

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Keemia instituut

Tsükliin-CDK kompleksi inhibiitorvalgu Sic1 taseme roll
rakutsükli G_1/S lülituses

Sander Pihelgas

Juhendajad:

Mart Loog, *PhD*

Ervin Valk, *MSc*

TARTU 2013

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 EUKARÜOOTNE RAKUTSÜKKEL	6
1.2 PÄRM KUI MUDELORGANISM	7
1.3 RAKUTSÜKLI REGULATSIOONI MEHCHANISM	8
1.4 TSÜKLIIN-SÕLTUVATE KINAASIDE AKTIVATSIOON JA SPETSIIFIKA.....	11
1.5 TSÜKLIIN-SÕLTUVA KINAASI INHIBIITORID (CKI).....	12
1.6 RAKUTSÜKLI G ₁ /S ÜLEMINEK PÄRMIS (<i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>).....	13
1.7 SIC1-E DEGRADATSIOON	14
1.8 TULEVIKU SUUNAD VÄHI RAVIMITES.....	15
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	16
2.1 BAKTERI- JA PÄRMITÜVED, SÖÖTMED NING KASVUTINGIMUSED	16
2.2 PLASMIIDID JA VEKTORID.....	16
2.3 KLONEERIMINE	17
2.4 OLIGONUKLEOTIID-SUUNATUD MUTAGENEES	18
2.5 BAKTERI- JA PÄRMIRAKKUKESSE TRANSFORMATSIOONID. PLASMIIDIDE ERALDAMINE BAKTERIRAKKUKDEST.....	18
2.6 6xHis-TAG'IGA VALKUDE EKSPRESSEERIMINE JA PUHASTAMINE.....	20
2.7 NAATRIUMDODETSÜÜL-POLÜAKRÜÜLAMIID GEELELEKTROFOREES, VALKUDE VISUALISEERIMINE JA KONTSENTRATSIOONI MÄÄRAMINE.....	21
2.8 <i>IN VITRO</i> INHIBITSIOONIKATSED.....	23
2.9 PÄRMI RAKKUDE ELUMUSE UURIMINE LAHJENDUSRIDADEGA	23
3 TULEMUSED JA ARUTELU	24
KOKKUVÕTE	30

SUMMARY	31
TÄNUAVALDUSED	32
KASUTATUD KIRJANDUS	34

KASUTATUD LÜHENDID

ATP – Adenosiintrifosfaat (i.k¹ *Adenosine triphosphate*)

BSA – Veise seerumi albumiin (i.k¹ **B**ovine serum **albumin**)

CAK – Tsükliin-sõltuvat kinaasi aktiveeriv kinaas (i.k¹ *Cyclin dependent kinase activating kinase*)

CDK – Tsükliin-sõltuv kinaas (i.k¹ *Cyclin dependent kinase*)

CKI – Tsükliin-sõltuva kinaasi inhibiitor (i.k¹ *Cyclin-dependent kinase inhibitor*)

ddH₂O – Destilleeritud vesi

DNA – Desoksüribonukleiinhape (i.k¹ *Deoxyribonucleic acid*)

dNTP – DNA nukleotiidide segu (i.k¹ *Deoxyribonucleotide triphosphates*)

DTT – Ditiotreitool ((2S,3S)-1,4-bis(sulonüül)butaan-2,3-diool)

EDTA - Etüleendiamiintetraatsetaat

HEPES – 4-(2-hüdoksüetüül)piperasiin-1-etaansufoonhape

IPTG - Isopropüül-β-D-1-tiogalaktopüranosiid

PCR – Polümeraasi ahelreaktsioon (i.k¹ *Polymerase chain reaction*)

PEG - Polüetüleenglükool

PMSF – Fenüülmetüülsulfonüülfloriid (i.k¹ *Phenylmethylsulfonyl fluoride*)

ssDNA – Üheaheelaline DNA (i.k¹ *Single-stranded dna*)

TRIS – 2-amino-2-hüdoksümetüül-propaan-1,3-diool

¹ Inglise keeles

SISSEJUHATUS

Eukariootsetes rakkudes on rakutsükkel üldjuhul jaotatud nelja faasi. Faasidevahelisi üleminekuid kontrollivad tsükliin-sõltuvad kinaasid (CDK), mis aktiveeruvad ning inaktiveeruvad periooditi rakutsükli jooksul kindlalt reguleeritud mehhanismide järgi. CDK aktivatsiooniks on vajalik selle seondumine tsükliin alaühikuga, mille tulemusel muutub kinaasi konformatsioon ja aktiivsus on võimeline substraate siduma. Erinevate tsükliinide seondumine CDK valgule teeb võimalikuks erinevate substraatide fosforüleerimise, kuna kompleksi spetsiifilisus sõltub seondunud tsükliinist. Eukariootse rakutsükli uurimisel on levinuimaks mudelorganismiks ainurakne pagaripärm, *Saccharomyces cerevisiae*, kuna selle rakkude paljunemine on küllaltki kiire, manipulatsioonid on lihtsasti teostatavad ning rakutsükli regulatsiooni mehhanismis on leitud valke, mis käituvad analoogselt arenenumate organismide rakkudes leiduvatega. Käesolevas töös on lähema vaatluse all eukariootse rakutsükli G₁/S faaside üleminek. Eelnevalt on näidatud, et *S.cerevisiae* rakkudes on oluliseks faktoriks G₁/S faaside üleminekul CDK-i inhibiitorvalgu Sic1-e degradeerumine. Sic1-e lagundamisele suunamisel mängib olulist rolli valgu N-terminaalses alas asuvate fosforüülimis-saitide fosforüleerimine tsükliin-sõltuva kinaasi Cdk1 poolt ning inhibitsiooniks on vajalikud C-terminaalsed aminohappe jäägid.

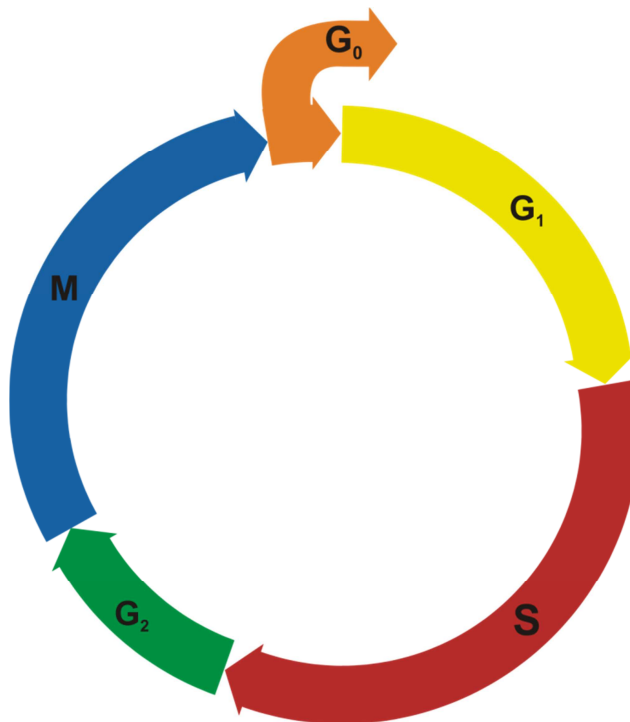
Projekti eesmärgiks on täpsemalt kirjeldada Sic1-e valgu C-terminaalses alas regioonid, mis on olulised B-tüüpi tsükliin Clb5-Cdk1 kompleksi inhibitsioonil ning disainida variandid, mis omaksid erinevat võimet ensüümkompleksi inhibeerida ning seeläbi muudaks G₁/S ülemineku dünaamikat. Töö teoreetiline osa annab ülevaate eukariootse rakutsükli toimimismehhanismidest ning Clb5-Cdk1 kompleksi rollist selles. Lisaks antakse ülevaade rakutsükli inhibiitorvalkudest, keskendudes põhiliselt B-tüüpi tsükliinide inhibiitorile Sic1-le. Töö eksperimentaalses osas kioneeriti erinevaid Sic1-e mutante ekspresseerivad plasmiidid, puhastati vastavad valgud ning võrreldi nende inhibitsiooni Sic1 metsiktüüpi valguga.

Käesolev bakalaureusetöö on valminud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Eukariootne rakutsükkel

Rakutsükkel on kindlasuunaline sündmuste jada, mille tulemusena eukariootsed rakud kahekordistavad oma koostise ning jagavad selle kahe tütaraku vahel. Tsükkel on jaotatud nelja erifaasi: G_1 , S, G_2 , M (joonis 1). Faasidevahelised üleminekud on täpselt reguleeritud. G_1 -faasis on rakul võimalus hakata uuesti valmistuma pooldumiseks või loobuda paljunemisest, sel juhul jäädes tegevuseta faasi G_0 . Hakates uuesti jagunema, läheb rakk jälle G_1 faasi ja sealt edasi järgmistesse rakutsükli etappidesse. Eukariootid järgivad üldplaanis sellist tsüklit, kuid liigiti varieeruvad faaside pikkused (Lehninger, Nelson et al. 2008). Põhilisemad faasid rakutsükli on S (DNA süntees) ja M (mitoos) faasid. S-faasis toodetakse DNA replikatsiooni käigus raku teine koopia DNA-d, mis M faasis jaotatakse kahe tütaraku vahel. G_2 on vaheetapp S ja M faasi vahel, selle jooksul sünteesitakse uued valgud, millega kaasneb ka raku mahu suurenemine ligikaudu kahekordseks. Sellele järgneb M-faas, kus kahekordistunud kromosoomid liiguvad raku eri pooltele, mõlemad kromosoomide kogumid suletakse uuteks tuumadeks ja rakk jaguneb kaheks tütarakuks. Uued rakud paljunevad jälle, kuid peale G_1 vaheetappi, mille jooksul rakud valmistuvad järgmiseks tsükliks (Hartwell, Culotti et al. 1974; Pardee 1974; Nurse 1975).

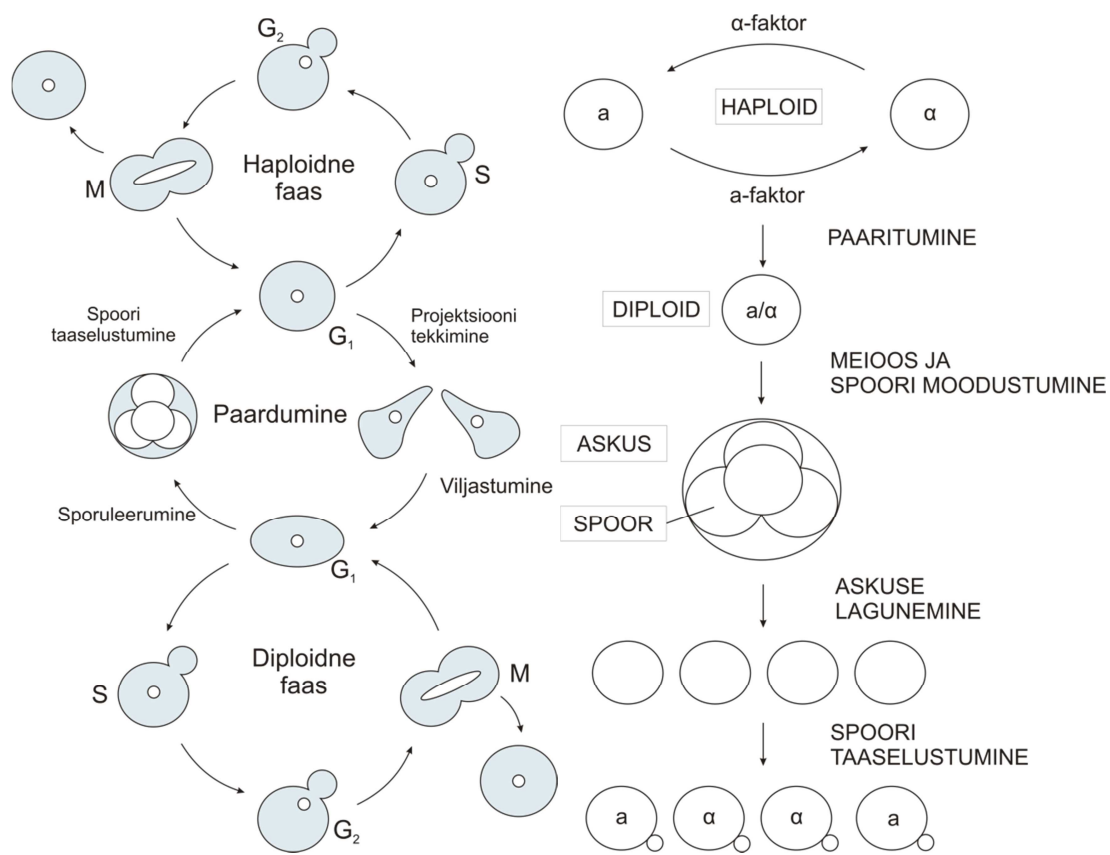


Joonis 1. Eukarüootne rakutsükkel. Rakutsükkel on kontrollitud sündmuste jada, mille käigus rakud paljunevad. Tsükkel on jaotatud nelja faasi: G_1 , S, G_2 , M. Lisaks võivad mõned rakud siseneda G_0 faasi, kus nad ei valmistu otseselt paljunema. G_1 faasis valmistatakse DNA sünteesiks. S faasis sünteesitakse teine koopia DNA-d. G_2 on vahefaas, kus kontrollitakse S faasi lõpule viimist. M faasis jaotatakse raku koostis kaheks (Brewer, Chlebowicz-Sledziewska et al. 1984).

1.2 Pärm kui mudelorganism

Eukarüootse rakutsükli uurimisel on üheks levinuimaks mudelorganismiks ainurakne punguv pärm, *Saccharomyces cerevisiae*, tuntud ka pagari pärmina. *S.cerevisiae* genoomis on 16 kromosoomi, mille kogu pikkus on ligikaudu 12 miljonit aluspaari, sisaldades peaaegu 6000 geeni. Nagu võib nimestki järeldada, paljunevad need rakud pungudes - keskmiselt 2-4 tunni jooksul rikkas söötmes (Forsburg 2005). Üheks pärmi eeliseks hulkraksete organismide ees on võimalus lihtsate meetodite abil eraldada mutante metsik tüüpi pärmidest ja tänu kiirele paljunemisele saab kiiresti üksikust mutantsest rakust koloonia kasvatada nende edaspidiseks uurimiseks. Mitmed pärmis esinevad geenid on funktsioonilt sarnased keerukamates organismides leiduvatega, seega saab pärmis tehtud katsetest tõmmata paralleele arenenumate organismide rakkude funktsioneerimisele (Joshua Chang Mell 2002). Näiteks rakutsükli jooksul esinevad kontrollpunktid, kus veendutakse eelneva ülesande täitmises, avastati esialgu pärmis ning nende töö printsiip on iseloomulik ka teistele eukarüootidele. Teatud defektid nendes funktsioonides, mis kutsuvad esile rakkude kiire paljunemise, on täheldatud ka inimeste vähi rakkudes (Forsburg 2005).

Laboris kasutatav pärm on tavaliselt haploidne, mis paljuneb pungumise teel (joonis 2). Kuna *S.cerevisiae* esineb kahe sugurakuna (a ja α), siis on paljunemine võimalik ka paardumisel. Feromoon signaali kaudu mõjutavad erinevat paardumistüüpi pärmid teineteist, jäädes G_1 faasi ning algab rakkude ühinemine. Moodustub a/α diploidne rakk, mis diploidina rohkem paarduma pole võimeline, kuid on võimeline minema meiosis, millest tekib 2 järglast mõlemast paardumistüübist. Toitainete defitsiidi korral aga moodustuvad küll 4 uut raku, kuid need jäävad spooridena üksteise lähedistiku ning on seotud lisaks veel ühe membraaniga moodustades askuse (Herskowitz 1988). Pärmirakud, nagu ka arenenumate organismide rakud, vananevad ning on võimelised andma teatud arv tütarrakke (Joshua Chang Mell 2002).



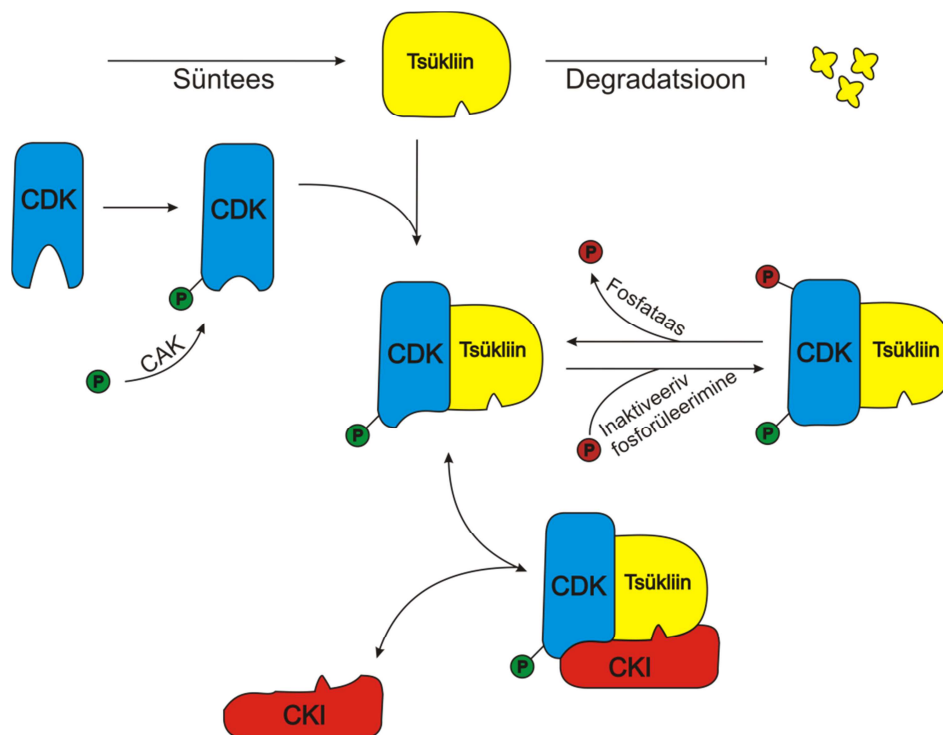
Joonis 2. Pärmirakkude elutsükkel. Vasakpoolne joonis kujutab pärmirakkude paljunemisviisi ning etappe. Haploidses olekus emarakk pungub, et toota geneetiliselt identne tütarakk, selleks eraldatakse mitoosi käigus üksteisest sõsar-kromatiidid. Kahe erinevat paardumistüüpi haploidi liitumisel tekib diploid, milles on iga kromosoomi kaks koopiat. Diploid võib paljuneda pungumise teel või sporuleeruda, moodustades neljast koos püsivast haploidist askuse ehk tetraadi (Joshua Chang Mell 2002).

Parempoolne joonis kirjeldab erineva paardumistüüpi pärmirakkude liitumisel diploidide ja spooride moodustumist ning paljunemist. Kahe erinevat paardumistüüpi pärmirakkude kohtumisel areteeruvad nad teise paardumistüübiga raku poolt esilekutsutud feromoonisignaali kaudu G_1 faasi ning rakkude ühinemisel tekib a/α diploidne rakk. Diploidid a/α moodustavad askuse, milles on neli haploidset raku (spoori). Spoorid on võimelised hiljem askusest väljuma ning rakutsükli jätkama. Tavaliselt tekivad spoorid ebasoodsate elutingimuste tõttu. Diploidid on ruumalalt ligi 2 korda suuremad kui haploidid (Herskowicz 1988).

1.3 Rakutsükli regulatsiooni mehhanism

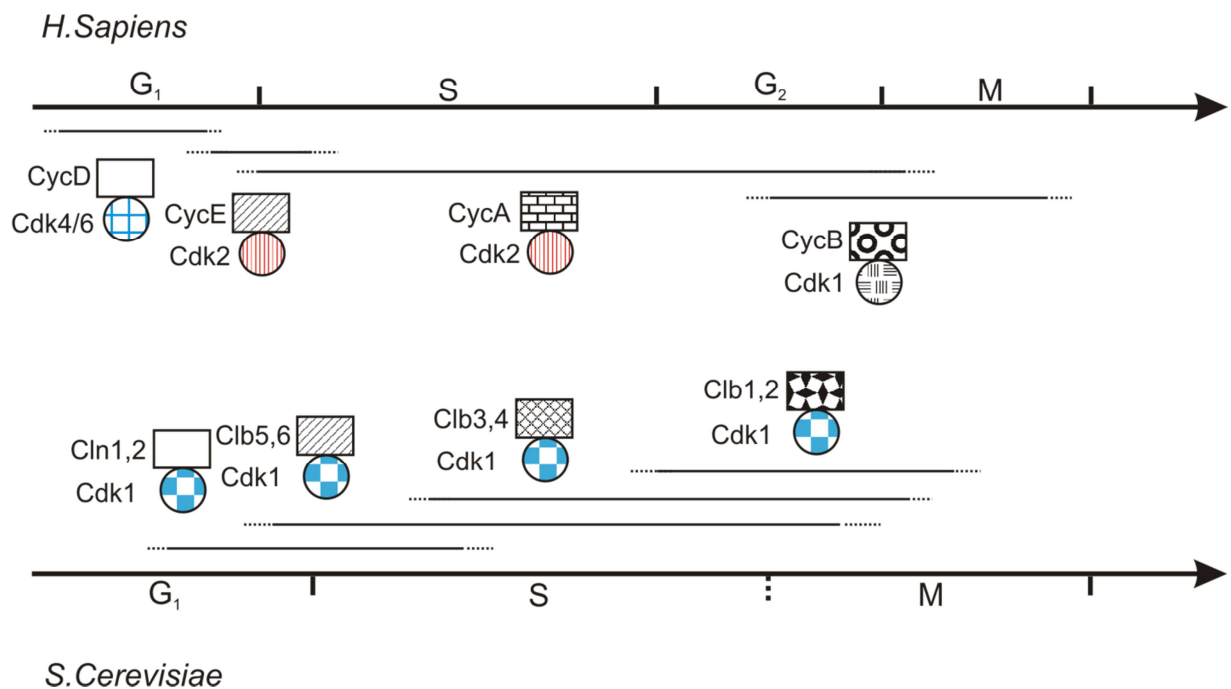
Euakrüootne rakutsükkel on reguleeritud suure hulga biokeemiliste protsesside ehk lülitite sisse ja välja lülitamise kaudu (Morgan 2007), need lülitused peavad kindlustama raku kindlasuunalise liikumise läbi rakutsükli: G_1 faasist S faasi ning sealt läbi G_2 faasi M faasi, mis tipneb rakkude

jagunemise ja uuesti G_1 faasi jõudmisega (Elledge 1996; Morgan 2007). Enamus teadaolevast informatsioonist rakutsükli regulatsiooni kohta on saadud geneetiliste ja biokeemiliste uurimuste kaudu algelisemates organismides, nagu selleks on *S.cerevisiae*. Eukarüootsetes rakkudes on rakutsükli järjestikused protsessid kontrollitud tsükliin-sõltuvate kinaaside (CDK-de) poolt, kuid mitte kõik CDK-d ei osale rakutsükli reguleerimises. Peale rakutsükli reguleerimise, on leitud, et osad CDK-id osalevad näiteks DNA parandamises või transkriptsioonil (Rickert, Seghezzi et al. 1996; Peng, Zhu et al. 1998). CDK-ide kontsentratsioon on rakutsükli jooksul konstantne, kuid nende aktiivsus ja spetsiifilisus muutub perioodiliselt. Üks esimesi täpsemalt kirjeldatud rakutsükli regulaatoreid on Cdk1, mis avastati kui *Cdc28* pagaripärmis (Hartwell 1978; Nurse and Bissett 1981). Pärmis rakkudes on võimeline üks CDK, Cdk1, kontrollima rakutsükli erinevate faaside lülitusi. Cdk1 kinaasi, nagu ka teiste CDK-de, aktivatsiooniks on vajalik selle assotsiatsioon regulatiivse alaühikuga, mida tuntakse kui tsükliini (joonis 3). Kuna tsükliinid ekspresseeruvad rakutsükli erifaasides kindlate protsesside läbi viimiseks, siis kutsutakse neid vastavalt G_1 -, G_1/S -, S-, M-tsükliinideks (Morgan 1997).



Joonis 3. CDK-i aktiivsuse regulatsioon. CDK-i molekul üksinda ei oma kinaasi aktiivsust. Täielikuks aktiveerimiseks on vajalik fosforüleerimine CAK-i poolt ning CDK-i seondumine tsükliiniga kompleksi. Tsükliinide kontsentratsioon on reguleeritud nende sünteesi ning lagundamise kaudu. Tsükliin – CDK-i kompleksi inaktiveerib nii inhibitoorne fosforüleerimine (joonisel punane P) kui CKI-iga seondumine (Morgan 1997).

Tsükliinid olid esmalt iseloomustatud kui mere selgrootutes esinevad valgud, mille akumulatsioon ja degradeerumine otsustab rakutsükli käigus, võimaldades neil esile tulla tsükli eri faasides (Rosenthal, Hunt et al. 1980). Nende perekond on märkimisväärselt laia suuruse varieeruvusega, väiksemad neist on ligikaudu 35 kDa ning suuremad kuni 90 kDa. Tsükliinidele iseloomulikuks omaduseks on sellel esinev ligikaudu 100 aminohappe jäägi pikkune ala - „tsükliini tasku”, mis on vajalik CDK-iga seondumiseks ja aktiveerimiseks (Morgan 1997). Rakutsükli ühesuunaline ning üheseltnõistav progress sõltub distsiplineeritud tsükliinide järjestikust ekspressioonist, viidates sellele, et erinevad tsükliin-CDK kompleksid on vajalikud õigete valkude fosforüleerimiseks sobival ajal (Enserink and Kolodner 2010). Võrreldes algelisemate organismidega on imetajates CDK-ide arv suurem, ulatudes näiteks inimese puhul üheksani. Lisaks on identifitseeritud 16 tsükliini (Johnson and Walker 1999). Imetajate rakkudes Cdk1 analoogina töötav valk Cdk2 seondub G₁ faasi lõpus tsükliin D-ga, S faasi alguses tsükliin E-ga, et algatada DNA sünteesi, seejärel seondub tsükliin A-ga, jäädes sellega kompleksi S faasi vältel ning M faasi käivitamiseks liitub tsükliin B-ga. Pärmis on rakutsükli esimeseks Cdk1-e aktivaatoriks Cln1,2 tsükliinid hilises G₁ faasis, seejärel seob Cdk1 Clb5,6 tsükliinidega G₁/S faasi üleminekul (joonis 4). S faasi keskel interakteerub Clb3,4 tsükliinidega jäädes kompleksi M faasi alguseni ning M faasi lõpuni viimiseks moodustub Clb1,2-Cdk1 kompleks (Morgan 1997).



Joonis 4. Inimese ja punguva pärmi tsükliin-Cdk komplekside võrdlus. Pärmis on võimeline vaid üks CDK, Cdk1, reguleerima rakutsükli vältel erinevaid lülitusi, (*S.cerevisiae* ja *S.pombe* puhul Cdk1) kui inimese rakkudes on regulaatoriteks mitmed CDK-d. Jooned kujutavad ligikaudseid komplekside aktivatsiooni aegasid. Erinevus enamarenenud organismide ja pärmi rakutsükklis on pärmi korral G_2 faasi puudumine ning S ja M faasi osaline kattumine (Morgan 1997).

1.4 Tsükliin-sõltuvate kinaaside aktivatsioon ja spetsiifika

Lisaks tsükliiniga seondumisele reguleerivad CDK-i aktiivsust ka selle alühiku aktiivse ala läheduses esineva kindla treoniini jäägi fosforüleerimine CDK-i aktiveeriva kinaasi poolt (CAK), mis on iseloomulik enamusele CDK-dele (joonis 3). Selline fosforüleerimine muudab CDK-i tuuma komformatsiooni lisaks tsükliini interaktsioonist tulenevale muutusele (Arellano and Moreno 1997; Morgan 1997). Kuna kinaaside N-terminaalne ots ja C-terminaalne ots on struktuuris suhteliselt lähestikku, siis moodustavad nad piirkonna, kus ATP istub hästi nende lõikude vahele nii, et fosfaadid on suunatud aktiivsaidist väljapoole. Fosforüleeritava valguga seondues aktiivsait asetseb see just fosfaatide lähedusse ning substraatide selline orientatsioon võimaldab γ -fosfaadi ülekannet valguga fosforüleeritava aminohappe jäägi hüdroksüülrühma külge (Morgan 2007). Aktiivset tsükliin-CDK kompleksi inaktiveerivad peamiselt tsükliin-sõltuva kinaasi inhibiitorid (CKI), kuid ka N-terminaalses regioonis paikneva inhibitoorse fosforüleerimis-saidi fosforüleerimine (joonis 3) (Morgan 1997).

Peamine CDK-i kompleksi substraadi spetsiifilisus tuleneb seondunud tsükliinist. B-tüüpi tsükliinidel on järjestuses hüdrofoobne ala, mis seob substraadi RxL (x tähistab mistahes aminohappe jääki) motiiviga (Adams, Sellers et al. 1996). Selline hüdrofoobne ala on mõningate tsükliinide korral oluline substraadi selektsioonil, näiteks Clb5-Cdk1 kompleksil, mis on aktiivne S faasi alguses pagaripärmi rakkudes. Muteerides tsükliini hüdrofoobse ala või substraadi RxL motiivi, vähendab see drastiliselt nende vahelist interaktsiooni (Archambault, Buchler et al. 2005). CDK-id on valkude perekond, mis on proliin-suunatud kinaasid. Nende eelistatuid fosforüleerimisala on järjestusega S/T-P-x-K/R, kus x võib olla mistahes aminohappe jääk, kuid piisavaks järjestuseks on ka S/T-P. Nendel järjestustel lisatakse fosfaat, kas seriini või treoniini jäägi külge (Morgan 1997).

1.5 Tsükliin-sõltuva kinaasi inhibiitorid (CKI)

CDK-i aktiivsus tõuseb hilises G_1 faasis, kui G_1 tsükliinide kontsentratsioon rakus suureneb ja tsükliin-sõltuvate kinaaside inhibiitorid lagundatakse. CDK-i aktiivsus langeb jällegi rakutsükli lõpus. CKI-id interakteeruvad CDK-idega, et nende aktiivsust vähendada, kontrollides nii õigeaegset substraatidele fosforüleerimist ning seega ka korrapärasest faaside ajastust (Schwob, Bohm et al. 1994). Imetajate rakkudes on leitud kahte tüüpi CKI-d, Cip/Kip ja Ink4 perekonda kuuluvad inhibiitorid, mille kaudu rakutsükli kulgu aeglustatakse vastavalt rakusisestele ning – välistele signaalidele. Cip/Kip rühm inhibeerib Cdk2- ja Cdk4/6-tsükliini komplekse, mis on seotud G_1 ja G_1/S faasidega. Ink4 grupp on spetsiifiline vaid Cdk4/6-tsükliin D kompleksile. *S.cerevisiae* rakkudes on identifitseeritud 3 CKI-it: Far1, mis inhibeerib Cln-Cdk1 komplekse aidates kaasa G_1 arestile feromooni signaali olemasolul (Peter and Herskowitz 1994), Sic1, mis mängib olulist rolli S faasi ajastamises, inhibeerides Clb5,6-Cdk1 kompleksi, Pho81, mis inaktiveerib Pho85-Pho80 kompleksi fosfaadi defitsiidi korral. Sic1-e korral on eriomaseks inhibitoorseks alaks 70 C terminaalset aminohappe jääki (Joonis 5) (Morgan 1997). N-terminaalne fragment on vajalik Sic1-e seandumiseks Cdc4-ga, mille tulemusena hiljem inhibiitor lagundatakse (Verma, Feldman et al. 1997).

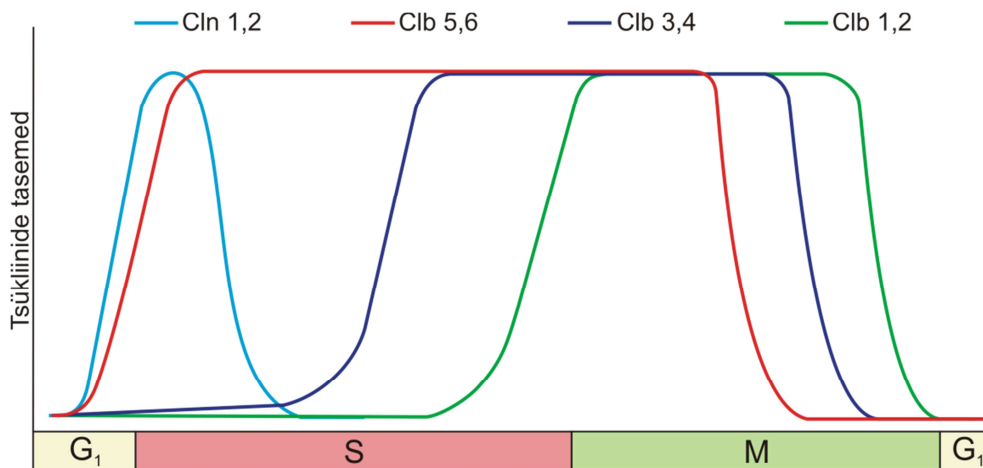


Joonis 5. Sic1-e fosforüleeritavad aminohappejäägid, RxL motiivid ning N-terminaalne ja C-terminalne ala. Sinisega on märgitud N-terminaalne ala, mis on vajalik degradatsiooniks, inhibitoorne ala on märgitud kollaselt. RxL motiivid on vajalikud Clb-Cdk1 kompleksi sidumiseks ning välja on ka toodud fosforüleeritavad aminohappejäägid, T või S tähistab vastavalt treoniini või seriini, millele järgneb järjenumbr (Hodge and Mendenhall 1999).

1.6 Rakutsükli G₁/S üleminek pärmis (*Saccharomyces cerevisiae*)

Faasidevahelised üleminekud on rakkudes reguleeritud väga rangete signaalidega. Far1 on valk, mida pärmis rakkudes ekspresseeritakse vaid feromooni juuresolekul. Sellisel juhul jäävad rakud G₁ faasi aresti, kuna Far1 inhibeerib Cln-Cdk1 komplekse. Kuid olenemata feromooni signaalist, on rakkudes rakutsükli alguses ekspresseeritud CDK-inhibiitorvalk Sic1 (Cross, Schroeder et al. 2007). Sic1 on tsükliin-sõltuva kinaasi inhibiitor, mis reguleerib punguva pärmis rakkude G₁/S faasi üleminekut, seondudes B-tüüpi tsükliin Clb-Cdk1 kompleksidega hilises G₁ faasis. Sic1 sisaldab Cdk1 jaoks üheksat, Ser/Thr-Pro, fosforüleeritavat järjestust (joonis 5) (Hodge and Mendenhall 1999). Nendest osade fosforüleerimine on degradeerimise initsiatsiooniks olulisem (Koivomagi, Valk et al. 2011). G₁ faasi lõpus tõuseb märgatavalt Cln tsükliinide kontsentratsioon, mis viib kõrgemale Cln-Cdk1 kompleksi aktiivsusele (joonis 6). Aktiveeritud kompleks fosforüleerib sellele omased, mõned, Sic1-e järjestuses esinevad fosforüleerimis-saidid, mis jäävad Clb-Cdk1 kompleksile seondumist soodustavateks motiivideks. Seejärel kasvab S tsükliinide (Clb5) kontsentratsioon S faasi alguses (joonis 6) ning Clb-Cdk1 kompleks fosforüleerib Sic1-e järgnevad fosforüleerimisjärjestused, kasutades siis juba paremaks seondumiseks eelnevalt Cln-Cdk1 kompleksi poolt fosforüleeritud saite. Seejuures on Clb-Cdk1 kompleks võimeline substraadiga seotuks jääma peale eelneva fosfaadi lisamist, tehes sellega järgmise fosfaadi lisamise kiiremaks. Clb-Cdk1 kompleks vabaneb peale Sic1-e degradatsiooni ning selle aktiivsus on vajalik S faasis DNA replikeerimiseks ning arvatakse, et see võib olla G₁/S lülituse initsiatsiooniks (Nash, Tang et al. 2001). Ka Cln-Cdk1 kompleksi üheks eesmärgiks on Sic1-e fosforüleerimine, kuid erinevalt B-tüüpi tsükliinidest Cln tsükliinid lagundatakse S-faasi alguses (Enserink and Kolodner 2010). Rakkudes, kus Sic1-te ekspresseeritakse normaalsest vähem, algab DNA replikatsioon varem ning S faas on tavapärasest pikem (Nugroho

and Mendenhall 1994). Samas on ka leitud, et rakkudes, kus Sic1-te ei lagundata, on kauem esinev G₁ faas võrreldes tavalist tüüpi rakkudega (Verma, Annan et al. 1997). Sic1 valgul on täheldatud sarnast inhibitoorse ala struktuuri imetajate p27^{KIP1} valguga, kuigi aminohappeline järjestus ei ole sarnane (Schwob, Bohm et al. 1994).



Joonis 6. Tsükliinide tasemed *S.cerevisiae* rakutsükli vältel. Cln1,2 on G₁/S tsükliinid, Clb5,6 on ekspresseeritud S faasis ning lagundatakse alles M faasis, Clb 3,4 tase kasvab S faasi keskel ning need jäävad kuni hilise M faasini, Clb1,2 kontsentratsiooni kasvab M faasi alguses ning langeb faasi lõpus (Morgan 2007).

1.7 Sic1-e degradatsioon

Sic1 degradeerumiseks on vajalik selle multifosforüleerimine, kuna juhul kui piisaks ühest fosforüleerimisest selle lagundamiseks, siis võiks juba väike CDK-i aktiivsuse kõikumine viia DNA replikatsioonile või selle pooleli jätmisele. Sellise juhu tekiks ka väga kiiresti CDK-i aktiivsuse kasvust sõltuvuse nõrgenemine, kuna fosforüleeritavat Sic1-te jääks järjest kohe peale esimese fosfaadi liitmist vähemaks. Kuna Sic1-te multifosforüleeritakse, siis on ka vajalik märgatav CDK-i aktiivsus, sest madala aktiivsuse korral ei suudeta piisavalt fosfaate Sic1-e külge siduda ning fosfataas võtab ka sama aegselt fosfaate vähemaks. Alles kinaasi aktiivsuse tugeval suurenemisel suudab see lisada Sic1-e külge kiiresti mitu fosfaati ning siis tunneb ka lagundav kompleks Sic1-e ära. Väga kõrgel kinaasi aktiivsusel tekib olukord, kus kinaasi aktiivsuse muutus ei oma olulist rolli. See on tingitud süsteemi bistabiilsusest, mis tähendab, et väga madalatel ega kõrgetel kinaasi aktiivsustel ei ole tugevat fosforüleerimise sõltuvust kinaasi väiksest aktiivsuse muutusest. Selleks, et Sic1-te ei lagundataks eksikombel ja esineks mitme

fosfaadi lisamine on Sic1-e järjestuses mitu vähese affiinsusega fosfosaiti SCF kompleksi (Sic1-e lagundaja) jaoks. Multifosforüleerumine on levinud nähtus mitmete valgu kinaside substraatide seas (Morgan 2007). Arvatavasti kõige olulisem multifosforüleerimise funktsioon on üheselt mõistetav ning tugev signaal. Kuna kinaasid ning fosfataasid mõjuvad substraatidele üheaegselt moodustades dünaamilise tasakaalu, siis teatud kriitilisest kinaasi kompleksi kontsentratsioonist tõuseb Sic1-e lagundamine drastiliselt (Nash, Tang et al. 2001).

1.8 Tuleviku suunad vähi ravimites

Mitmed Cdk1 valgu funktsioonid on väga olulised rakutsükli kontrollis. Kõrvalekalle Cdk1 aktiivsuses nii tõusuna kui ka langusena põhjustab genoomset ebastabiilsust kaasates häiritust organismi talitluses. Praeguseks on põhjalikult uuritud Cdk1 aktiivsust ning selle aktivaatoreid nagu tsükliinid ning tsükliin-sõltuvate kinaaside aktivaatorkinaasid, kuid palju vähem on uuritud selle substraate. Tähtis aspekt CDK-ide puhul on see, et need on vajalikud rakutsükli regulatsioonil kõikide eukarüootide puhul ning kõrvalekalded nende aktiivsuses on seotud kasvajate tekkega. Peamine häiritus on seotud tsükliin-sõltuvate kinaaside inhibiitorite talitluses viies ebakorrekse CDK-ide aktiivsusele (Enserink and Kolodner 2010). Ideaalne ravim oleks spetsiifiline vaid häiritud talitlusega rakkudele ning jätaks terved rakud puutumata, samas on oluline eemaldada kõik vigased rakud. Hetkel kõige efektiivsemaks raviks on haigete rakkude füüsiline eemaldamine, kuid see eeldab nende mitte laialdast levikut. Kasutatakse ka ravimeid, mis inhibeerivad DNA sünteesi, kuid praegustel ravimitel on tihti tõsiseid kõrvalmõjusid (Morgan 2007). Võimalik on, et Cdk1-e geneetilise võrgustku täpsem tundma õppimine võimaldab arendada ravimi, mis CDK-i inhibiitori kaudu kutsub esile vähi rakkude surma. Selliselt oleksid ravimid personaalsemad, vähem toksilised ning efektiivsemad (Enserink and Kolodner 2010). Üheks ravi võimaluseks on ka geeniteraapia, kus defektne geen vahetatakse välja normaalse talitlusega geeni vastu, kuid siiani pole geeni asendamiseks leitud efektiivset meetodit (Morgan 2007).

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Bakteri- ja pärmütüved, söötmed ning kasvutingimused

Eksperimentides kasutati *Escherichia coli* (*E.coli*) tüvesid DH5 α [*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ *M15*) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*], Invitrogen] ning BL21(DE3)-RP [B, F⁻, *ompT*, *hsdS*(r_B⁻, m_B⁻), *dcm*⁺, *Tet*^r, *gal*, λ (DE3), *endA*, *Hte*, (*argU proLCam*^r), Stratagene].

Bakterikultuure kasvatati *Luria Bertani* (LB) vedel- või tardsöötme [10 g/l trüptooni (BD Biosciences), 10 g/l NaCl (Naxo), 5 g/l pärmiekstrakti (BD Biosciences), tardsöötme korral lisaks 2% agar (BD Biosciences)] 37°C juures. Selektiivsuse tagamiseks lisati söötmetesse vastavalt vajadusele antibiootikume [ampitsiliin, kanamütsiin, klooramfenikool (AppliChem)] lõppkontsentratsiooniga 0,1 mg/ml.

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

Pärmikultuure kasvatati YPD vedel- või tardsöötme [10 g/l pärmiekstrakti (BD Biosciences), 20 g/l peptooni (BD Biosciences), 20 g/l glükoosi (AppliChem), tardsöötme korral lisaks 2% agar (BD Biosciences)] 30°C juures. Galaktoosi promootori indukstsiooniks kasutati YPR vedel- või tardsöödet [10 g/l pärmiekstrakti, 20 g/l peptooni, 20 g/l rafinoosi (Naxo), tardsöötmes lisaks 2% agarit], millesse oli lisatud 2% lõppkontsentratsiooniga galaktoosi. Transformatsiooni järgselt kasutati pärmirakkude selektiivseks kasvuks uratsiilita tardsöödet [7g/l pärmi lämmastikalust (YNB) ilma aminohapeteta (BD Biosciences), 0,77 g/l CSM-URA (MP Biomedicals), 20 g/l glükoosi, 50 mg/l adeniini (AppliChem), 50 mg/l trüptofaani (AppliChem) ja 2% agarit (BD Biosciences)].

2.2 Plasmiidid ja vektorid

Käesolevas töös kasutati bakteriaalse ekspressiooni vektorina pET28a(+) (Invitrogen), mis võimaldas 6xHIS tag'ga valkude ekspressiooni T7 promootori alt.

Pärmütüvede tegemisel kasutati genoomi integreeruvat vektorit Ylplac211, millesse kioneeriti Sic1-e variandid galaktoosi poolt indutseeritavate promootorite kontrolli alla.

2.3 Kloneerimine

PCR reaktsioonil kasutati *Phusion*TM polümeraasi (Finnzymes). Termotsüklerina kasutati *Eppendorf Mastercycler*[®] *personal* masinat. Vajalikud oligonukleotiidid telliti firmast *Microsynth*.

PCR-i reaktsioonid viidi läbi 25 ul mahus.

Reaktsioonisegu (lõppkontsentratsioonidena): 1x reaktsioonipuhver HF (Finnzymes), 0,25 mM nukleotiide [dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Thermo Scientific)], 500 nM *forward* ja 500 nM *reverse* praimerit, 1 ühik *Phusion* polümeraasi, 1-10 ng plasmiidset DNA-d ja lõppmahuni lisati ddH₂O-d.

DNA fragmentide amplifitseerimiseks kasutati 35-tsüklilist programmi:

Esmane denaturatsioon:	98°C	5 minutit	
Denaturatsioon:	98°C	30 sekundit	35x
Praimerite seondumine:	48°C	30 sekundit	
Praimerite ekstensioon:	72°C	30 sekundit/1 kb jaoks	
Lõpp-ekstensioon:	72°C	5 minutit	

Amplifikatsioonil saadud produktide puhastamiseks kasutati *PCR Purification Kit*'i (Thermo Scientific) vastavalt tootja juhiste. Produktid lahutati 1% agarosgeelis elektroforeesil 1x TAE puhvril [40mM Tris (AppliChem), 0,12% äädikhape (Naxo), 1mM EDTA (Sigma), pH 8,3]. DNA visualiseerimiseks geelist kasutati etiidiumbromiidi (AppliChem) lõppkontsentratsioonis 0,6 µg/ml ning pikkusmarkerina kasutati *ZipRuler Express DNA Ladder 2* (Thermo Scientific). PCR-i produktide geelist puhastamiseks kasutati Qiagen'i *QIAquick*[®] gel extraction Kit'i vastavalt tootja juhiste.

DNA restrikteerimisel, defosforüleerimisel, ligeerimisel ja katkete täissünteesimisel kasutati *Thermo Scientific* ensüüme ja puhvreid lähtudes tootja poolt toodud instruksioonidele. Reaktsioonid toimusid 37°C juures 1 tundi sobivas puhvril. Kasutatavad ensüümide kogused valiti vastavalt DNA kogusele ja tootaja instruksioonidele. Lineariseeritud vektorite

defosforüleerimiseks kasutati 0,2 ühikut CIAP-i [*Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (Roche)] 1 µg DNA kohta. Restriksioonil saadud fragmentide geelist puhastamiseks kasutati Qiagen'i QIAquick® gel extraction Kit'i.

Ligatsioonireaktsioonides kasutati 3 ühikut T4 DNA ligaasi ning ligeerimise reaktsioonid viidi läbi 1-e kordses T4 DNA ligaasi puhvril, kuhu inserti võeti kaks korda rohkem kui vektorit. Ligatsioonid toimusid 16°C juures üleöö, peale mida reaktsioone kuumutati 65°C juures 15 minutit, et ligaasi inaktiveerida.

2.4 Oligonukleotiid-suunatud mutagenees

Sic1-e mutantsete vormide tegemiseks kasutati oligonukleotiid-suunatud mutageneesi. Esimese etapina oligonukleotiidid kineeriti, mis toimus 45 minutit 37 °C juures. Segu koostis oli 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 425 µM ATP, 6,5 µM oligonukleotiid ja 0,15 U/µl T4 polünukleotidi kinaasi (Thermo Scientific). T4 polünukleotidi kinaasi inaktiveerimiseks kuumutati segu 10 minutit 65°C juures. Oligonukleotiidide seondumiseks üheaheelalisele DNA-le segati kokku 50 ng üheaheelalist DNA-d (ssDNA), 0,5 µl eelnevalt kineeritud oligonukleotidi segu, 1 µl 10x seondumispuhvrit (500 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl pH 7,4, 20 mM MgCl₂) ja ruumala viidi 10 µl-ni ddH₂O-ga. Reaktsiooni segu kuumutati 10 minutit 70°C juures, mille järel tõsteti plokk termostaadist välja ja lasti aeglaselt jahtuda toatemperatuurile, et oligonukleotiidid seonduksid ssDNA-le. SsDNA-le komplemetaarse ahela sünteesimiseks ja otste ligeerimiseks lisati 10 µl-le seondumissegule 1,35 µl 10x sünteesi puhvrit (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 10 mM ATP, 5 mM dNTP segu), 1,5 µl T4 DNA ligaasi aktiivsusega 5 U/µl (Thermo Scientific). Segu inkubeeriti 5 minutit jääl, seejärel 5 minutit toatemperatuuril ja 90 minutit 37°C juures, peale seda lisati segule 5 µl 1xTE lahust (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) ning mutageneesi segu transformeeriti *E.coli* tüvesse DH5α.

2.5 Bakteri- ja pärmirakkudesse transformatsioonid. Plasmiidide eraldamine bakterirakkudest.

Plasmiidese DNA bakterirakkudesse viimiseks kasutati kaalium-kaltsium-magneesium (KCM) meetodit, milleks segati jääl kokku järgnev lahus: 1-5 ng plasmidi, 20µl 5x KCM lahust (0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂, 0,25 M MgCl₂), 100 µl DH5α või BL21(DE)-RP rakke 1x KCM lahuses.

Segu inkubeeriti 20 minutit jääl, seejärel tehti rakkudele 42°C juures termoplokis (Biosan) kuumašhokk: DH5α rakkude puhul 90 sekundit, BL21(DE)-RP rakkude korral 45 sekundit. Peale kuumašhokki viidi transformatsioonisegu 2-ks minutiks jääle, peale seda lisati 500 µl LB söödet. Söötmega segu inkubeeriti 60 minutit 37°C loksutil, tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga 6000 p/min 2 minuti jooksul, seejärel supernatant eemaldati ja rakud suspendeeriti 100 µl-s LB söötmes. Rakususpensioon plaaditi LB tardesöötmega [10 g/l baktotrüptooni (BD Biosciences), 10 g/l NaCl (Naxo), 5 g/l pärmiekstrakti (BD Biosciences), 100 mg/l antibiootikumi, 2% agarit (BD Biosciences)] petri tassidele selektiivsust võimaldavate antibiootikumide juuresolekul. Kolooniaid kasvatati üleöö 37°C juures.

Plasmiidide plajundamiseks ja eraldamiseks kasvatati eelnevalt DH5α rakkudesse transformeeritud plasmiidiga bakterirakkude koloonia sobiva antibiootikumiga LB söötmes üleöö 37°C juures loksutil ning plasmiidide eraldamiseks bakterirakkudest kasutati *Miniprep Kit*'i (Thermo Scientific) vastavalt tootja instruktsioonidele.

Pärmi rakkudesse transformatsioon viidi läbi LiOAc meetodil. Pärmütüvega, millesse transformeeriti, inokuleeriti 5 ml YPD vedelsöödet ning inkubeeriti 30°C juures loksutil üleöö, järgmisel päeval tehti kultuurist lahendus 50 ml YPD söötmesse nii, et rakud poolduksid vähemalt 5 korda. Kultuuri kasvatati optilise tiheduseni 0,6-0,8 OD₆₀₀ juures, seejärel tsentrifuugiti rakud alla 3500 p/min 1 minuti jooksul ning sööde eemaldati. Rakud suspendeeriti 1 ml-s ddH₂O-s ja kanti 1,5 ml tuubi. Suspensiooni tsentrifuugiti 3500 p/min 1 minuti jooksul, supernatant eemaldati ja rakke pesti veel 2 korda 1 ml lahusega I [0,1 mM liitiumatsetaat (Sigma - Aldrich), 5 mM Tris-HCl pH 7,5 (AppliChem), 0,5 mM EDTA (Sigma - Aldrich)] ning tsentrifuugiti 3500 p/min 1 minut. Seejärel võeti sade üles 2 kordses rakkude mahus lahuses I ja inkubeeriti toatemperatuuril 10 minutit, samaaegselt kuumutati 10 mg/ml kontsentratsiooniga *Salmon sperm DNA* lahust (ssDNA) (Sigma - Aldrich) 10 minutit 100°C juures. Peale kuumutamist pandi ssDNA jääle. Transformatsiooniks segati 1,5 ml tuubis kokku järgnev segu: 100 µl pärmi rakkude lahust, 10 µl ssDNA, 0,1-1 µg plasmiidi. Saadud segule lisati 700 µl lahust II [0,1 mM liitiumatsetaat, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 40% PEG (Sigma – Aldrich)] ja 48 µl DMSO-d (AppliChem) ning suspendeeriti. Järgnevalt inkubeeriti transformatsioonisegu 42°C juures 40 minutit ja tsentrifuugiti 6000 p/min juures 30 sekundit. Supernatant eemaldati ja rakke pesti 1 ml 1xTE puhvriga (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA), tsentrifuugiti 3500

p/min 1 minut. Supernatant eemaldati ja rakud suspendeeriti 200 ul 1x TE puhvris ning pladiti välja sobiva tardsöötmege petri tassidele. Rakke kasvatati plaatidel 30°C juures kuni kolooniate ilmumiseni.

2.6 6xHis-tag'iga valkude ekspresseerimine ja puhastamine

Valgu ekspresseerimiseks kasutati BL21(DE)-RP rakke ja pET28a bakteriaalset ekspressiooni vektorsüsteemi. Selleks transformeeriti neisse huvipakkuvat valku kodeeriva järjestusega plasmidi ning selektiivselt tassilt külvati üks koloonia 5 ml-sse antibiootikumiga LB söötmesse. Kultuuri kasvatati üleöö 37°C loksutil ning järgmisel päeval tehti 250 kordne lahjendus 50 ml-sse antibiootikumiga LB söötmesse, kasvatati kuni optilise tiheduseni 0,6 - 0,8 OD₆₀₀ juures. Kultuurile lisati IPTG (Biosolve) lahust lõppkontsentratsiooniga 1 mM, indutseeri 3 tundi 37°C loksutil, peale seda kultuure tsentrifugeeriti 5100 p/min 10 minuti jooksul 4°C ning sööde eemaldati. Tuubid kuivatati ja rakusade külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -80°C juures kuni edasise kasutamiseni.

Bakterist valkude puhastamiseks lisati 50 ml kultuurist saadud rakusademetele 1 ml lüüsipuhvrit [300 mM NaCl (Naxo), 25 mM HEPES (AppliChem) pH 7,4, 10% glütserool (AppliChem) 500 ühikut Dnase I (Calbiochem), 1 µg/ml pepstatiin A (Sigma – Aldrich), 1 µg/ml leupeptiin (Sigma – Aldrich), 1 µg/ml a protiniin (Sigma – Aldrich), 1 mM PMSF (Sigma – Aldrich), 1 mg lüsotsüümi (Sigma – Aldrich)]. Lüüsipuhvris suspendeeritud bakterirakud tõsteti uude 2 ml tuubi ning lüüsimine toimus 4°C juures rotaatoril 20 minuti jooksul. Peale seda lüsaat sonikeeriti *Bandelin Electronic Sonoplus UW 2070* sonikaatoriga 3 korda 30 sekundit 50 % võimsuse juures (1 minutilise vahega, millal lüsaati jahutati jääl). Järgnevalt lüsaate tsentrifugeeriti lauatsentrifugeerimis 4°C juures 14 000 p/min 10 minuti jooksul ning saadud supernatant kanti eelnevalt ettevalmistatud kolonni, millest lüsaat voolutati läbi gravitatsiooni toimel.

6xHIS tag'iga valkude sidumiseks kasutati kolonnide täidiseks *Chelating Fast flow Sepharose* (GE Healthcare). 2 ml kolonnidesse kanti 200 ul 50% sefaroosi lahust 20% etanoolis, mis andis maatriksi (kolonni) ruumalaks 100 ul. Esmalt pesti kolonnis olevat sefaroosi 500 ul ddH₂O-ga (5-e kordne kolonni ruumala), kui vesi oli läbi jooksnud, kanti kolonni 100 ul (1-e kordne ruumala) 200 mM CoCl₂ lahust. Kolonni pesti veel kord 500 ul ddH₂O-ga ning 1 ml (10-e kordne ruumala) lüüsipuhvriga. Peale lüsaadi läbi jooksmist ja valkude seondumist pesti kolonni 5x 1 ml

pesupuhvriga [25 mM HEPES (AppliChem) pH 7,4, 300 mM NaCl (Naxo), 10% glütserool (AppliChem)] ning seondunud 6xHIS tag'iga valgud elueeriti 4 x 100 ul mahus elueerimispuhvriga [25 mM HEPES (AppliChem) pH 7,4, 300 mM NaCl (Naxo), 10% glütserool (AppliChem), 200 mM imidasool (AppliChem)].

Puhastamise edukust ja valkude puhtust kontrolliti naatriumdodetsüül-poliakrüülamiid geelelektroforeesi (SDS-PAGE) meetodil.

2.7 Naatriumdodetsüül-poliakrüülamiid geelelektroforees, valkude visualiseerimine ja kontsentratsiooni määramine.

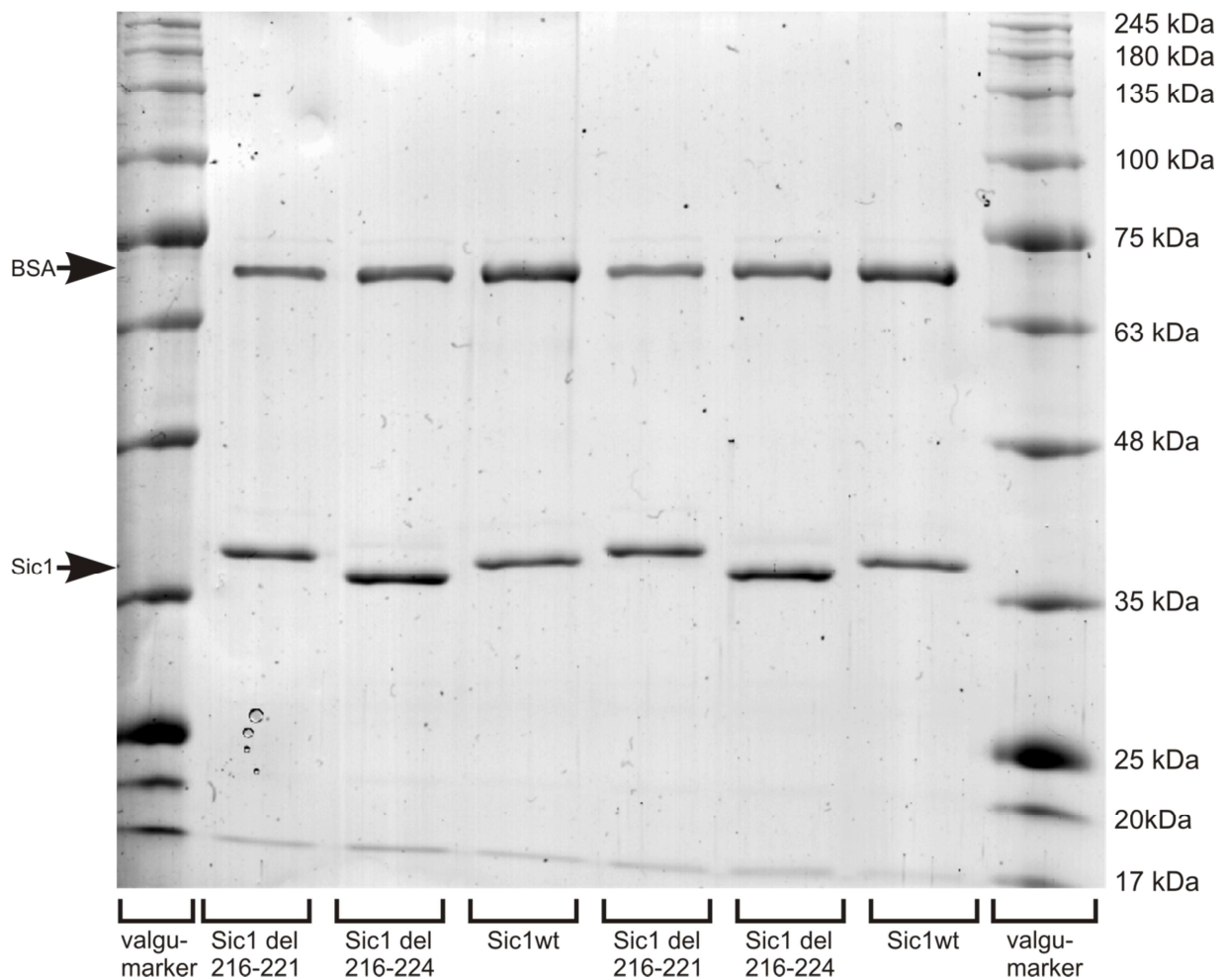
Valkude lahutamiseks ja visualiseerimiseks kasutati SDS-PAGE meetodit, milleks valgulahused viidi esmalt 1-e kordsesse SDS-puhvrisse [6 µM Tris-HCl pH 6,8 (AppliChem), 17 mg/ml SDS (naatriumdodetsüülsulfaat, Bio-Rad), 5% glütserool (AppliChem), 0,1 M DTT (AppliChem), 20 µg/ml broomfenool sinine (Bio-Rad)]. ja proove keedeti 100°C juures 5 minutit. Valguproovid kanti 10%-lisele vertikaalsetele 10x8 cm suurustele poliakrüülamiidi geelidele ning valkude lahutamine geelis toimus voolutugevusel 15 mA geeli kohta. Elektroforees peatati kui bromofenoolsinise front oli jõudnud 1 cm kaugusele geelide alumisest servast. Suurusmarkerina kasutati *Blue Protein Ladder Prestained, ready-to-use*, 10-245 kDa (Naxo).

Valkude visualiseerimiseks viidi poliakrüülamiid geelid peale elektroforeesi *Coomassie Brilliant Blue R-250* värvilahusesse [2,5 g/l CBBR (AppliChem), 454 ml/l metanool (Lachner), 92 ml/l äädikhape (Lachner)]. Lahus kuumutati mikrolaineahjus ligikaudu 70°C-ni ning värvimine toimus 20 minuti jooksul orbitaalsel loksutil. Peale seda tõsteti geelid värvist värvitustamise (destain) lahusesse (454 ml/l metanool, 75 ml/l äädikhape) mida kuumutati 70°C-ni ning geelid jäeti sinna kuni esimeste valguvöötide ilmumiseni. Seejärel tõsteti geelid ddH₂O-sse ning loksutati kuni värvitustamise lõpetamiseni.

Valgu kontsentratsiooni määramiseks mõeldud poliakrüülamiid geelid värvit *Coomassie Brilliant Blue G-250* värvilahusega [1,2 g/l CBBG (AppliChem), 200 ml/l metanool (Lachner), 117,6 ml/l fosforhape (Naxo), 100 g/l (NH₄)₂SO₄ (AppliChem)]. Peale elektroforeesi tõsteti geelid esmalt 20 minutiks fikseerimislahusesse [30% etanool, 10% äädikhape (Lachner)] ning

järgnevalt kanti geelid *Coomassie Brilliant Blue G-250* vävilahusesse, kuhu need jäid 60 minutiks. Geelide värvitustamiseks kasutati ddH₂O-d.

Valgu kontsentratsioonide määramiseks võrreldi Sic1 mutantide hulka kindla BSA kogusega 10%-lises polüakrüülamiidi geelides (joonis 7). Selleks tehti kindla kontsentratsiooniga (20 mg/ml) BSA lahusest (Thermo Scientific) lahjendused ning nendest kanti geelidele koos Sic1-e variantidega kindel kogus valku. *Coomassie Brilliant Blue G-250* vävilahusega värvitud geelid digitaliseeriti kasutades *EPSON Expression 1680 Professional* masinat ning saadud piltidel määrati valgu kogused BSA ja Sic1 valgu vöötides, kasutades selleks *ImageQuant TL* (Amersham Biosciences) tarkvara.



Joonis 7. Sic1 mutantide kontsentratsioonigeel. Geeli ülaosas jooksevad BSA valgud lahjenduste reas 200 ng, 300 ng, 400 ng, 200 ng, 300 ng, 400 ng alustades vasakult. Geeli keskel olevad valgurajad on Sic1-e mutandid, valkude täpsustus on toodud geelipildi all.

2.8 *In vitro* inhibitsioonikatsed

Üldine inhibitsioonikatse (20 µl mahus) segu oli järgneva koostisega: [50 mM HEPES pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 20 mM imidasool, 2% glütserool, 2 mM EGTA, 0,2 mg/ml BSA, 500 nM Cks1 ja 500 µM ATP (lisatud γ-³²-P ATP (Perkin Elmer)]. Inhibitsioonikatse jaoks kasutati Sic1 valku kontsentratsiooni vahemikus 0,03 nM kuni 1000 nM. Samuti tehti kaks kontrollreaktsiooni ilma Sic1 valguta. Clb5-Cdk1 kompleksi jaoks kasutati substraadina histoon H1 (Upstate) lõppkontsentratsioonis 2.5 µM. Kinaasikompleksi kontsentratsioon oli katsetes 5 nM. Reaktsiooni alguses lasti moodustuda inhibitoorse Sic1-e ja Clb5-Cdk1 kompleksil 2 minuti jooksul ning reaktsioonid alustati H1 lisamisega. Katsest võeti 7-ndal ja 14-ndal minutil 8 ul segu ja reaktsioonid peatati SDS-laadimispuhvriga. Valgud lahutati 10% SDS-polüakrüülamiidgeelil, peale seda geelid värviti, kuivatati ja signaalid detekteeriti ning visualiseeriti kasutades *Typhoon Trio* skannerit (GE Healthcare). Andmete analüüsiks kasutati *GraphPad Prism* 5.0 tarkvara.

2.9 Pärmirakkude elumuse uurimine lahjendusriidadega

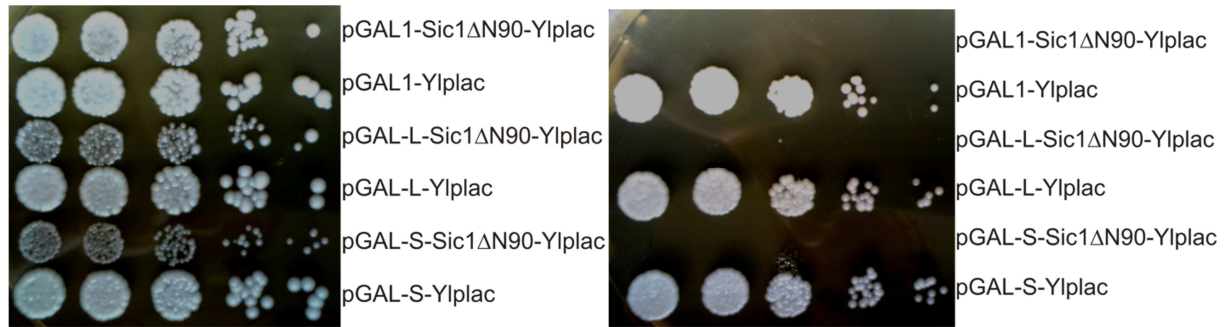
Pärmitüved külvati YPR vedelsöötmesse (10 g/l pärmiekstrakti, 20 g/l peptooni, 20 g/l rafinoosi (Naxo)) ning kasvatati üleöö tiheduseni ~0,3 OD₆₀₀ juures, seejärel tehti kasvavast kultuurist lahjendusread alustades rakutihedusest 10⁶ rakku/ml kohta. Edasi tehti esialgsest rakukultuurist lahjendusread, milles oli lõplik rakutihedus vastavalt 5x10⁵, 10⁵, 10⁴ ja 2000 rakku/ml kohta. Saadud lahjendusriidadest pipeteeriti paralleelselt 5 µl YPD või YPG tahkesöötmega petri tassile. Rakke kasvatati 48 tunni jooksul 30°C juures.

3 TULEMUSED JA ARUTELU

Käesoleva töö praktilises osas alustati *in vivo* mudelsüsteemi loomist, mis võimaldaks detailsemalt uurida ja kirjeldada pagaripärmi näitel eukarüootse rakutsükli G₁/S faasi üleminekut. Kuna eelnevatest töödest (Mendenhall 1993; Schwob, Bohm et al. 1994; Feldman, Correll et al. 1997; Koivomagi, Valk et al. 2011) on teda, et G₁ faasist S faasi üleminek on reguleeritud *S.cerevisiae* rakkudes proteinkinaasi Cdk1 ja selle inhibiitorvalgu Sic1-e vahelise tasakaaluga, siis otsustati kõigepelast varieerida Sic1 kontsentratsiooni pärmi rakkudes.

Kirjandusest on teada, et Cdk1 inhibitsiooni eest vastutavad Sic1-e valgus viimased 70 C-terminaalset aminohappe jääki (Hodge and Mendenhall 1999). Lisaks on varem avaldatud töödes (Verma, Feldman et al. 1997; Nash, Tang et al. 2001) näidatud, et valgu Sic1 degradatsiooni eest vastutab selle N-terminaalne Cdk1 fosforüleerimis-saite sisaldav regioon. Kõnealune regioon hõlmab esimesi 90 aminohappe jääki Sic1-e järjestuses. Nendest tulemustest lähtudes otsustati luua stabiilne (degradeerumatu), kuid samas inhibitsioonivõimeline variant Sic1 valgust ning kontrollides ja varieerides sellise inhibiitori ekspressiooni rakkudes loodeti mõjutada G₁/S faasi ülemineku pikkust ning jälgida Cdk1 kinasi markervalkude fosforüleeritust ja DNA kahekordisutmist (kui S-faasile iseloomulikku tundemärki) pärmi rakkudes. Selleks kloonitati Sic1ΔN90 valgu kodeeriv DNA järjestus pärmi genoomi integreeruvasse Y1plac sarja vektorisse erineva tugevusega indutseeritavate promotorite kontrolli alla. Promootoriteks valiti pärmis galaktoosi toimel indutseeritavad pGAL promootorite erinevad variandid. Reastatud vastavalt ekspressiooni tugevusele: pGAL1, pGAL-L ja pGAL-S (nõrgenevas järjekorras alustades vasakult) (Janke, Magiera et al. 2004). Sic1ΔN90 mittedegradatuva vormiga loodeti luua olukord, kus indutseeritud ekspressiooniga inhibiitor oleks nihutanud normaalselt rakus oleva Cdk1 ja Sic1-e poolse tasakaalu inhibiitori kasuks, pikendades sedasi G₁/S faasi üleminekut ja rakutsüklit. Kirjandusest on näiteid, (Hodge and Mendenhall 1999; Nash, Tang et al. 2001) et tugev mittedegradatuva Sic1-e üleekspressioon galaktoosiga pGAL1 promootori alt *S.cerevisiae* rakkudes põhjustab G₁ faasis areteerumise ja rakkude hukku. Testimaks nõrgemate promootorite toimet rakutsüklile ja rakkude elulevusele viidi läbi eksperiment, kus võrreldi pärmitüvede kasvu glükoosiga söötme tassidel (GAL promootorid on inhibeeritud) ning galaktoosiga söötme tassidel (GAL promootorid aktiveeritud) (joonis 8). Rakud, mis

ekspresserisid Sic1 Δ N90 vormi GAL1 promootori alt ei suutnud ootuspäraselt G₁ faasist väljuda ning surid. Sarnaselt mõjus Sic1 Δ N90 ekspresioon pärmi rakkudele, kui selle tase oli allutatud GAL-L või GAL-S promootori kontrollile.

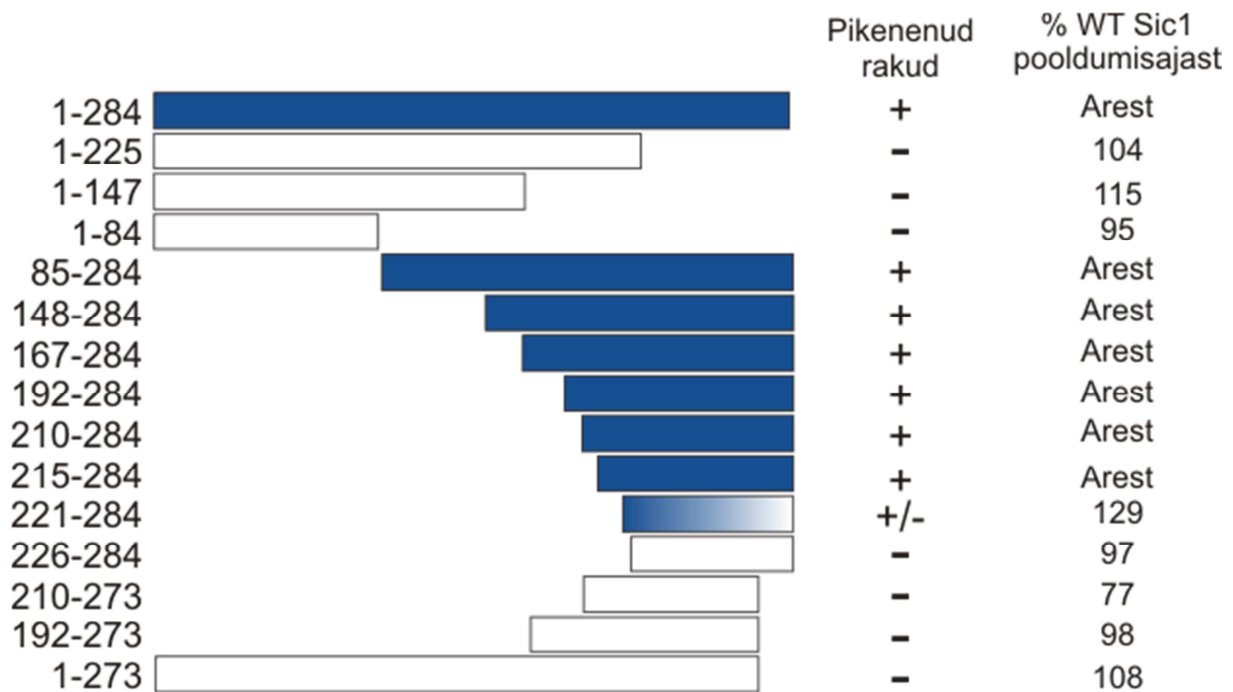


Joonis 8. Erinevate promootoritega Sic1-te ekspresseerivate pämitüvede võrdlus. Vasakpoolsel joonisel on pärmi rakud glükoosiga söötmel. Tüved paiknevad järgnevalt: pGAL1 promootoriga vektor ilma Sic1-ta; pGAL1 Sic1 Δ N90; pGAL-L promootoriga vektor ilma Sic1-ta; pGAL-L Sic1 Δ N90; pGAL-S promootoriga vektor ilma Sic1-ta; pGAL-S Sic1 Δ N90 (alustades ülevalt). Parempoolsel joonisel on pärmi rakud galaktoosiga söötmel (pGAL promootor on aktiveeritud). Tüvede järjestus on sarnane glükoosiga söötme joonisel olevale.

Saadud tulemustest võib järeldada, et katseks valitud erineva tugevusega promootorid on liialt tugeva ekspresiooni tasemega võimaldamaks reguleerida pämirakkude G₁/S faasi ülemineku pikkust proteinkinaasi Cdk1 ja selle inhibiitorvalgu Sic1-e tasemetevahelise tasakaalu nihutamiseks inhibiitori kasuks. Valgu Sic1 Δ N90 tase oli piisavalt kõrge, et peatada rakutsükkel G₁ faasis ja takistada S-faasi alustamist.

Järgnevalt otsustati leida võimalus, kuidas muuta Sic1 Δ N90 valgu inhibitsiooni tugevust ja nihutada sellega tasakaalu Cdk1 aktiivsuse suunas ning võimaldada rakkudel väljuda G₁ arrestist ja siirduda S-faasi. Uurides sellel teemal avaldatud artikleid, leiti Hodge ja Mendenhall'i poolt tehtud töö, milles nad püüdsid määrata Sic1 valgus inhibitsiooniks minimaalselt vajalikku järjestust. Selleks tegid nad katseid erinevate N-terminaalsete ja C-terminaalsete aladega Sic1 valgust (joonis 9) ning ekspresseerisid neid piirkondi GAL1 promootori alt ning jälgisid rakkude fenotüüpi. Kui ekspresseeriti GAL1 promotori alt viimased 70 C-terminaalset aminohappe jääki täheldati pämirakkude aresti G₁ faasis ning järeldati, et esimesed 214 N-terminaalset aminohappe jääki ei oma inhibitsiooni seisukohalt tähtsat rolli. Kui eemaldati veel 6 N-terminaalset aminohappejääki sellest 70 aminohappejäägilisest inhibitoorsest C-terminaalset järjestusest, saadi vähenenud inhibitsiooni võimega Sic1 valk. Selle kinnituseks olid vähesel

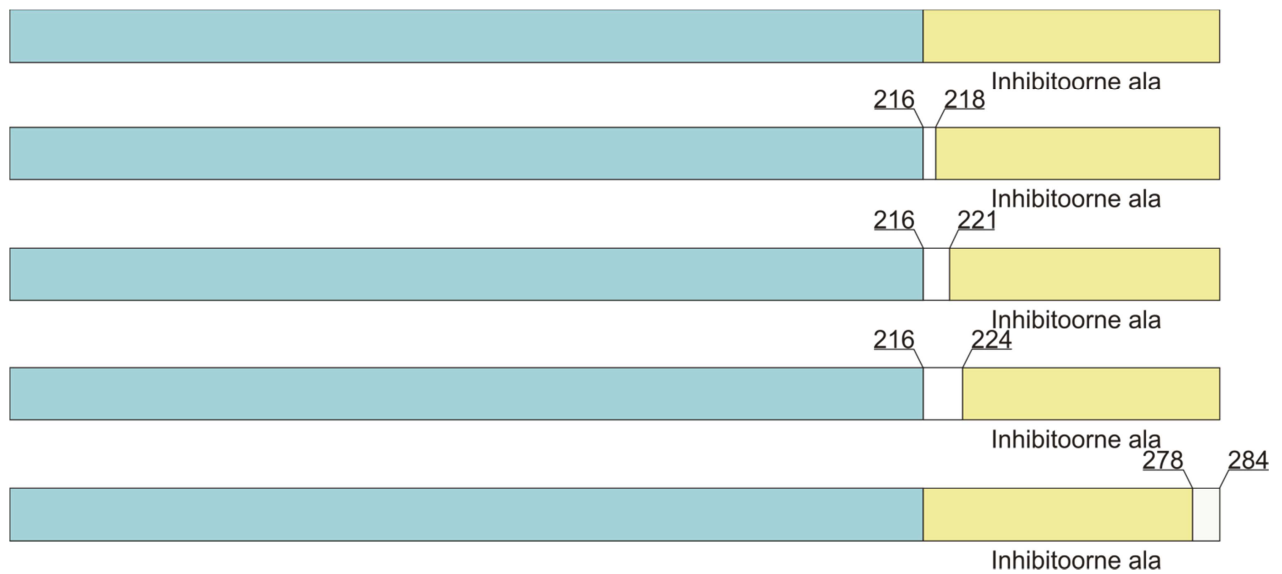
hulgal punguvad rakud pärmikultuuris ja pikenenud rakutsükkel (kuid mitte arest) võrreldes normaalse Sic1-e ekspressiooniga rakkudega. Need tunnused viitavad osaliselt rohkem inhibeeritud Cdk1-le võrreldes metsiktüüpi rakkudega. Kui kärbiti seda osalist inhibiitorit veel 5 aminohappe jäägi võrra N-terminaalsest järjestusest, siis saadi tulemuseks mitteinhibitoorne Sic1. Sellise Sic1-e variandi üleekspressioon ei tekitanud rakkudes aresti ega pikenenud rakutsükli. Rakud käitusid sarnaselt metsiktüüpi rakkudele. Lisaks vaadeldi selles artiklis, kuidas mõjutavad inhibitsiooni viimased C-terminaalsed aminohappe jäägid Sic1-e järjestuses. Katsete tulemustena järeldati, et viimased 11 aminohappe jääki on olulised inhibitsiooni seisukohalt ja nende puudumine ei võimalda Sic1 valgul üleekspressiooni tingimustes käituda inhibiitorina Cdk1-le.



Joonis 9. Punguva pärmirakkude kuju ning pooldumisaja sõltuvus Sic1 valgu stabiilse vormi ekspressioonist rakkudes. Skemaatilised Sic1-e valgu kujutised jäljendavad rakkudes ekspresseeritud Sic1-e fragmente. Värvitud tulpad ning + märgid osutavad fragmentidele, mis põhjustasid GAL1 promootori alt ekspresseeritud valgu tõttu pikenenud kujuga rakke. Valged tulpad tähistavad metsik tüüpi pärmile sarnaselt käituvaid variante ning varjutatud tulp viitab vahepealsele, segatüüpi tunnustele. Rakutsükli pikkus on väljendatud, kui protsent metsik tüüpi pärmirakutsükli ajast (Hodge and Mendenhall 1999).

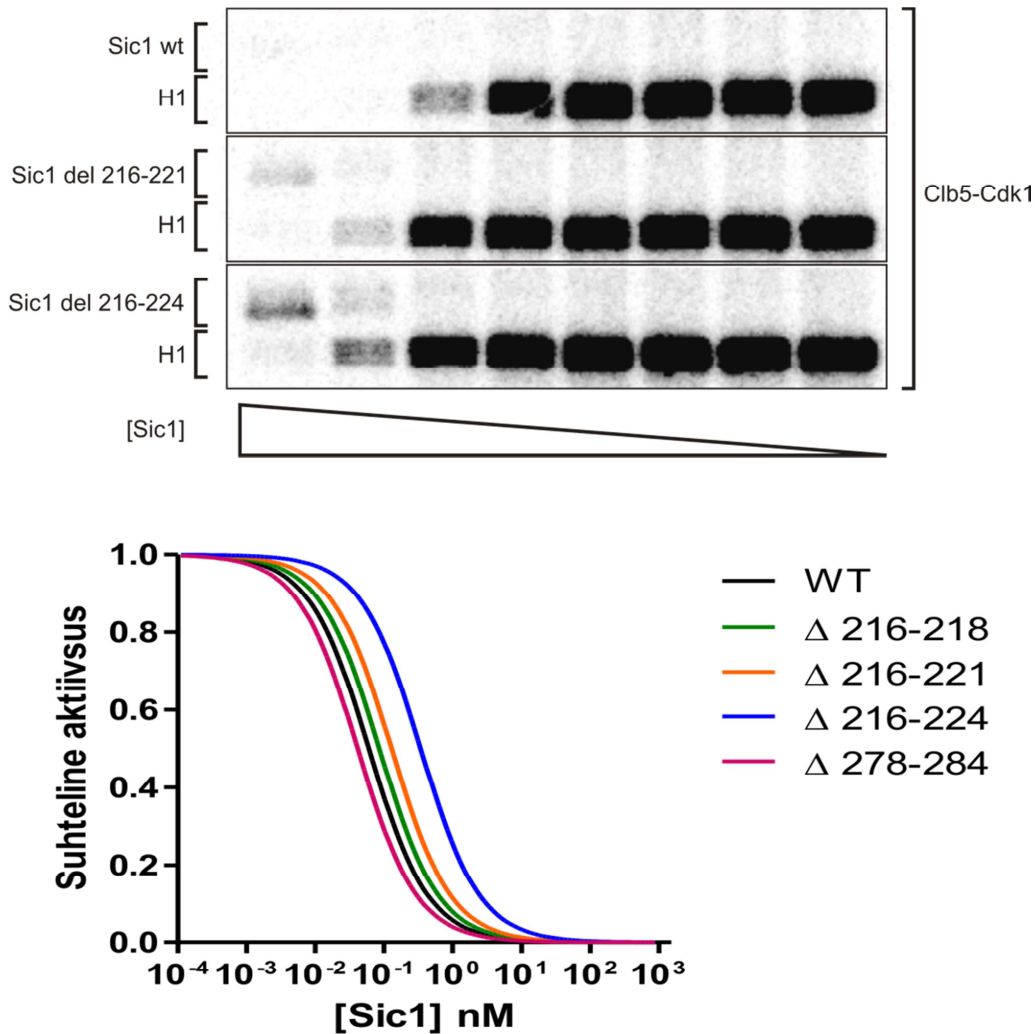
Analüüsid eelnevalt kirjeldatud tulemusi võib väita, et Cdk1 inhibitsiooni eest vastutav ala Sic1-e valgus jääb 215-226 aminohappe jäägi vahele ning lisaks sellele mängivad inhibitsioonis

rolli ka valgu viimased C-terminaalsed aminohappe jäägid. Tuginedes nendele faktidele otsustasime täpsemalt edasi uurida inhibitsiooni eest vastutavaid piirkondi Sic1 valgus. Lootsime, et täpsemad andmed võimaldavad meil disainida erineva tugevusega inhibiitorite variandid rakutsükli S-faasile iseloomulikule Clb5-Cdk1 kompleksile. Selleks disainisime Sic1-e variandid (joonis 10), milles olid vastavalt deleteeritud järgnevad aminohappe jäägid: 216-218, 216-221, 216-224 ning viimase variandina C-terminaalsed aminohappe jäägid 278-284.



Joonis 10. Skemaatiline kujutis erinevatest Sic1 trunkeeritud variantidest. Joonisel on toodud Sic1 metsiktüüpi valgu skeem (ülemine) ning trunkeeringutega mutandid. Numbrid tähistavad aminohappe jääkide järjenumbreid, valgega on toodud trunkeeritud ala ning kollaselt on märgitud inhibitoorne ala.

Iseloomustamiseks mutantsete valkude inhibitsiooni Clb5-Cdk1 kompleksile, puhastasime need mutantsed valgud *E.coli* BL21(DE3)-RP rakkudest ning võrdlesime nende inhibitsiooni metsiktüüpi valgu inhibitsiooniga Clb5-Cdk1 kompleksi suhtes (joonis 11). Inhibitsioonikatsete tulemusena selgus, et viimase 6 C-terminaalse aminohappe jäägi eemaldamine suurendas vastupidiselt ootustele Sic1-e inhibitsiooni Clb5-Cdk1 kompleksi suhtes, samas kui deletsioonid inhibitoorse ala alguses vähendasid vastavalt ootustele Sic1-e inhibitsiooni Clb5-Cdk1 kompleksi suhtes.



Joonis 11. Clb5-Cdk1 inhibeerimine erinevate Sic1 trunkeeritud versioonide poolt. Ülemisel joonisel on toodud geelilt saadud radioaktiivse fosfaadi signaalid. Tugevamad signaalid on iseloomulikud nõrgemale inhibitsioonile, seega suuremale Clb5-Cdk1 aktiivsusele.

Alumisel joonisel on erineva värviga toodud Sic1-e muteeritud valgud: Must - Sic1 metsiktüüpi [$K_i=0,06$ ($\pm 0,01$) nM]; roheline - Sic1 trunkeeritud aminohappejäägid 216-218 [$K_i=0,08$ ($\pm 0,01$) nM]; oranž – Sic1 trunkeeritud aminohappejäägid 216-221 [$K_i=0,13$ ($\pm 0,02$) nM]; sinine – Sic1 trunkeeritud aminohappejäägid 216-224 [$K_i=0,34$ ($\pm 0,08$) nM]; lilla – Sic1 trunkeeritud aminohappejäägid 278-284 [$K_i=0,04$ ($\pm 0,01$) nM].

Nüüd kui meil on olemas muutunud inhibitsiooni tugevusega Sic1-e variandid, alustasime nende viimist pärmirakkudes erineva ekspressiooni tugevusega galaktoosi promootorite kontrolli alla. Järgmise etapina tuleks korrata eelnevalt kirjeldatud rakkude elulemuse katseid, et veenduda kas *in vitro* tingimustes saavutatud inhibitsiooni tugevuse vähenemine on piisav ka *in vivo*

üleekspressiooni tingimustes, et põhjustada rakkudes G_1/S faasi ülemineku pikenemist, aga samas ei tohi Sic1-e poolne inhibitsioon olla nii tugev, et põhjustab rakkude aresti G_1 faasis ning hukkumist. Selline inhibitsiooni tugevuse kontrollimine võimaldab tulevikus muuta G_1/S faasis inhibiitori ja Clb5-Cdk1 vahelisi kontsentratsioone ning annab meile võimaluse detailselt uurida S faasi üleminekul Clb5-Cdk1 poolt vahendatud valkude fosforüleerimist ja selle kaudu G_1/S faasis aset leidvate erinevate protsesside käivitamist.

Tsükliin-CDK kompleksi inhibiitorvalgu Sic1 taseme roll rakutsükli G₁/S lülituses

Sander Pihelgas

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöö teoreetilises osas anti ülevaade eukarüootse rakutsükli regulatsioonist pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* põhjal. Peamiselt keskenduti *S.cerevisiae* rakkudes esinevale tsükliin-sõltuvalle kinaasile Cdk1 ning seda periooditi aktiveerivatele tsükliinidele. Samuti kirjeldati kompleksi inhibeerivat valku Sic1-te ja selle olulisust rakutsükli regulatsioonis.

S.cerevisiae rakkudes on rakutsükli G₁ faasis Clb-Cdk1 kompleks inhibeeritud Sic1 valgu poolt, mis takistab üleminekut S faasi. S faasi initsiatsiooniks on rakkudes vajalik Clb-Cdk1 kompleksi aktiivsuse tõus, mille eelduseks on Sic1-e lagundamine, mis omakorda sõltub inhibiitorvalgu fosforüleeritusest. Sic1-e tavapärasest kõrgem tase üldjuhul peatab rakutsükli ning rakud surevad, kuid selle C-terminaalse ala modifitseerimisel on võimalik muuta G₁/S faasi üleminekut aeglasemaks nii, et see ei oleks letaalseks faktoriks pärmi rakkudele.

Töös tehtud katsetes varieeriti Sic1-e tasemeid *S.cerevisiae* rakkudes, veendumaks, kas ka väiksel promootori ekspressiooni taseme muutmisel rakkutsükkel peatub. Lisaks tehti inhibiitorist modifitseeritud variandid ning võrreldi *in vitro* katsetes inhibitsiooni tugevust metsiktüüpi valguga. Valitud variantidest tehti pärimtived, mida on võimalik edaspidi *in vivo* katsetes kasutada inhibitsiooni testimiseks.

Tulevikus on plaanis uurida põhjalikumalt Sic1 valgus esinevaid Clb-Cdk1 kompleksi inhibitsiooniks vajalikke motiive ja kaardistada C-terminaalses alas olevad piirkonnad, mis on vastutavad tsükliin-sõltuva kinaasi kompleksile seondumiseks. Lisaks on laboris uurimisel C-terminaalse ala lähistel paiknevate fosforüleerimis-saitide (T173, S191) mõju inhibitsioonile.

The role of cyclin-CDK complex inhibitor protein Sic1 levels in the cell cycle G₁/S switch

Sander Pihelgas

SUMMARY

This Bachelor's thesis describes eukaryotic cell cycle regulation on a well-studied model organism *Saccharomyces cerevisiae*. The main focus is on cyclin-dependent kinase Cdk1 and its activating partners, cyclins, which are present in *S.cerevisiae* cells. Also Sic1 protein has been described as an inhibitor of the cyclin-Cdk1 complex and its importance in the cell cycle regulation has been pointed out.

In case of G₁ phase arrest in *S.cerevisiae* cells, the Clb-Cdk1 complexes are inhibited by Sic1 protein and this prevents the start of S phase. The activation of Clb-Cdk1 complexes depends on the degradation of protein Sic1, after which S phase is initiated. Overexpression of the non-degradable cell cycle inhibitor Sic1 stops the cell cycle, but with modifications in its C-terminal region it is possible to extend G₁ phase without completely stopping the cell cycle.

Different levels of Sic1 has been used in experiments, to question if a small change in gene expression levels can slow down the cell cycle. Additionally Sic1 has been modified to create different truncated versions to compare the inhibition of these with wild type protein in *in vitro* experiments. Yeast strains with those inhibitors, which had lower inhibition level, have been made for *in vivo* experiments to study the importance of Sic1 levels in G₁/S transition.

In the future it is planned to further study Sic1 motifs in inhibition of Clb-Cdk1 complexes and to map C-terminal regions that are responsible for binding to cyclin-dependent kinase. Also the effect of phosphorylation sites near C-terminus, namely T173 and S191, to the inhibition is being investigated.

TÄNUAVALDUSED

Esmalt sooviksin tänada juhendajaid Mart Loogi ja Ervin Valku huvitava projekti, meeldiva koostöö ning mõistva suhtumise eest. Samuti tänan juhendamisesse ning koostöösse panustanud Mardo Kõivomägit ja Rainis Ventat. Meeldiva seltskonna ning abivalmiduse eest tänan lisaks eelnevatele Iлона Faustovat, Mihkel Ördi, Rait Kivit ning Jevgeni Mihhejevit.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Sander Pihelgas

(sünnikuupäev: 25. jaanuar 1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Tsükliin-CDK kompleksi inhibiitorvalgu Sic1 taseme roll rakutsükli G₁/S lülituses,

mille juhendaja on Mart Loog,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **29.05.2013**

Kasutatud kirjandus

- Adams, P. D., W. R. Sellers, et al. (1996). "Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors." *Mol Cell Biol* **16**(12): 6623-6633.
- Archambault, V., N. E. Buchler, et al. (2005). "Two-faced cyclins with eyes on the targets." *Cell Cycle* **4**(1): 125-130.
- Arellano, M. and S. Moreno (1997). "Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle." *Int J Biochem Cell Biol* **29**(4): 559-573.
- Brewer, B. J., E. Chlebowicz-Sledziewska, et al. (1984). "Cell cycle phases in the unequal mother/daughter cell cycles of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **4**(11): 2529-2531.
- Cross, F. R., L. Schroeder, et al. (2007). "Phosphorylation of the Sic1 inhibitor of B-type cyclins in *Saccharomyces cerevisiae* is not essential but contributes to cell cycle robustness." *Genetics* **176**(3): 1541-1555.
- Elledge, S. J. (1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis." *Science* **274**(5293): 1664-1672.
- Enserink, J. M. and R. D. Kolodner (2010). "An overview of Cdk1-controlled targets and processes." *Cell Div* **5**: 11.
- Feldman, R. M., C. C. Correll, et al. (1997). "A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p." *Cell* **91**(2): 221-230.
- Forsburg, S. L. (2005). "The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research." *Gravit Space Biol Bull* **18**(2): 3-9.
- Hartwell, L. H. (1978). "Cell division from a genetic perspective." *J Cell Biol* **77**(3): 627-637.
- Hartwell, L. H., J. Culotti, et al. (1974). "Genetic control of the cell division cycle in yeast." *Science* **183**(4120): 46-51.
- Herskowitz, I. (1988). "Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol Rev* **52**(4): 536-553.
- Hodge, A. and M. Mendenhall (1999). "The cyclin-dependent kinase inhibitory domain of the yeast Sic1 protein is contained within the C-terminal 70 amino acids." *Mol Gen Genet* **262**(1): 55-64.
- Janke, C., M. M. Magiera, et al. (2004). "A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes." *Yeast* **21**(11): 947-962.
- Johnson, D. G. and C. L. Walker (1999). "Cyclins and cell cycle checkpoints." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 295-312.
- Joshua Chang Mell, S. M. B. (2002). "Yeast as a Model Genetic Organism." *eLS*. John Wiley & Sons Ltd.
- 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.
- Koivomagi, M., E. Valk, et al. (2011). "Dynamics of Cdk1 substrate specificity during the cell cycle." *Mol Cell* **42**(5): 610-623.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, et al. (2008). *Principles of Biochemistry*. New York, W. H. Freeman and Company.

- Mendenhall, M. D. (1993). "An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*." Science **259**(5092): 216-219.
- Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 261-291.
- Morgan, D. O. (2007). The Cell Cycle. London, UK, New Science Press Ltd.
- Nash, P., X. Tang, et al. (2001). "Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication." Nature **414**(6863): 514-521.
- Nugroho, T. T. and M. D. Mendenhall (1994). "An inhibitor of yeast cyclin-dependent protein kinase plays an important role in ensuring the genomic integrity of daughter cells." Mol Cell Biol **14**(5): 3320-3328.
- Nurse, P. (1975). "Genetic control of cell size at cell division in yeast." Nature **256**(5518): 547-551.
- Nurse, P. and Y. Bissett (1981). "Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast." Nature **292**(5823): 558-560.
- Pardee, A. B. (1974). "A restriction point for control of normal animal cell proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(4): 1286-1290.
- Peng, J., Y. Zhu, et al. (1998). "Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb." Genes Dev **12**(5): 755-762.
- Peter, M. and I. Herskowitz (1994). "Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1." Science **265**(5176): 1228-1231.
- Rickert, P., W. Seghezzi, et al. (1996). "Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II." Oncogene **12**(12): 2631-2640.
- Rosenthal, E. T., T. Hunt, et al. (1980). "Selective translation of mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, *Spisula solidissima*." Cell **20**(2): 487-494.
- Schwob, E., T. Bohm, et al. (1994). "The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*." Cell **79**(2): 233-244.
- Verma, R., R. S. Annan, et al. (1997). "Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase." Science **278**(5337): 455-460.
- Verma, R., R. M. Feldman, et al. (1997). "SIC1 is ubiquitinated in vitro by a pathway that requires CDC4, CDC34, and cyclin/CDK activities." Mol Biol Cell **8**(8): 1427-1437.