ga tegemist laenguga aminohapete kaotamisel suurenenud substraadi fosforüleerimisvõimekusega. Substraatide ja tsükliinide hüdrofoobsed alad seonduvad omavahel ning laenguga aminohapped rikuvad või nõrgendavad neid kontakte, mistõttu on ka loogiline positiivsete või negatiivsete laengute kaotamisel suurenenud afiinsus nende vahel.



Joonis 14. Mutantsete Clb5-Cdk1 komplekside Kar9 fosforüleerimine. Akrüülamiid geelelektrofooresil lahutatud substraadi Kar9 radioaktiivse 32 P-ga märgitud fosfaadi signaal. Näidatud geelelektrofooresil lahutatud 0,5 μ M substraatvalgu sisse skanneeritud radioaktiivsete signaalide pildid katse 7. ja 14. min ajapunktidel ning nende suhe Clb5wt-Cdk1 poolt fosforüleeritud TPKK 7' signaali. Mutandid M7 ja 8 fosforüleerisid substraati Kar9 sarnaselt

Clb5wt-le. Kar9-le spetsiifilised fosforüleerimise vähenemise erinevused esinesid M5(V235A T236A M237A), 6(M237A N238A) ja 9(F284A) mutantsete komplekside juures. Spetsiifiline fosforüleerimise suurenemine esines M10 positiivselt laetud aminohapete K408, K409 ja R411 asendamiselalaniinidega ning samuti toimus TPKK signaalile normaliseerides M3 (T269A D270A) ja M4 (E207A) fosforüleerimisaktiivsuse tõus Kar9 suhtes, mis tulenes mõlemas mutandis negatiivsete aminohapete asendamiselalaniiniga. Modifitseerimata 32-P signaalide pildid lisas 3.

Töös puhastatud Clb5 mutantide substraadispetsiifiliste seondumismotiivide hindamiseks koostati joonis 15, kus kõikide substraatide fosforüleerimisest Clb5wt-Cdk-ga saadud signaal normaliseeriti väärtusele 1 ning kõikide substraatide fosforüleerimisel mutantsete Clb5-Cdk1 valkudega tekkinud signaal jagati vastava substraadi Clb5wt-Cdk1 poolse fosforüleerimissignaali tugevusega.



Joonis 15. Mutantsete Clb5-Cdk1 komplekside fosforüleerimisvõimekus Sic1ΔC, Far1ΔC, Kar9 ja TPKK suhtes. Substraatide fosforüleerimine Clb5wt poolt normaliseeritud väärtusele 1 ning mutantide fosforüleerimissignaalid jagatud vastava substraadi Clb5wt-Cdk1 signaalidega. Jooniselt puudub substraadi Sic1 kinaasikatse mutantidega, kus ainult M1 näitas aktiivsust.

M1 puhul toimub substraatide Sic1ΔC, Far1ΔC ning Kar9 fosforüleerimise vähenemine TPKK suhtes. Sama mutant säilitas fosforüleerimisvõimekuse Sic1 suhtes. Mutandi M2 fosforüleerimisvõimekus jääb Sic1ΔC suhtes samaks ning langeb Far1ΔC ja Kar9 suhtes umbes kaks korda. Clb5 M3 poolt toimub TPKK suhtes Far1ΔC fosforüleerimise vähenemine, Kar9 suhtes

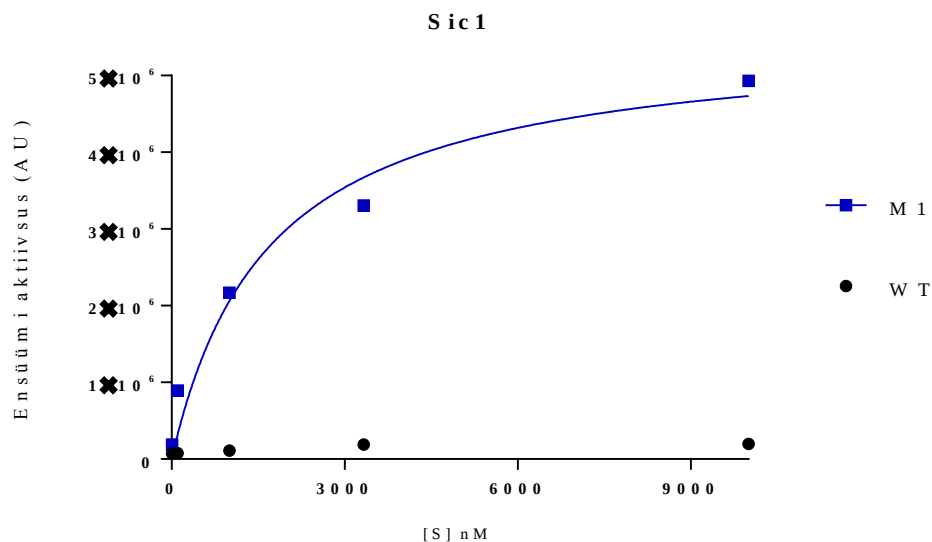
osaline ja Sic1 Δ C suhtes mastaapsem aktiivsuse tõus. TPKK suhtes fosforüleerib M4 Far1 Δ C-d sarnaselt, Kar9 ning Sic1 Δ C-d rohkem. M5 ja M6 mutantidel on sarnane võimekus TPKK-le fosforüleerida Sic1 Δ C-d ja Far1-te, osaliselt kattuvatel mutantidel on aga sarnane langus substraat Kar9 fosforüleerimises. Mutant M7 fosforüleerib Sic1 Δ C ja Kar9 veidi madalamalt, kui TPKK-d. Umbes viiekordne vahe tekib Far1 Δ C fosforüleerimises. M8 mutant ei oma ühegi substraadi suhtes erilist efekti. Substraadi Kar9 suhtes on diametraalselt erinevas suunas spetsiifilised muutused ka mutantides M9 ja M10, vastavalt fosforüleemist vähendavalt ja seda suurendavalt.

2.3.4 Valitud mutantidega substraatide K_m konstandi mõõtmine

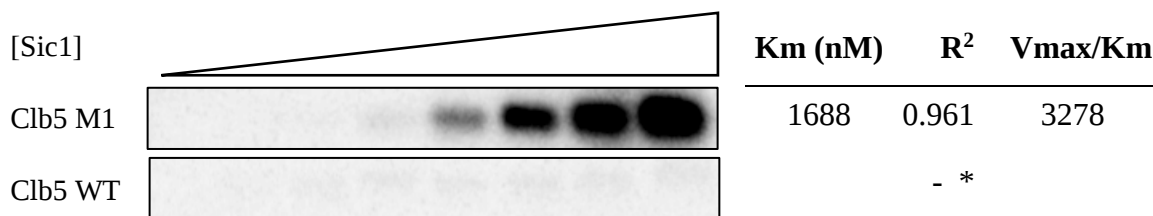
Punktis 2.3.3 toodud tulemuste põhjal valiti iga substraadi kohta välja üks või mitu mutanti, mille fosforüleerimisvõimekust substraadi suhtes selle varieeruva kontsentratsiooni juures mõõdeti täpsemalt ning määrati K_m ja V_{max}/K . Katse näitab ensüüm-substraadi dünaamikas kinaas-kompleksi kiirust substraadi väiksel kontsentratsioonil kuni selle fosforüleerimisvõime küllastumiseni substraadi suurematel kontsentratsioonidel. Lisaks K_m väärtustele toodi jooniste 16B-19B sektsioonides V_{max}/K_m väärtused, mis näitavad substraadi fosforüleerimise kiirust. Mutantide puhul, mis ei sobitunud Michaelis-Menteni K_m kõverale, arvutati need väärtused lineaarse regressiooni abil, kus V_{max}/K_m -iks oli sirge tõus.

Sic1 K_m mõõtmiseks valiti mutant M1- ja Clb5wt-kinaas, millest M1(V208A F212A Y267A I268A) näitas 2.3.3 katses võimet Sic1 fosforüleerida oluliselt rohkem kui Clb5wt-Cdk1. Kuna Clb5wt-Cdk1 ei oma tüüpilist fosforüleerimisvõimekust Sic1 suhtes ning see inhibeeritakse Sic1 poolt, ei ole tegemist tavalise ensüüm-substraat kineetikaga ning selle K_m kõverat joonisele 16A ja K_m ning V_{max}/K_m väärtuseid joonisele 16B ei märgitud. M1 pooltel fosforüleerimisel on Sic1 V_{max}/K_m suurem (joonis 16B) kui Sic1 Δ C V_{max}/K_m (joonis 17B), mis võib tuleneda täispikka Sic1 puhul valgu C-terminaalses osas asuvatest lisa seondumismotiividest, mille efekti ei ole metsiktüüpi tsükliin-Cdk1 fosforüleerimisel näha, sest kinaas inhibeeritakse.

(A)



(B)

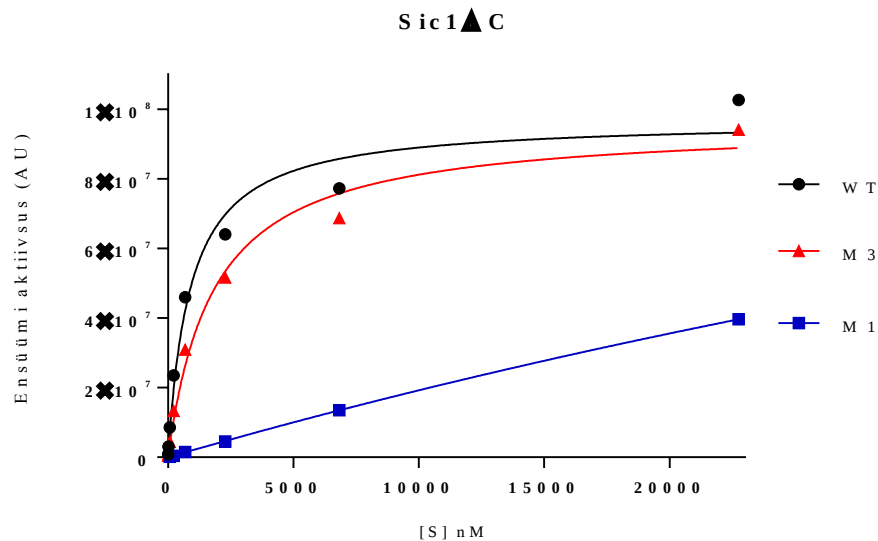


Joonis 16. M1- ja Clb5wt-kinaasi Km katse Sic1 suhtes. Km graafik varieeruva Sic1 kontsentratsiooni juures Clb5wt- ja M1(V208A F212A Y267A I268A)-kinaasi võimekusest substraati fosforüleerida (A). Clb5 M1 ja Clb5wt-kinaasi poolt fosforüleeritud polüakrüülamiidgeelil foreesitud Sic1 valgu 32-P signaal koos tabelis substraadi väärtustega, mil mutandi tsükliin-Cdk1 aktiivsuses on 50% maksimaalsest ensümaatilisest aktiivsusest (Km) ning väärtuse determinatsioonikoefitsient (R²). Lisaks on ära toodud mutantse Clb5-ga kinaasi Vmax/Km väärtus, mis näitab substraadi fosforüleerimise kiirust. * Clb5wt-kinaasi puhul Km ja Vmax/Km väärtused puuduvad, sest Sic1 inhibeerib tsükliin-Cdk1 kompleksi.

Sic1ΔC Km mõõtmiseks valiti Clb5wt-, M1(V208A F212A Y267A I268A)- ja M3(T269A D270A)-Cdk1 kompleksid. M1 näitas 2.3.3 katses Sic1ΔC fosforüleerimise olulist kadu wt suhtes. M1 Km kõver ei jõua Vmax-ini ning selle Km selle tõttu ei arvutatud. Mutandi Vmax/Km väärtus saadi lineaarse regressiooni tõusust. M3 näitas küll Sic1ΔC suhtes sarnast kadu, kuid ka selle TPKK fosforüleerimine oli madalam ning suhtes sellega näitas M3 küllaltki suurt Sic1ΔC spetsiifilist efekti (joonis 15), kus suhtena TPKK-sse oli mutandi Sic1ΔC fosforüleerimine kõige suurem. Km-i mõõtmisel ilmnas, et M3 Km on endiselt väiksem, kui Clb5wt-Cdk1 sama väärtus, kuid ei erine mastaapselt. M3 substraadi fosforüleerimiskiirus (Vmax/Km) on umbes 50% Clb5wt-Cdk1 omast.

M3 spetsiifika Sic1 Δ C suhtes võib olla tingitud substraadi RxL motiivide suuremast seondumisest, kuid üldine aktiivsus võib peegeldada kinaasi katalüütilise võime langust, mida on näha TPKK katses (Joonis 10). M3 puhul oli tegemist küllaltki problemaatilise ensüümiga ning sellega ei saa teha kaugeleulatuvaid järeldusi, sest lisaks kõige madalamale aktiivsusele mutantide seas oli selle kineetikas näha ka langust TPKK fosforüeerimises 7. ja 14. ajapunkti vahel, mis viitab ensüümis probleemidele selle stabiilsuses ja mõju V_{max} väärtustele.

(A)



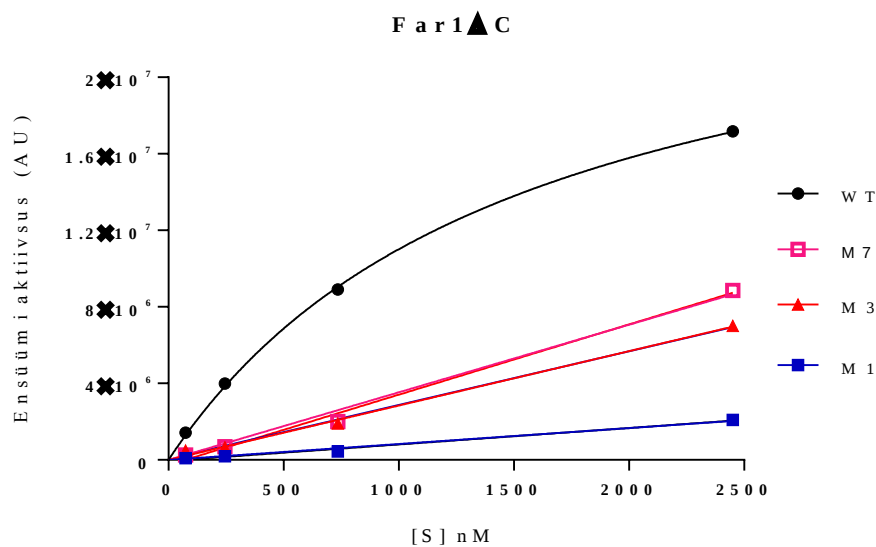
(B)

[Sic1 Δ C]		K _m (nM)	R ²	V _{max} /K _m
Clb5 WT		888	0.978	109028
Clb5 M3		1815	0.987	52837
Clb5 M1		-	-	1748

Joonis 17. M1-, M3- ja Clb5wt-kinaasi K_m katse Sic1 Δ C suhtes. K_m graafik varieeruva Sic1 Δ C kontsentratsiooni juures Clb5wt-, M1(V208A F212A Y267A I268A)- ja M3(T269A D270A)-kinaasi võimekusest substraati fosforüeerida (A). Clb5 M1-, M3-ja Clb5wt-kinaasi poolt fosforüeeritud polüakrüülamiidgeelil foreesitud Sic1 Δ C valgu 32-P signaal koos substraadi väärtustega, mil mutantsete ja metsiktüüpi tsükliin-Cdk1 aktiivsused on 50% maksimaalsest ensümaatilise aktiivsusest (K_m) ning väärtuste determinatsioonikoefitsendid (R²) ja substraadi fosforüeerimiskiirust näitav V_{max}/K_m (B).

Far1 Δ C Km katses uuriti Clb5wt-Cdk1 suhtes mutante M1(V208A F212A Y267A I268A), M3(T269A D270A) ja M7(L240A), mis kõik näitasid fosforüleerimisvõimekuse vähenemist (Joonis 15). Kuna mutantide kõverad olid katses pigem lineaarsed (Joonis 18A), siis ei saanud nendega Km-i mõõta ning Vmax/Km väärtuste jaoks kasutati lineaarse regressiooni tõusu. Mutantide Vmax/Km väärtused lähevad küllaltki hästi kokku joonisel 15 näidatud fosforüleerimisvõimekusega. Mutantidel võivad tekkida Far1 Δ C-ga seondumise vähenemisest tingitud efektid, kus substraat ei seo enam tsükliini sama tugevalt kui Clb5wt valgus.

(A)



(B)

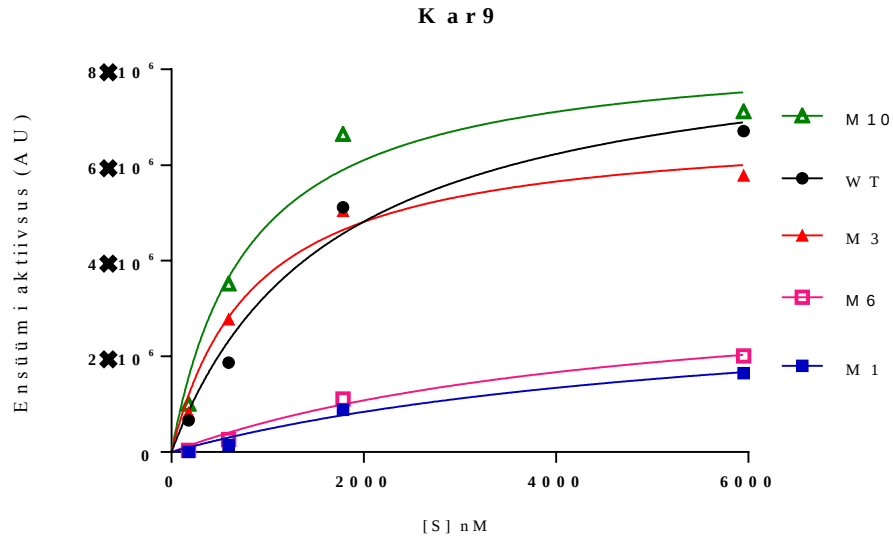
[Far1 Δ C]		Km (nM)	R ²	Vmax/Km
Clb5 WT		1529	0.999	18212
Clb5 M7		-	-	3673
Clb5 M3		-	-	2815
Clb5 M1		-	-	860

Joonis 18. M1-, M3-, M7- ja Clb5wt-kinaasi Km katse Far1 Δ C suhtes. Km graafik varieeruva Far1 Δ C kontsentratsiooni juures Clb5wt-, M1(V208A F212A Y267A I268A)-, M3(T269A D270A)- ja M7(L240A)-kinaasi võimekusest substraati fosforüleerida (A). Clb5wt-, M1-, M3- ja M7-kinaasi poolt fosforüleeritud polüakrüülamiidgeelil foreesitud Far1 Δ C valgu 32-P signaal koos substraadi väärtustega, mil mutantsete ja metsiktüüpi tsükliin-Cdk1 aktiivsused on 50% maksimaalsest ensümaatilisest aktiivsusest (Km) ning väärtuste determinatsioonikoefitsendid (R²) ning ensüümi kiirus substraadi kohta (Vmax/Km). M1, 3 ja 7 ei sobitu Michaelis Menteni Km

kõverale ja seega K_m väärtus ning determinatsioonikoefitsienti ei arvatud. M1, 3 ja 7 V_{max}/K_m väärtus tuleneb andmepunktide lineaarse regressiooni tõusust. (B)

Kar9 suhtes olid mutantidest efektid M1-6 ja 9. (Joonis 15). Nendest valiti kaks mutanti, millel olid fosforüleerimises kaod - M1(V208A F212A Y267A I268A) ja M6 (M237A N238A) ning 2 mille puhul fosforüleerimine kasvas – M3(T269A D270A) ja M10 (K408A K409A R411A). M6 valiti M5 asemel, sest selle puhul on võrdväärne efekt vähemate muteeritud aminohapetega. K_m mõõtmisel valitud mutantidega on näha, kuidas joonise 15 andmed lähevad küllaltki hästi kokku nii K_m kui ka V_{max}/K_m väärtustega. Mutandid M10 ja M3 on huvitavad, sest nende võime Kar9-ga seonduda on suuremad, kui Clb5wt-Cdk1-l, mis on suure tõenäosusega tingitud positiivselt laetud aminohapete mutatsioonist hüdrofoobsete vastu. Üldiselt on valgulisel interaktsioonil medieeritud hüdrofoobsete aminohapete poolt mõlema valgu pinnal. Hüdrofoobsed aminohapped asetsevad pigem reeglina valgustruktuuride sees ja aitavad kaasa hüdrofiilses keskkonnas valkude pakkimisele ning on valgu pinnal pigem energeetiliselt mittesobivaid. Antud katsed näitavad, et Kar9-ga seondumist suurendasid mõlemad mutandid, kus laenguga aminohapped asendati väikeste hüdrofoobsete valkudega. See tekitab küsimuse, kas igasuguste laengute vähendamine tsükliini pinnal aitab kaasa Kar9 fosforüleerimisele või saadi antud katsetes pihta spetsiifilistele seondumismotiividele. M3 sarnane K_m kõver Clb5wt-Cdk1 suhtes nii Sic1 Δ C kui ka Kar9 suhtes viitab nende substraatide sarnastele seondumismotiividele. Mutantide M6 ja M1 puhul oli näha nii K_m kui ka V_{max}/K_m langust ning kuigi M1 puhul on juba tegemist hüdrofoobsete aminohapete vahetamisega sama tüüpi, kuid väiksemate aminohapete vastu, näitab fosforüleerimisvõime vähenemine, kuidas igasugune hüdrofoobne motiiv ei ole sobiv Kar9-ga seondumiseks ning oluliseks võib ka olla selle motiivi ruumiline struktuur, kus suured aminohapped tekitavad rohkem pinda, millega substraat saab seonduda. Huvitavaks võib lugeda M6 sarnasust M5(V235 T236 M237)-ga, sest ei ole teada, milline aminohape Kar9 suhtelist spetsiifilisust omab. Üksikmutant M237A abil saaks nende seondumisspetsiifilisust paremini uurida.

(A)



(B)

[Kar9]		Km (nM)	R ²	Vmax/Km
Clb5 M10		795	0.957	10725
Clb5 WT		1662	0.975	5306
Clb5 M3		851	0.978	8059
Clb5 M6		4781	0.982	327
Clb5 M1		4118	0.973	277

Joonis 19. M1-, M3-, M6-, M10- ja Clb5wt-kinaasi Km katse Kar9 suhtes. Km graafik varieeruva Kar9 kontsentratsiooni juures M1-, M3-, M6-, M10- ja Clb5wt-kinaasi võimekusest substraati fosforüleerida (A). M1-, M3-, M6-, M10- ja Clb5wt-kinaasi poolt fosforüleeritud polüakrüülamiidgeelil foreesitud Kar9 valgu 32-P signaal koos substraadi väärtustega, mil mutantsete ja metsiktüüpi tsükliin-Cdk1 aktiivsused on 50% maksimaalsest ensümaatilisest aktiivsusest (Km) ning väärtuste determinatsioonikoefitsendid (R²) koos substraadi fosforüleerimiskiirust näitava Vmax/Km väärtustega (B). Mutandid M10(K408A K409A R411A) ja M3(T269A D270A) näitavad madalamat Km-i ning suuremat Vmax/Km Clb5wt-Cdk1 suhtes. Mutandid M1(V208A F212A Y267A I268A) ja M6(M237A N238A) näitavad väiksemat Vmax/Km väärtust ja suuremat Km väärtust Clb5-Cdk1 suhtes.

Üheks kõige suuremaks probleemiks antud töö juures on selle kompiv iseloom, kus tehti küllaltki suurel hulgal katseid mutantidega, kuid ei jõutud teha kontrollkatseid nende kinnitamiseks. Eesmärgiks oligi teha esialgne uuring, mille põhjal saaks edasi uurida erinevate seondumismotiivide osalust Clb5-Cdk1 fosforüleerimise rollis substraatide suhtes.

Meie edasine uurimistöö suund seondubki peamiselt sünteetiliste fosforüleerimisvõrgustike disainimisega, kus oleks võimalik kasutada siinseid muteeritud ensüüme ja esialgseid indikatsiivseid tulemusi erinevate seondumismotiivide mõjust erinevatele substraatidele ja nende kineetilise iseloomu kohta.

Kokkuvõte

Saccharomyces cerevisiae rakutsükli kulgemisel mängib kõige suuremat rolli kinaas Cdk1, mida aktiveerivad perioodiliselt akumulatuurivad tsükliinid moodustades sellega komplekse. Rakutsükli käigus ja selle faaside läbimiseks fosforüleerib kinaas substraatvalke, mida on vaja vastava faasi läbimiseks aktiveerida, inaktiveerida või lagundada. Substraatvalkude fosforüleerimine sõltub fosfaati aktsepteeriva saidi aminohappelisest ülesehitusest, Cdk1 aktiivsaidist ning tsükliinil paiknevatest seondumismotiividest.

Käesoleva magistr töö peamiseks eesmärgiks oli uurida B-tüüpi tsükliini ja S-faasis võtmerolli mängiva Clb5 seondumismotiive. Selle jaoks loodi mutantsed Clb5 valgud ning mõõdeti neid *in vitro* kinaasikatsetes erinevate substraatvalkude suhtes. Katsed viitasid nii mutatsioonidele, mille puhul tsükliin-Cdk1 kompleks kaotas igasuguse substraadi seondamise võime, kui ka mutatsioonidele, kus toimus ühe substraadi suhtes spetsiifiline seondumise tõus või kadu. Vastavalt näitas seondamise võime kadu oluliste aminohapete tüüpi ja asukohta tsükliini pinnal substraadiga seondamiseks ning mutantides seondumise tõusud viitasid tsükliini pinnal uute ja potentsiaalselt kasutamiskõlblike seondumismotiivide tekitamisele.

Tsükliinil Clb5 paiknevate substraate siduvate aminohapete uurimine võimaldaks kindlaks teha seaduspärasused substraatidel ja Cdk1-tsükliin-kompleksil interakteeruvatest aminohapetest, mis võimaldaks luua tehislake tsükliinidega Cdk1-komplekse, mis suudaksid vabalt valitud substraate fosforüleerida. Selliseid kinaas-komplekse oleks võimalik kasutada sünteetilises bioloogias kunstlikes fosforüleerimisradades, kus taoliste moodulite abil oleks võimalik panna rakk täitma suurt hulka kasulikke funktsioone.

Summary

During the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*, the biggest role is played by the kinase Cdk1, which are activated by and form complexes with periodically accumulating cyclins. During the progression of different phases of the cell cycle Cdk1 phosphorylates different substrate proteins, which are needed to be activated, inactivated or degraded to complete the phases. Phosphorylation of substrate proteins depends on the phosphate-accepting sites on the substrate, Cdk1 active site structure and on the binding sites for substrates on the cyclin protein.

The main goal of this thesis was to study the binding motifs on the B-type cyclin that plays a key role in S-phase, Clb5. To study these proteins, mutated versions of Clb5 were created and measured against substrate proteins in *in vitro* kinase assays. The results showed mutations, where Clb5-Cdk1 complex lost binding and activity towards all substrate proteins as well as mutations that lost or gained binding and activity toward a single substrate. Respectively, the loss of binding showed important amino acid types and positions for substrate binding in the cyclin and the gain of binding and phosphorylation in certain mutants showed new and potentially usable binding motifs on the cyclin surface.

The study of binding motifs on the cyclin Clb5 could show us the regularities of different amino acids that bind between cyclins and substrates, which could potentially lead us to create artificial cyclin-Cdk1 complexes, which phosphorylate new target proteins. Such kinase-complexes could be used in artificial phosphorylation networks in synthetic biology. Modules like that can help us program cells to preform a wide variety of different functions.

Kasutatud kirjandus

Asano, S., J. E. Park, *et al.* (2005). “Concerted mechanism of Swe1/Wee1 regulation by multiple kinases in budding yeast.” *EMBO J* 24(12): 2194–2204.

Bailly, E., S. Cabantous, *et al.* (2003). “Differential cellular localization among mitotic cyclins from *Saccharomyces cerevisiae*: a new role for the axial budding protein Bud3 in targeting Clb2 to the mother-bud neck.” *J Cell Sci* 116(Pt 20): 4119–4130.

Blondel, M., P. M. Alepuz, *et al.* (1999). “Nuclear export of Far1p in response to pheromones requires the export receptor Msn5p/Ste21p.” *Genes Dev* 13(17): 2284– 2300.

Booher, R. N., R. J. Deshaies, *et al.* (1993). “Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins.” *EMBO J* 12(9): 3417–3426.

Brocca, S., M. Samalikova, *et al.* (2009). “Order propensity of an intrinsically disordered protein, the cyclin-dependent-kinase inhibitor Sic1.” *Proteins* 76(3): 731– 746.

De Bondt, H. L., J. Rosenblatt, *et al.* (1993). “Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2.” *Nature* 363(6430): 595–602.

de Bruin R.A., *et al.* Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell*. 2004;117:887–898

Di Talia S, Wang H, Skotheim JM, Rosebrock AP, Futcher B, Cross FR (2009) Daughter-Specific Transcription Factors Regulate Cell Size Control in Budding Yeast. *PLoS Biol* 7(10): e1000221.

Doncic, A., M. Falleur-Fettig, *et al.* (2011). “Distinct interactions select and maintain a specific cell fate.” *Mol Cell* 43(4): 528–539.

Elion, E. A., B. Satterberg, *et al.* (1993). “FUS3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: evidence for STE12 and FAR1.” *Mol Biol Cell* 4(5): 495–510.

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

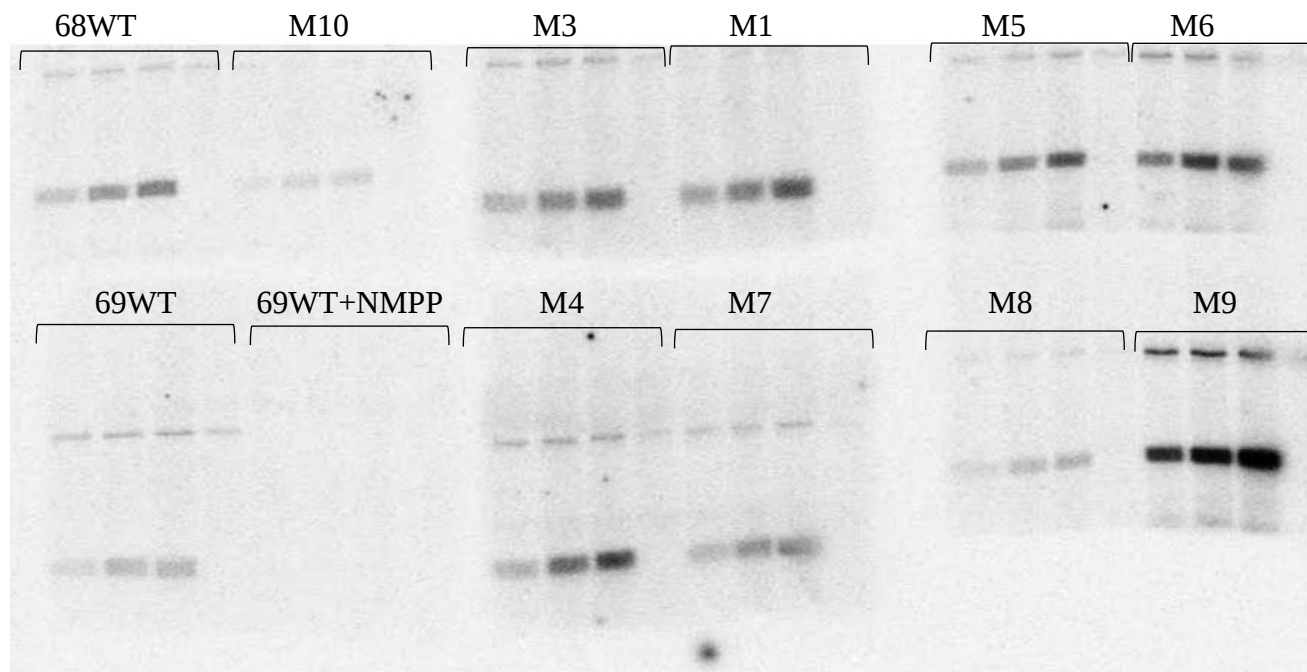
- Gartner, A., A. Jovanovic, *et al.* (1998). "Pheromone-dependent G1 cell cycle arrest requires Far1 phosphorylation, but may not involve inhibition of Cdc28-Cln2 kinase, *in vivo*." *Mol Cell Biol* 18(7): 3681–3691.
- Haase, S.B. ja S.I. Reed. (1999). Evidence that a free-running oscillator drives G1 events in the budding yeast cell cycle. *Nature*. 401:394-7. Hartwell, L. H. (1974). "Saccharomyces cerevisiae cell cycle." *Bacteriol Rev* 38(2): 164–198.
- Hu, F. and O. M. Aparicio (2005). "Swe1 regulation and transcriptional control restrict the activity of mitotic cyclins toward replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(25): 8910–8915.
- Jackson, L. P., S. I. Reed, *et al.* (2006). "Distinct mechanisms control the stability of the related S-phase cyclins Clb5 and Clb6." *Mol Cell Biol* 26(6): 2456–2466.
- Kellogg, D. R. (2003). "Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division." *J Cell Sci* 116(Pt 24): 4883–4890.
- Kobayashi, H.; Kærn, M.; Araki, *et al.* (2004). "Programmable cells: Interfacing natural and engineered gene networks". *PNAS*. 101 (22): 8414–8419
- Koivomagi, M. and M. Loog (2011). "Cdk1: a kinase with changing substrate specificity." *Cell Cycle* 10(21): 3625–3626.
- Koivomagi, M., E. Valk, *et al.* (2011). "Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase." *Nature* 480(7375): 128–131.
- Loog M. (2013). Multisite phosphorylation networks as signal processors for Cdk1. *Nat Struct Mol Biol*. 20(12):1415-24.
- Lengronne, A. ja E. Schwob. (2002). The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1). *Mol Cell*. 9:1067-78.
- Loog, M. ja D.O. Morgan. (2005). Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin dependent kinase substrates. *Nature*. 434:104-8.
- McKinney, J. D. and F. R. Cross (1995). "FAR1 and the G1 phase specificity of cell cycle arrest by mating factor in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 15(5): 2509–2516.

- Mendenhall, M. D. and A. E. Hodge (1998). "Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol Mol Biol Rev* 62(4): 1191–1243.
- Mendenhall, M. D., C. A. Jones, *et al.* (1987). "Dual regulation of the yeast CDC28-p40 protein kinase complex: cell cycle, pheromone, and nutrient limitation effects." *Cell* 50(6): 927–935.
- Miller, M. E. and F. R. Cross (2000). "Distinct subcellular localization patterns contribute to functional specificity of the Cln2 and Cln3 cyclins of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 20(2): 542–555.
- Miller, M. E. and F. R. Cross (2001). "Mechanisms controlling subcellular localization of the G(1) cyclins Cln2p and Cln3p in budding yeast." *Mol Cell Biol* 21(18): 6292– 6311.
- Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and micro- processors." *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261–291.
- Morgan, D. O. (2007). *The Cell Cycle Principles of Control*. London, New Science Ltd.
- Moses, A. M., J. K. Heriche, *et al.* (2007). "Clustering of phosphorylation site recognition motifs can be exploited to predict the targets of cyclin-dependent kinase." *Genome Biol* 8(2): R23.
- Murray, A. W. (2004). "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." *Cell* 116(2): 221– 234.
- Nigg, E. A. (1995). "Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle." *Bioessays* 17(6): 471–480.
- Noble, M. E., J. A. Endicott, *et al.* (1997). "The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control." *Trends Biochem Sci* 22(12): 482–487.
- Pal, G., M. T. Paraz, *et al.* (2008). "Regulation of Mih1/Cdc25 by protein phosphatase 2A and casein kinase 1." *J Cell Biol* 180(5): 931–945.
- Piatti, S., C. Lengauer, *et al.* (1995). "Cdc6 is an unstable protein whose de novo synthesis in G1 is important for the onset of S phase and for preventing a 'reductional' anaphase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *EMBO J* 14(15): 3788–3799.
- Puig, O., F. Caspary, *et al.* (2001). "The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification." *Methods* 24(3): 218–229.

- Rossi, R. L., V. Zinzalla, *et al.* (2005). "Subcellular localization of the cyclin dependent kinase inhibitor Sic1 is modulated by the carbon source in budding yeast." *Cell Cycle* 4(12): 1798–1807.
- Russo, A. A., P. D. Jeffrey, *et al.* (1996). "Crystal structure of the p27Kip1 cyclin- dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex." *Nature* 382(6589): 325–331.
- Russo, A. A., P. D. Jeffrey, *et al.* (1996). "Crystal structure of the p27Kip1 cyclin- dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex." *Nature* 382(6589): 325–331.
- Schulman, B. A., D. L. Lindstrom, *et al.* (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): 10453–10458.
- Schwob, E., and K. Nasmyth. 1993. CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 7:1160–1175.
- Songyang, Z., S. Blechner, *et al.* (1994). "Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases." *Curr Biol* 4(11): 973–982.
- Tanaka, S., T. Umemori, *et al.* (2007). "CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast." *Nature* 445(7125): 328–332.
- Valk, E., Venta, R., *et al.* (2014). „Multistep phosphorylation systems: tunable components of biological signaling circuits.“ *Mol Cell Biol.* 25(22): 3456–3460.
- Valtz, N., M. Peter, *et al.* (1995). "FAR1 is required for oriented polarization of yeast cells in response to mating pheromones." *J Cell Biol* 131(4): 863–873.
- Visintin, R., S. Prinz, *et al.* (1997). "CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis." *Science* 278(5337): 460–463.

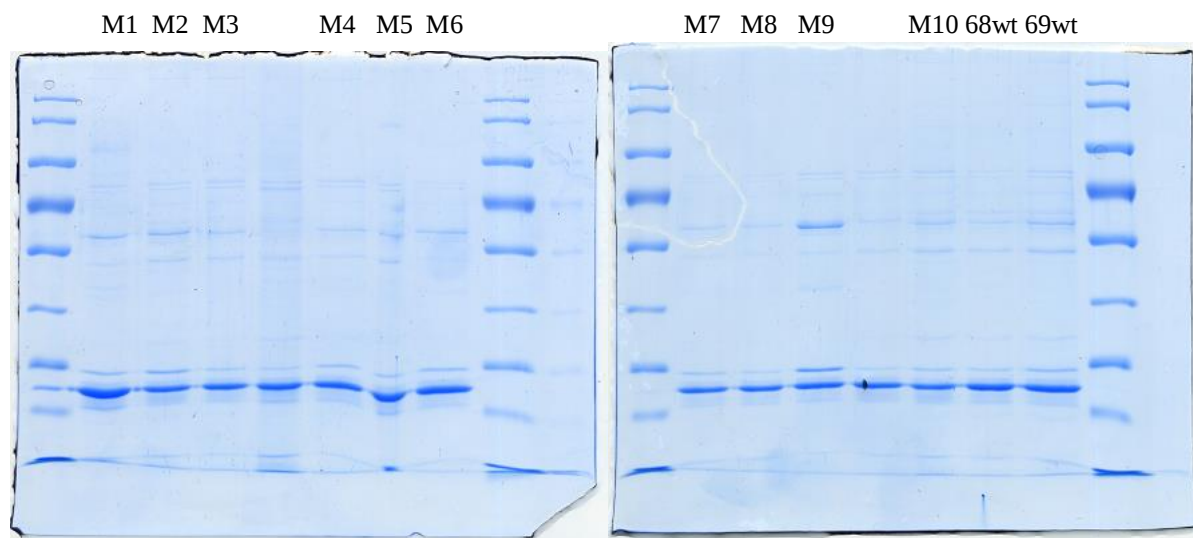
Lisad

Lisa 1 Clb5-Cdk1 fosforüleerimisvõime ja spetsiifika

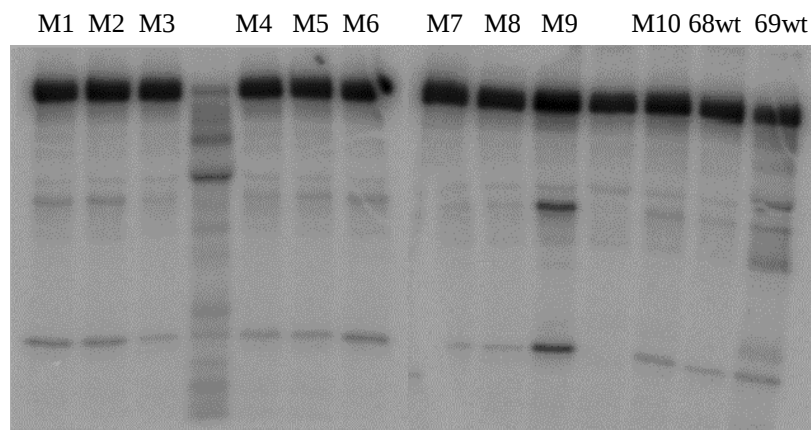


Lisa joonis 1. Clb5-komplekside fosforüleerimisvõime ja spetsiifika histoon H1 vastu. Akrüülamiidgeelil foreesitud substraatvalgu ja autofosforüleerimise 32 -P signaal kolmel ajapunktil (ajapunktid vasakult paremale koos substraadi puudumisega 4. rajalt, mitte viidatud). Töö joonisel 7 kasutatud lisa joonis 1-st Clb5wt-Cdk1wt (68WT) ja Clb5wt-Cdk1as1 (69WT) ning Clb5wt-Cdk1as1 koos inhibiitori 1-NM-PP-1-ga katsetulemuste pilti. Pildilt puudub M2 aktiivsuse mõõtmise katse, millega samas paneelis katset ei sooritatud.

Lisa 2 Valgupreparaatide ühtlustamine Comassie ja Swe1 järgi

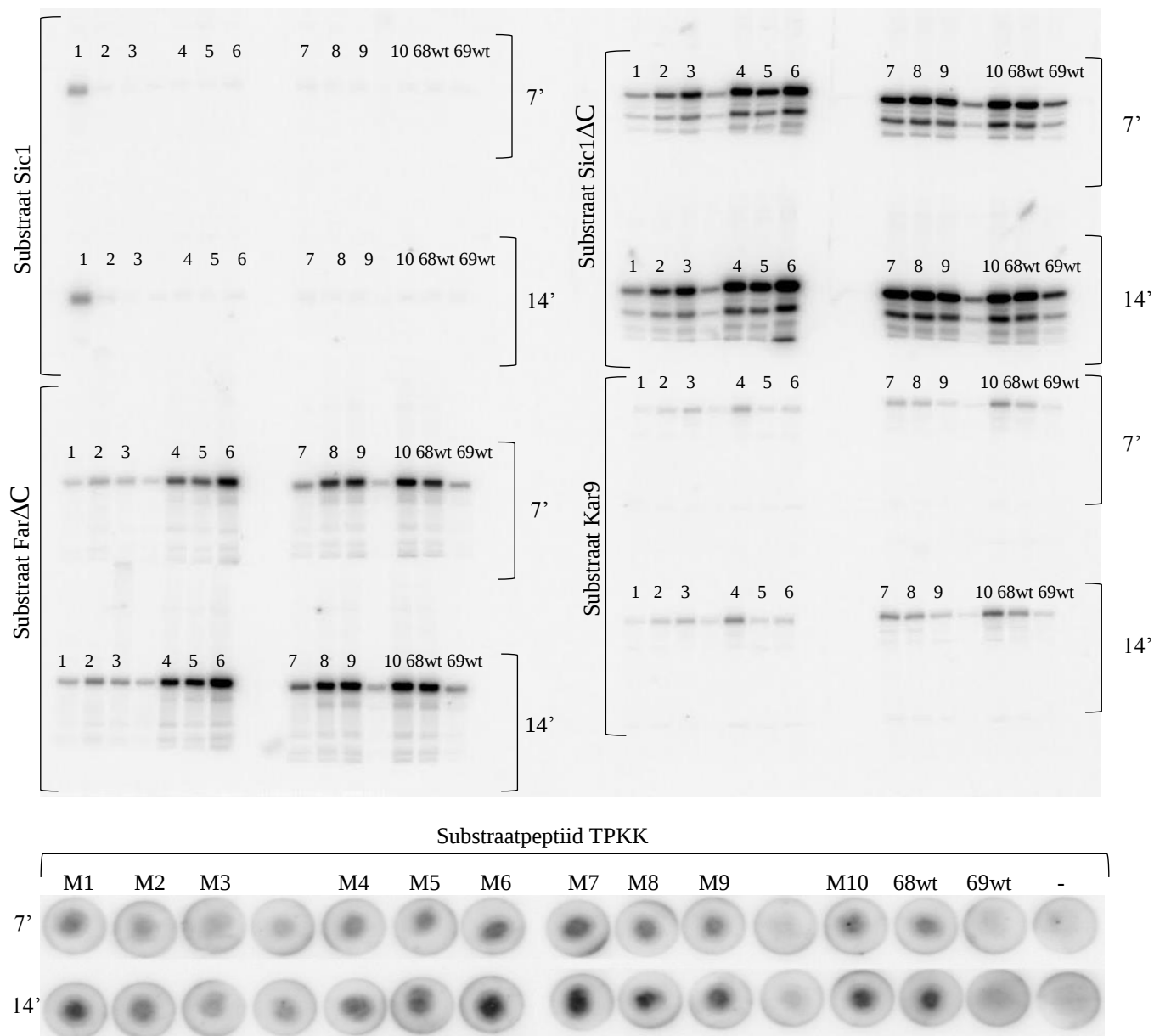


Lisa joonis 2. Comassie Brilliant Blue G250 poolt värvitud puhastatud valgud. Numbritega mitte tähistatud rajad geelis on töös edasi mitte uuritud valgupreparaadid, mis näitasid proteaasi sisaldumist valgupreparaadis (rada M3 ja M4 vahel) ning väga väikest valgukoguse sisaldumist (rada M9 ja M10 vahel).



Lisa joonis 3. Türosiinkinaasi ja Cdk1 inhibiitori Swe1 poolt fosforüleeritud valgud Clb5, Cdk1 ning Swe1 enda autofosforüleerimine. Numbritega mitte tähistatud rajad geelis on töös edasi mitte uuritud valgupreparaadid, mis näitasid proteaasi sisaldumist valgupreparaadis (rada M3 ja M4 vahel) ning väga väikest valgukoguse sisaldumist (rada M9 ja M10 vahel)

Lisa 3 Mutantsete Clb5-Cdk1 komplekside ja substraatidega tehtud kinaasikatsete paneel



Lisa joonis 4. Kõikide substraatide ja kõikide Clb5-Cdk1 variantidega kinaasikatse. Suures paneelis vastavalt Sic1, Sic1 Δ C, Far1 Δ C ja Kar9 akrüülamiidgeelil foreesitud 32-P signaalid. All paneelis substraatpeptiidi TPKK Whatman filterpaberile pipeteeritud reaktsiooni 32-P signaal. . Numbritega mitte tähistatud rajad geelis on töös edasi mitte uuritud valgupreparaadid, mis näitasid proteaasi sisaldumist valgupreparaadis (rada M3 ja M4 vahel) ning väga väikest valgukoguse sisaldumist (rada M9 ja M10 vahel). Alumise paneeli viimased kaks signaali märgitud „-“, viitavad substraadi puudumisele sellest katsest (taust).

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kaur Pääbo

(sünnikuupäev: 12.07.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Clb5 mutagenees ja mõju substraatvalkude fosforüleerimisele“, mille juhendajateks on Mart Loog ja Rainis Venta,
 - 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 **31.12.2020** 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, 01.06.2017