

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Mihkel Örd

**Fosforüleeritavate aminohapete paiknemise mõju Cdk1
substraatide multifosforüleerimise dünaamikale**

Bakalaureusetöö

Juhendajad *Ph.D* Mardo Kõivomägi

Ph.D Mart Loog

TARTU 2013

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus.....	5
1 Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1 Eukarüootse rakutsükli kontrollsüsteem <i>Saccharomyces cerevisiae</i> näitel.....	6
1.1.1 Erinevatel protsessidel on erinevad CDK aktiivsuse künnised.....	9
1.2 Cdk1 substraatide äratundmise mehhanismid.....	9
1.2.1 CDK aktiivtsenter fosforüleerib peptiide konsensusmotiiviga S/T-P-x-K/R...	10
1.2.2 Tsükliin-substraat seondumine.....	11
1.3 Multifosforüleerimine rakutsükli regulatsioonis.....	14
1.3.1 Cks1.....	15
1.3.1.1 Tsükliin-CDK-Cks kompleks.....	15
1.3.1.2 Cks1 funktsioon.....	16
2 Eksperimentaalosa.....	19
2.1 Töö eesmärgid.....	19
2.2 Materjal ja meetodika.....	19
2.2.1 Sic1-l baseeruv mudelsüsteem.....	19
2.2.2 Tüved ja söötmed.....	20
2.2.3 Algplasmiid ja ssDNA-d.....	20
2.2.4 Oligonukleotiid-suunatud mutagenees.....	21
2.2.5 Konstruktide tegemine, kasutades polümeraasi ahelreaktsiooni.....	22
2.2.6 <i>E. coli</i> tüvede DH5 α ja BL21 transformatsioon.....	24
2.2.7 6xHis-Sic1 variantide puhastamine.....	24

2.2.8	Teiste His-märgisega substraatvalkude puhastamine	25
2.2.9	<i>In vitro</i> kinaasikatse	25
2.2.10	<i>In vitro</i> kinaasikatsete mass-spektromeetriline analüüs	28
2.2.11	Pärmi elumuse uurimine lahjenduste ridadega.....	29
Tulemused ja arutelu		30
2.2.12	Tsükliin-substraat seondumise mõju fosforüleerimisele sõltub fosforüleerimissaidi paiknemisest seondumismotiivi suhtes.....	30
2.2.13	Erinevate Cdk1 substraatvalkude multifosforüleerimise Cks1-sõltuvus on erinev	32
2.2.14	Cks1-sõltuva multifosforüleerimise efektiivsust mõjutab praimer- ja aktseptorsaidi vaheline kaugus	33
2.2.15	Fosforüleerimissaitide paiknemine mõjutab Cdk1 väljundsignaali <i>in vivo</i>	39
2.2.16	Multifosforüleerimise efektiivsust suurendavad optimaalne aktseptorsait ja tsükliin-substraat seondumine	41
2.2.17	Cks1 ja tsükliin-substraat seondumine võimaldavad protsessiivset fosforüleerimist.....	42
Kokkuvõte		45
Summary.....		47
Kasutatud kirjanduse loetelu		48
Kasutatud veebiaadressid		54
Lisad		55
Lisa 1. Substraadid, mille multifosforüleerimist võiks ennustuse järgi mõjutada Cks1		55
Lisa 2. Koostatud käsikiri, mis sisaldab käesolevas töös saadud tulemusi		56

Kasutatud lühendid

APC – i.k *Anaphase Promoting Complex* (Anafaasi viiv kompleks)

BSA – i.k *Bovine Serum Albumin* (Veise seerumalbumiin)

Cdc - i.k *Cell Division Cycle* (Raku jagunemistsükkel)

Cdh1 – i.k *Cdc20 Homolog 1* (Cdc20 homoloog 1)

CDK– i.k *Cyclin-Dependent Kinase* (Tsükliin-sõltuv kinaas)

Cks – i.k *Cyclin-dependent kinase subunit* (Tsükliin-sõltuva kinaasi subühik)

Cln – i.k *Cyclin* (Tsükliin)

Clb – i.k *Cyclin B* (Tsükliin B)

hpm – i.k *hydrophobic patch mutant* (hüdrofoobse tasku mutant)

K_m – Michaelise konstant

LP motiiv – leutsiini- ja proliinirikas motiiv, mis stimuleerib fosforüleerimist Cln1/2-Cdk1 poolt

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

Ndd1 – i.k *Nuclear Division Defective* (Tuuma jagunemise võimetu)

RxL motiiv – aminohappeline motiiv, milles arginiinile järgneb suvaline aminohape ja leutsiin

SBF – i.k *SCB Binding Factor* (SCB-d siduv faktor)

SCB – i.k *Swi4/Swi6 Cell cycle Box* (Swi4/Swi6 rakutsükli blokk)

SCF – i.k *Skp, Cullin, F-box*

Sic1 – i.k *Subunit Inhibitor of Cyclin-dependent protein kinase 1* (Subühikuline Cdk1 inhibiitor)

Stb1 – i.k *Sin Three Binding protein* (Valku Sin3 siduv valk)

STE – i.k *STERile* (Steriilne)

TFA - trifluoroäädikhape

Sissejuhatus

Tsükliin-sõltuvad kinaasid (CDK-d) on eukariootse rakutsükli kesksed regulaatorid. CDK-d on proteiinkinaasid, mis rakutsükliga seotud valkude fosforüleerimise kaudu kontrollivad rakutsükli kulgemist. Pärmis *Saccharomyces cerevisiae* juhib rakutsükli vaid üks CDK - Cdk1. Cdk1 seondub erinevates faasides mitmete tsükliinidega, mis aktiveerivad kinaasi ja mõjutavad substraatide äratundmist ensüümi poolt. Rakutsükli normaalseks funktsioneerimiseks peab paljude Cdk1 substraatide fosforüleerimine toimuma õigeaegselt ja kindlas järjekorras. Kuna Cdk1 substraatvalkude fosforüleerimise ajastamine mõjutab rakutsükli protsesside kulgemist, on oluline mõista, millise dünaamikaga toimub erinevate Cdk1 substraatvalkude fosforüleerimine. Selleks tuleb uurida Cdk1 kompleksi substraatide äratundmise mehhanisme. Tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleksil on näidatud kolm substraatidega seonduvat komponenti: kinaasi aktiivtsenter, tsükliini hüdrofoobne tasku ja fosfaatrühma siduv Cks1. Cdk1 aktiivtsentri spetsiifikaat on uuritud suhteliselt põhjalikult ning on teada, millised faktorid seda mõjutavad. Tsükliinide hüdrofoobne tasku interakteerub substraatide seondumismotiividega ning soodustab vastavate valkude fosforüleerimist, kuid ei ole teada, kuidas vastav fosforüleerimise stimuleerimine sõltub seondumismotiivi ja fosforüleerimissaidi omavahelisest paiknemisest. Lisaks tsükliinidele seondub Cdk1-ga ka fosfoadaptormolekul Cks1, mis fosforüleeritud aminohappega interakteerudes toetab substraatide multifosforüleerimist. Cks1 olulisust on näidatud B-tüüpi tsükliinide inhibiitori Sic1 kiirel multifosforüleerimisel, kuid ei ole teada, kui laialt on Cdk1 substraatvalkude Cks1-sõltuv multifosforüleerimine levinud ning millised tegurid seda mõjutavad.

Käesoleva töö kirjanduse osa annab ülevaate *S. cerevisiae* rakutsükli kontrollsüsteemist ning Cdk1 substraatide äratundmise mehhanismidest. Eksperimentaalselt eesmärgiks on uurida, kuidas tsükliin-substraat seondumine ja Cks1-sõltuv fosforüleerimine võivad mõjutada saidi fosforüleerimise dünaamikat lähtuvalt saidi paiknemisest. Selleks mõõdetakse, kuidas tsükliini seondumismotiivi kaugus fosforüleerimisjärjestusest mõjutab selle fosforüleerimist erinevate tsükliin-Cdk1 komplekside poolt, ning uuritakse erinevaid parameetreid, mis mõjutavad Cdk1 kompleksi poolt läbiviidavat multifosforüleerimist ja selle protsessiivsust. Lisaks uuritakse, kui laialt on Cks1-sõltuv multifosforüleerimine levinud Cdk1 substraatvalkude hulgas. Käesolev bakalaureusetöö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Eukariootse rakutsükli kontrollsüsteem *Saccharomyces cerevisiae* näitel

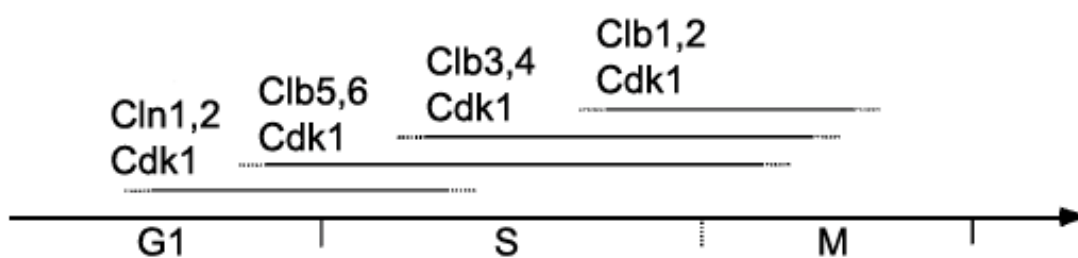
Eukariootse rakutsükli kontrollsüsteemi eesmärgiks on tagada, et rakud saaksid lähtuvalt keskkonnatingimustest kontrollitult, sobiva kiirusega ja vigu tegemata jaguneda. Regulatsioon peab võimaldama eri rakutsükli faaside piisavat kestvust ja õigeaegseid üleminekuid.

Eukariootse rakutsükli kesksed regulaatorid on tsükliin-sõltuvad kinaasid (i.k. *Cyclin-Dependent Kinase* ehk CDK), mis on nii struktuurilt kui funktsioonilt olulisel määral konserveerunud (Lee ja Nurse, 1987). CDK-d on proteiinkinaasid, mis fosforüleerivad rakutsükliga seotud valke, mõjutades nende konformatsiooni, seondumist teiste valkudega, lokaliseerimist rakus või suunates neid lagundamisele (Driscoll jt, 1999; Kato jt, 1993; Kim ja Rose, 2012; Verma jt, 1997). CDK-d on ensümaatilisel aktiivsuses vaid kompleksis tsükliiniga. Tsükliin-CDK seondumine mõjutab oluliselt CDK struktuuri, võimaldades ATP fosfaatide sobivat orientatsiooni ja substraatide ligipääsu aktiivtsentrisse (Jeffrey jt, 1995). CDK-de tase püsib läbi rakutsükli stabiilsena, tsükliinide tasemes toimuvad eri faasides olulised muutused. CDK-de aktiivsuse regulatsioon toimub peamiselt nelja mehhanismi kaudu: tsükliini seondumine, aktiveeriv fosforüleerimine, inhibeeriv fosforüleerimine ja seondumine inhibiitoritega (Morgan, 1997). Erinevates rakutsükli faasides on aktiivsed eri tsükliin-CDK kompleksid, mis fosforüleerimise kaudu tagavad nende valkude aktiivsuse, mida on tarvis vastava rakutsükli etapi protsesside läbiviimiseks. Pagaripärmist on leitud üle 75 valgu, mida Cdk1 fosforüleerib *in vivo* ning mis osalevad fundamentaalsetes rakutsükli protsessides nagu raku morfogeenesis, spetsiifiline transkriptsioon, DNA replikatsioon ja kromosoomide lahknemine (Enserink ja Kolodner, 2010).

Kuigi pärmis *Saccharomyces cerevisiae* on rakutsükliga seotud umbes 800 geeni transkriptsioon (Spellman jt, 1998), suudab kogu protsessi kontrollida väike hulk faktoreid (Li jt, 2004). Rakutsükli mõjutavad põhilised faktorid saab lihtsustatult jagada nelja klassi: tsükliinid ja CDK-d, inhibiitorid ja lagundajad, transkriptsioonifaktorid ja kontrollpunktid.

S. cerevisiae rakutsükli juhib vaid üks CDK, Cdk1, mis eri staadiumites moodustab kompleksi erinevate tsükliinidega (Joonis 1). G1-faasis seondub Cdk1 tsükliinidega Cln1, Cln2 ja Cln3, algatades G1 klasteri geenide transkriptsiooni, mikrotoobuleid organiseeriva tsentri duplikatsiooni ja punga morfogeenesis (Enserink ja Kolodner, 2010). G1/S üleminekul aktiveeritavad tsükliinid Clb5 ja Clb6 initsieerivad DNA replikatsiooni. Geenid *CLB3* ja

CLB4 ekspresseeruvad S-faasist anafaasini ning vastavad tsükliinid osalevad replikatsioonis ja mitoosikäivi moodustamisel. Mitootilisi protsesse viivad läbi Clb2- ja Clb1-Cdk1 kompleksid (Morgan, 1997). Clb-tsükliinid on järjestuse alusel lähedased inimese tsükliin B-ga, seetõttu nimetatakse neid B-tüüpi tsükliinideks. Eri tsükliinide funktsioonid kattuvad osaliselt ning erinevad tsükliinid on vähemalt osaliselt võimelised üksteist asendama. Näiteks on pärm, mille genomist on deleteeritud kõigi B-tüüpi tsükliinide geenid, võimeline jagunema, kui galaktoosi promooterilt indutseerida mitootilise tsükliini Clb1 ekspressioon (Haase ja Reed, 1999).



Joonis 1. *S.cerevisiae* Cdk1 seondub rakutsükli jooksul erinevate tsükliinidega. Selgitused tekstis. (Joonis Morgan, 1997 baasil)

Tsükliinide kontsentratsioonid, mis muutuvad rakutsükli vältel oluliselt, on reguleeritud põhiliselt transkriptsiooni ja valgu degradatsiooni tasemel (Morgan, 1997). Tsükliinide ostsilleerumise teeb võimalikuks rakutsükli faasispetsiifiliste transkriptsioonifaktorite olemasolu. Cdk1 algatab ja peatab rakutsüklist sõltuvaid transkriptsiooniprogramme nii positiivse kui negatiivse tagasiside kaudu, tagamaks rakutsükli ühesuunalisuse (Enserink ja Kolodner, 2010). Vabastades transkriptsioonifaktori SBF (i.k. *SCB Binding Factor*) kompleksist inhibiitoriga Whi5, aktiveerivad G1-faasis kogunevad Cln3-Cdk1 kompleksid geenide *CLN1* ja *CLN2* transkriptsiooni (Costanzo jt, 2004; de Bruin jt, 2004). G2- ja M-faasis blokeerivad tsükliinid Clb1, Clb2, Clb3 ja Clb4 SBF kompleksi DNA-ga seondumise võime, inhibeerides G1-faasi tsükliinide transkriptsiooni (Koch jt, 1996). Sarnane järjestikune transkriptsiooni aktivatsioon ja inhibitsioon on ka S-faasi ja mitootilistel tsükliinidel ning M/G1 geenidel (Enserink ja Kolodner, 2010).

Lisaks muutustele tsükliinide geenide transkribeerimisel on tsükliinide taseme kõikumiseks tarvis valke, mis lagundavad tsükliine. Tsükliinide Cln1, Cln2, Cln3 ja Clb6 degradatsiooni aktiveerib fosfodegroni fosforüleerimine Cdk1 poolt (Jackson jt, 2006; Skowyra jt, 1999; Tyers jt, 1992). Fosfodegron on aminohappeline motiiv, mille fosforüleerimine suunab valgu lagundamisele. Fosfodegroni tunneb ära ubikvitiinligaaskompleks SCF (i.k. *Skp, Cullin, F-box*), mis ubikvitinüleerib vastavad tsükliinid. Ka mitootilised tsükliinid algatavad ise raja, mis viib nende lagundamiseni. Tsükliinide Clb1, Clb2, Clb3, Clb4 ja Clb5 N-terminaalses

osas on järjestus konsensusmotiiviga RxxLxxxzN, kus x on suvaline aminohape ja z valiin või proliin, mistõttu on need tsükliinid substraadiks ubikvitiinligaaskompleksile APC (i.k. *Anaphase Promoting Complex*) (Mendenhall ja Hodge, 1998). Metafaasis fosforüleerivad Cdk1 kompleksid APC kompleksi kuuluvad valgud Cdc16, Cdc23 ja Cdc27, stimuleerides APC aktiveeriva subühiku Cdc20-ne seandumist, misjärel APC-Cdc20 kompleks ubikvitinüleerib B-tüüpi tsükliinid (Rudner ja Murray, 2000). Valgu Cdc20 tase langeb autoubikvitinüleerimise tõttu (Foe jt, 2011), kuid APC aktiivsus säilib, sest kompleksiga seondub teine aktiveeriv subühik – Cdh1 (i.k. *Cdc20 Homolog 1*) (Zachariae jt, 1998). Cdh1 seondub APC-ga vaid fosforüleerimata olekus, kui B-tüüpi tsükliinide aktiivsus on madal ja fosfataaside aktiivsus kõrge, ning hoiab G1-faasis madalat hiliste B-tüüpi tsükliinide kontsentratsiooni (Zachariae jt, 1998). Sünteesitavad Cln- ja Clb5-Cdk1 kompleksid fosforüleerivad Cdh1, põhjustades APC aktiivsuse kadumise ja võimaldades kõigi B-tüüpi tsükliinide kogunemise (Zachariae jt, 1998).

CDK-de inhibiitorid võimaldavad rakutsükli faaside kiireid üleminekuid ning rakutsükli peatamist vigade tekkimisel või keskkonnatingimuste muutumisel. *S. cerevisiae* B-tüüpi tsükliinide inhibiitor Sic1 (i.k. *Subunit Inhibitor of Cyclin-dependent protein kinase 1*) on vajalik õigeaegseks üleminekuks S-faasi (Nash jt, 2001). G1-faasis seob Sic1 kogunevad S-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid inhibitoorsesse kompleksi, millest vabanemiseks on vaja inhibiitori multifosforüleerimist (Nash jt, 2001). See võimaldab inhibiitoril S-faasi tsükliine niikaua ensümaatilisel inaktiives kompleksis hoida, kuni Cdk1 aktiivsus ületab vajitava taseme. Vabanevad Clb5-Cdk1 kompleksid fosforüleerivad valku Sic1, põhjustades positiivse tagasiside kaudu Sic1 degradatsiooni ja kiire ülemineku S-faasi (Kõivomägi jt, 2011a). Sic1 puudumisel rakutsükli S-faas pikeneb, sest DNA süntees algab väiksemalt arvult replikatsiooni alguspunktidelt, pikendades ühe replikatsioonikahvli poolt sünteesitud DNA lõiku, mis viib genoomse ebastabiilsuseni (Lengronne ja Schwob, 2002).

Ehkki rakutsükliit võib juhtida ka autonoomne ostsilleeruv süsteem, mis kulgeb sõltumata teistest teguritest (Hara jt, 1980), on enamikus rakkudes süsteemid, mis vajadusel peatavad kontrollpunktides rakutsükli. Põhilised kontrollpunktid pärmsis on DNA kahjustuste ja lõpetamata replikatsiooni vältimiseks ning kääviniiidistiku moodustamise ja õige paiknemise tagamiseks. Pärmsis *S. cerevisiae* peatatakse G2-faasi ja mitootilistes kontrollpunktides rakutsükkel, inaktiveerides Cdk1 inhibitoorse fosforüleerimise kaudu (Mendenhall ja Hodge, 1998).

1.1.1 Erinevatel protsessidel on erinevad CDK aktiivsuse künnised

Lisaks sellele, et erinevad tsükliin-Cdk1 kompleksid indutseerivad rakutsükli kindlatel etappidel spetsiifilisi protsesse, toimuvad ka faaside piires järjestikku ajastatud sündmused. Pagaripärmi mitoosis esmalt kasv depolariseerub, siis moodustub kääviniiidistik, mis hiljem pikeneb (Richardson jt, 1992). Kasutades pärmitüve, milles oli mitootilistest tsükliinidest alles vaid Clb2, mille ekspressiooni sai reguleerida desoksükortikosterooni lisamisega, näidati, et erinevate mitootiliste protsesside toimumiseks on tarvis erinevat Clb2 aktiivsust (Oikonomou ja Cross, 2011). Kasvu depolariseerimiseks piisab 12% maksimaalsest Clb2 aktiivsusest, kääviniiidistiku moodustamiseks 27%, kuid selle piknemiseks on tarvis 90% aktiivsust. Sarnast erinevate CDK aktiivsuse künnistega regulatsioonimehhanismi on näidatud ka inimese rakkudes, kus varajased sündmused vajavad toimumiseks madalamat tsükliin B1-Cdk1 aktiivsust kui hilisemad (Gavet ja Pines, 2010). Lisades rakuekstraktile erinevas kontsentratsioonis tsükliini B on näidatud, et erinevate mitootiliste substraatide fosforüleerimiseks on vaja erinevat Cdk1 aktiivsust (Deibler ja Kirschner, 2010). Sellisel mehhanismil toimuvate sündmuste kirjeldamiseks on esitatud kvantitatiivne mudel, mille kohaselt rakutsükli hilisemad sündmused vajavad kõrgemat CDK aktiivsuse taset (Stern ja Nurse, 1996). Samas ei ole teada, millised faktorid loovad erineva CDK aktiivsuse künnise nende protsesside läbiviimiseks. Võimalikeks lahendusteks on pakutud substraatide erinevat afiinsust CDK suhtes, multifosforüleerimist või mitme valgu samaaegsel fosforüleerimisel tekkivat tõenäosusfaktorit (Oikonomou ja Cross, 2011). Selgitamaks, mille poolest CDK substraadid üksteisest erinevad, tuleb uurida CDK substraatide äratundmise mehhanisme ning CDK poolt läbiviidavat multifosforüleerimist.

1.2 Cdk1 substraatide äratundmise mehhanismid

S. cerevisiae rakkudes on hinnanguliselt vähemalt 500 erinevat Cdk1 substraati, mis moodustavad üle 8% selle organismi kõigist valkudest (Ubersax jt, 2003). Rakutsükli sündmuste normaalseks kulgemiseks peavad erinevad tsükliin-CDK kompleksid fosforüleerima õigel ajal kindlaid valke. Lisaks on ka substraate, mida peavad fosforüleerima mitmed tsükliin-CDK kompleksid, näiteks fosforüleerivad kõik B-tüüpi tsükliin-Cdk1 kompleksid rereplikatsiooni vältimiseks ORC (i.k *Origin Recognition Complex*) ja MCM komplekside (i.k *Minichromosome Maintenance*) valke (Ikui jt, 2007). Cdk1 substraadispetsiifilisus sõltub kinaasiga seotud tsükliinist (Cross jt, 1999), mis mõjutab ensüümkompleksi substraatide äratundmist kahel mehhanismil, CDK aktiivsenti mõjutamise ja tsükliin-substraat seondumise kaudu (Kõivomägi jt, 2011b).

1.2.1 CDK aktiivtsenter fosforüleerib peptiide konsensusmotiiviga S/T-P-x-K/R

Tsükliin-sõltuvad kinaasid fosforüleerivad järjestusi konsensusmotiiviga S/T-P-x-K/R, kus S/T on fosforüleeritav seriin või treoniin ja x suvaline aminohape (Songyang jt, 1994). Fosforüleeritavaid aminohappeid koos nende naabruses paiknevate aminohapetega nimetatakse fosforüleerimissaitideks. Optimaalset fosforüleerimisjärjestust sisaldava peptiidi K_m (Michaelise konstant) Clb2-Cdk1 kompleksi suhtes on suurusjärgus 50 μM (Loog ja Morgan, 2005). Optimaalsetest fosforüleerimissaitidest oluliselt madalama efektiivsusega fosforüleerivad CDK-d ka fosforüleeritavast aminohappest +3 positsioonis lüsiini või arginiini suboptimaalseid motiive S/T-P (Holmes ja Solomon, 1996). Uurides kristallograafiliselt fosforüleeritava peptiidiga seotud kinaasi Cdk2 leiti, et S/T-P-x-K/R motiivis muudab proliin peptiidahela konformatsiooni, võimaldades anda vesiniksideme Cdk2-ga ja paigutades peptiidi fosforüleerimiseks sobivasse orientatsiooni (Brown jt, 1999). Lüsiin või arginiin positsioonis +3 annab vesiniksideme Cdk2 täielikuks aktivatsiooniks vajaliku fosforüleeritud treoniiniga T160 ning ka tsükliin A3 isoleutsiini I270 peptiidahela hapnikuga (Brown jt, 1999). Interaktsioon tsükliin A3 I270-ga on ainus kontakt substraatpeptiidi ja tsükliini vahel. Varieerides erinevate aminohapete paiknemist fosforüleeritava aminohappe läheduses on näidatud, et erinevate S/T-P-x-K/R motiivi sisaldavate fosforüleerimisjärjestuste afiinsus *Xenopus* Cdc2 või *S. cerevisiae* Cdk1 suhtes võib erineda kuni 10 korda (Holmes ja Solomon, 1996; Kõivomägi jt, 2011b).

Rakutsükliis järjestikused tsükliinid tõstavad järk-järgult Cdk1 aktiivtsentri afiinsust CDK konsensusliku fosforüleerimismotiivi S/T-P-x-R/K suhtes (Kõivomägi jt, 2011b). Lisaks mõjutavad Cln1 ja Cln2 Cdk1 aktiivtsentrit, võimaldades Cln-Cdk1 kompleksidel võrdse efektiivsusega fosforüleerida nii S/T-P-x-K/R motiivi kui ka S/T-P-K/R-A motiivi. Seega tõstab lüsiini või arginiini paiknemine fosforüleeritavast aminohappest +2 positsioonis ja lüsiini või arginiini puudumine +3 positsioonis G1-faasi kompleksi Cln2-Cdk1 spetsiifilisust võrreldes B-tüüpi tsükliinidega. Kuigi ka Clb5, Clb3 ja Clb2 mõjutavad Cdk1 aktiivtsentri afiinsust, ei ole B-tüüpi tsükliinide Cdk1 komplekside optimaalsetes fosforüleerimismotiivides erinevusi leitud. Clb2-Cdk1 kompleksil on umbes 10 korda suurem afiinsus CDK konsensusmotiivi sisaldava histoon H1 peptiidi suhtes kui Clb5-Cdk1 kompleksil (Loog ja Morgan, 2005). Samas ei ole Clb2, ekspresseerituna Clb5 promooterilt ning saavutades Clb5-Cdk1-ga sarnase aktiivsuse histoon H1 suhtes, võimeline asendama tsükliini Clb5 DNA replikatsiooni alustamisel (Cross jt, 1999; Donaldson, 2000). S-faasis on Clb2-Cdk1, kuid mitte Clb5-Cdk1, inhibeeritud türosiinkinaasi Swe1 (i.k *Saccharomyces Wee1*) poolt, seetõttu ei saavuta Clb2-Cdk1 maksimaalset aktiivsust (Hu ja Aparicio, 2005).

Pärmitüves, milles on deleteeritud geen *SWE1* ning *CLB5* lookusesse on viidud täiendav koopia geeni *CLB2*, algatab Clb2 replikatsiooni metsiktüüpi pärmile sarnase efektiivsusega (Hu ja Aparicio, 2005). G1- ja S-faasi tsükliinide bioloogiliste substraatide kiireks fosforüleerimiseks madalal kinaasi aktiivsusel on vaja tsükliin-spetsiifilist substraatide sidumist (Bhaduri ja Pryciak, 2011; Kõivomägi jt, 2011b; Loog ja Morgan, 2005).

1.2.2 Tsükliin-substraat seondumine

Tsükliin E-Cdk2 ja tsükliin A-Cdk2 substraatide sidumist ja fosforüleerimist tugevdavad substraatide lühikesed järjestused konsensusmotiiviga K/R-x-L, kus x tähistab suvalist aminohapet (Adams jt, 1996; Chen jt, 1996; Schulman jt, 1998). RxL motiivi sisaldav peptiid inhibeerib tsükliin A-Cdk2 võimet fosforüleerida valku pRB, kuid ei vähenda mitootilise tsükliin B-Cdk2 kinaasset aktiivsust (Adams jt, 1996). Seega võimaldavad hüdrofoobsed seondumisinteraktsioonid tsükliinspetsiifilist substraatide äratundmist. S/T-P-x-K/R järjestust sisaldava peptiidi K_m väheneb peptiidile RxL motiivi lisamisel tsükliin A-Cdk2 ja tsükliin E-Cdk2 jaoks 75-120 korda (Takeda jt, 2001).

RxL motiivi sisaldavate substraatide sidumisel on oluline tsükliinide pinnal asuv hüdrofoobne tasku (*i.k hp – hydrophobic patch*), mis sisaldab mitmete tsükliinide hulgas konserveerunud aminohappelist järjestust MRAIL (Schulman jt, 1998). Kompleksis CDK-ga asub tsükliini hüdrofoobne ala umbes 35-40Å kaugusel CDK aktiivtsentrist. Inimese tsükliin A3-Cdk2 ning RxL motiivi sisaldava peptiidi kompleksi struktuursed uuringud näitasid, et lisaks MRAIL motiivile osalevad peptiidi sidumisel mitmed tsükliini aminohapped, mis ei paikne primaarstruktuuris järjestikku (Brown jt, 1999). RxLF motiiviga peptiidi puhul moodustab arginiin kaks vesiniksidet ning ioonpaari tsükliiniga A3 (Brown jt, 1999; Lowe jt, 2002). Leutsiini peptiidahela lämmastik annab vesiniksideme glutamiiniga Q254 ning kõrvalahel seondub hüdrofoobsesse taskusse laialdaste van der Waalsi interaktsioonide kaudu (Brown jt, 1999; Lowe jt, 2002). RxL motiivi seondumist tsükliini hüdrofoobse alaga tugevdab leutsiinist järgmises või ülejärgmises positsioonis C-terminuse suunas paiknev hüdrofoobne aminohape, näiteks fenüülalaniin vastavas positsioonis seondub van der Waalsi jõududega tsükliini aminohapetega M210, I213 ja L253ga (Lowe jt, 2002). RxL motiiviga peptiidi seondumisel hüdrofoobsesse taskusse ei muutu tsükliini konformatsioon (Brown jt, 1999; Cheng jt, 2006). Muteerides tsükliin A MRAIL motiivis osa aminohappeid alaniinideks, kaob ensüümkompleksi võime seonduda RxL motiiviga ning efektiivselt fosforüleerida vastava motiiviga substraate (Schulman jt, 1998). Niisuguseid tsükliinide mutante nimetatakse hüdrofoobse ala mutantideks (*i.k hpm – hydrophobic patch mutant*).

S. cerevisiae B-tüüpi tsükliinidel on homoloogiline järjestus inimese tsükliini A hüdrofoobse alaga. Mutantne Clb5, millel on hüdrofoobse ala aminohapped M197, L201 ja W204 asendatudalaniinidega (Clb5hpm), ei vähenda Cdk1 kompleksi kinaasset aktiivsust mittespetsiifilise substraadi histoon H1 suhtes võrreldes metsiktüüpi Clb5-ga (Cross jt, 1999). Samas asendades *CLB5* lookuses metsiktüüpi tsükliin hüdrofoobse ala mutandiga (Clb5hpm), suureneb S-faasis olevate rakkude osakaal, mis kinnitab tsükliini hüdrofoobse ala olulisust S-faasi-spetsiifiliste valkude fosforüleerimisel *in vivo* (Cross jt, 1999).

RxL motiivi ja tsükliini hüdrofoobse tasku vahelist interaktsiooni on vaja rakutsükliis varajaste substraatide õigeaegseks fosforüleerimiseks (Loog ja Morgan, 2005). CDK fosforüleerimissaitide kontsentratsioon tuumas on vähemalt 1 mM ja Clb2-Cdk1 madal K_m S/T-P-x-K/R motiivi suhtes võib takistada kompleksil S-faasi-spetsiifiliste valkude piisavalt kiiret fosforüleerimist, sest Clb2-Cdk1 jaoks optimaalsete substraatide hulk on liiga suur. Rakutsükli varajasi märklaudu fosforüleerib efektiivselt Clb5-Cdk1, mille afiinsust nende suhtes tõstab RxL motiivi ja tsükliini interaktsioon. Selline valkude äratundmine võimaldab madalat K_m -i vaid S-faasi-spetsiifiliste valkude suhtes, samas kui kõrge K_m teiste substraatide suhtes kindlustab, et rakutsükliis hilisemate märklaudvalkude fosforüleerimine ei toimuks liiga vara (Loog ja Morgan, 2005).

G1/S-faasi ensüümkompleksi Cln2-Cdk1 substraadi Sic1 fosforüleerimist suurendavad RxL motiivid vaid 3-4 korda (Kõivomägi jt, 2011b). Samas on mitmeid valke, mida fosforüleerivad vaid G1/S kompleksid Cln1-Cdk1 ja Cln2-Cdk1, näiteks feromooni raja valk Ste20 (i.k. *STERile*) (Oehlen ja Cross, 1998; Wu jt, 1998) ning Bop3 (i.k. *Bypass Of Pam1*) (Kõivomägi jt, 2011b). Kasutades valkude trunkeerimist leiti, et feromooni raja MAP (i.k. *Mitogen-activated protein*) kinaaside kaskaadis osaleva Ste5 ja Sic1 fosforüleerimist Cln2-Cdk1 poolt tugevdab leutsiini- ja proliinirikas motiiv aminohappelise järjestusega LLPP, mis nimetati LP motiiviks (Bhaduri ja Pryciak, 2011; Kõivomägi jt, 2011b). Otsides sarnaseid motiive teistest Cln-Cdk1 substraatidest ja liites vastava motiivi Ste5-ga leiti, et Cln2-spetsiifilist fosforüleerimist tugevdavad lisaks LLPP järjestusele ka järjestused LDDPIQF (Ste20) ning vähemal määral LPPL (Tus1) (Bhaduri ja Pryciak, 2011). Fosforüleerimist ei stimuleerinud sarnased hüdrofoobsed järjestused FVLPP (Bem3) ja LIPPPP (Srl3) (Bhaduri ja Pryciak, 2011). Motiivi põhjal tehtud 10-aminohappeline peptiid (LP peptiid) inhibeerib nii Cln1- kui Cln2-komplekside Sic1 mitte-inhibitoorse N-terminaalse fragmendi Sic1 Δ C fosforüleerimist (Kõivomägi jt, 2011b). LP peptiid aeglustab LP motiivist vastavalt 130, 102 ja 59 aminohappe kaugusel N-terminuse suunas paiknevate Sic1 aminohapete T5, T33 ja S76 fosforüleerimist võrdselt. Sellest järeldati, et LP motiiviga seondumine tugevdab

fosforüleerimist, sõltumata seondumismotiivi ja fosforüleerimisjärjestuse kaugusest. RxL motiivi aminohapetest soodustab Cln2-Cdk1 fosforüleerimist vaid leutsiin, sest AxL motiivi sisaldav peptiid inhibeerib Sic1 Δ C fosforüleerimist RxL motiivi sisaldava peptiidiga võrdselt. G1 tsükliinidest ei ole LP motiiviga seonduvat taskut siiani identifitseeritud.

RxL motiiv on vajalik ka mitmete CDK-de inhibiitorite, nagu p21^{CDKN1A} (CDK inhibiitor 1) (Chen jt, 1996), funktsioneerimiseks. Kuna RxL motiiv seondub spetsiifiliselt tsükliinidega, võivad sünteetilised RxL motiiviga peptiidid olla CDK inhibiitoritena kasutatavad vähivastaste ühenditena. RxL motiivi ja membraani läbivat järjestust sisaldav peptiid takistab valgu E2F fosforüleerimist tsükliin A-Cdk2 poolt ning lisades sama inhibiitorit rakukultuurile, põhjustab U2OS rakuliini osteosarkoomirakkude surma (Mendoza jt, 2003). Transformeerimata rakkude surma sellise inhibiitori lisamine ei põhjustanud. p27^{CDKN1B} (CDK inhibiitor 1B) inhibitoorse järjestuse alusel tehtud RxL motiiviga peptiidi mimikeeriv ühend, mis oli konjugeeritud rakku siseneva peptiidiga, takistas vähirakkude jagunemist, tõstes rakus CDK inhibiitorite p21 ja p27 taset ning vähendades rakutsükli transkriptsiooni inhibiitori pRB (i.k. *Retinoblastoma protein*) lagundamisele suunavat fosforüleerimist (Dai jt, 2013).

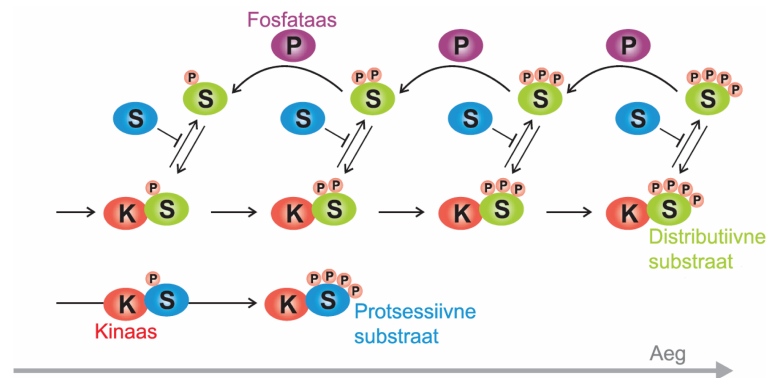
RxL motiiviga peptiid ja fosforüleerimisjärjestust sisaldav peptiid peavad olema kovalentselt seotud, et hüdrofoobne seondumine soodustaks fosforüleerimist (Cheng jt, 2006; Takeda jt, 2001). Kasutades peptiide, millel on nii S/T-P-x-K/R kui ka RxL motiiv, ning varieerides nende kahe motiivi vahelist kaugust, on näidatud, et tsükliin A-Cdk2 kompleksi poolt vastava peptiidi kiireks fosforüleerimiseks peab kahe motiivi vahe olema vähemalt 15-16 aminohapet (Cheng jt, 2006). Kuigi kinaasireaktsiooni toimumiseks peavad ensüüm ja substraat seonduma, ei vii CDK ja substraadi tugevam interaktsioon alati efektiivsema fosforüleerimiseni (Guida ja Zhu, 1999). See annab alust arvata, et tsükliin-substraat seondumine võib otseselt suunata substraati kinaasi aktiivtsentrisse ja et fosforüleerimisjärjestus ja RxL motiiv peavad olema samaaegselt seotud ensüümkompleksiga. *S. cerevisiae* B-tüüpi tsükliinide inhibiitori Sic1 N-terminaalne ilma inhibitsioonidomäänita trunkeering Sic1 Δ C sisaldab nelja RxL motiivi. Kasutades Sic1 Δ C mutante, milles oli alles vaid üks RxL motiiv (teistes arginiin ja leutsiin asendatudalaniinidega), näitasid Kõivomägi jt 2011. aastal, et erinevad RxL motiivid toetavad erinevate saitide fosforüleerimist. Sic1 aminohapete T5 ja T33 fosforüleerimist Clb5-Cdk1 poolt toetasid nii seondumismotiivid ⁸⁹RTL⁹¹ kui vähemal määral ka ¹¹⁴RIL¹¹⁶. Positsioonide S76 ja S80 puhul tugevdas fosforüleerimist motiiv ¹¹⁴RIL¹¹⁶, kuid mitte ⁸⁹RTL⁹¹, mis on kooskõlas inimese tsükliin A-Cdk2 kompleksi vähemalt 16-aminohappelise kauguse nõudega.

1.3 Multifosforüleerimine rakutsükli regulatsioonis

Fosforüleerimise kaudu reguleeritavad valgud sisaldavad tihti mitut fosforüleerimisjärjestust, mis võivad olla substraadiks ühele või mitmele kinaasile (Salazar jt, 2010). Cdk1 fosforüleerimisjärjestustest üle 90% asuvad kas mittestruktuursetes alades või lingudes ning paiknevad substraatides sagedasemalt lähestikku, kui on ennustatav juhuslikkuse alusel (Holt jt, 2009). On leitud mitmeid CDK-de poolt multifosforüleeritavaid valke, näiteks Sic1 (Verma jt, 1997) ja Cdh1 (Zachariae jt, 1998). Multifosforüleerimine lisab võimalusi, kuidas kinaasid protsesse reguleerida saavad. Kui ühel substraadil on n fosforüleerimisjärjestust ja kinaas fosforüleerib neist m , siis on m^n erinevat võimalust, missugune kombinatsioon fosforüleeritakse ning erinevatel kombinatsioonidel võib olla erinev bioloogiline väljund (Thomson ja Gunawardena, 2009).

Multifosforüleerimine võib toimuda kas protsessiivselt, kooperatiivselt või distributiivselt (Kapuy jt, 2009). Protsessiivse mehhanismi korral fosforüleerib kinaas ühe seondumisega substraadil mitu aminohapet. Distributiivse mehhanismi korral aga dissotsieerub ensüüm substraadi küljest lahti pärast ühe fosfaatrühma ülekannet ja multifosforüleerimiseks seondub uuesti juba fosforüleeritud substraadiga. Näiteks Sic1 fosforüleerimine Cdk1 poolt toimub osaliselt nii protsessiivsel, distributiivsel kui ka kooperatiivsel mehhanismil, mille puhul ensüüm küll dissotsieerub substraadilt lahti, aga juba fosforüleeritud aminohapped soosivad järgmiste fosforüleerimist (Kõivomägi jt, 2011a).

Protsessiivse fosforüleerimise korral tekivad kõrgelt fosforüleeritud vormid juba väga madalal läbi reageerinud substraadi hulgal. Kui kinaasse aktiivsuse signaal liigub edasi kõrgelt fosforüleeritud substraadi kaudu, siis võimaldab protsessiivne multifosforüleerimine signaali kiiret edasilikumist (Joonis 2) (Salazar ja Hofer, 2009). Distributiivselt toimuv multifosforüleerimine võib luua erinevate protsesside algatamiseks erineva ensüümi aktiivsuse künnise, sest n korda fosforüleeritud vormide tekkimiskiirus sõltub kinaasi aktiivsusest astmes n (Thomson ja Gunawardena, 2009). Fosforüleerimise protsessiivsust on uuritud erinevatel ensüümi või substraadi kontsentratsioonidel multifosforüleerimise kiirust mõõtes (Salazar ja Hofer, 2009). Distributiivsel mehhanismil mõjub fosforüleerimata substraat konkureeriva inhibiitorina (Joonis 2), seetõttu tõstes substraadi või langetades ensüümi kontsentratsiooni, tekib vähem kõrgelt fosforüleeritudprodukte. Kuna protsessiivsel fosforüleerimisel ei dissotsieeru ensüüm substraadi küljest lahti, ei mõju fosforüleerimata substraat inhibiitorina ja kõrgelt fosforüleeritud vormide teke on sõltumatu ensüümi või substraadi kontsentratsioonist.



Joonis 2. Protsessiivselt ja distributiivselt fosforüleeritavate substraatide olemasolu võimaldab substraatide fosforüleerimist ajaliselt järjestada (Salazar ja Hofer, 2009). Selgitused tekstis.

CDK-de fosforüleerimismotiivi S/T-P fosforüleerivad ka MAP kinaasid ja mitmed teised proliini poolt suunatud kinaasid (Holt, 2012). MAP kinaaside ja Cdk1 aktiivuse väljundsignaalid on aga erinevad: Cdk1 suunab rakud rakutsükklisse, kuid MAP kinaasid peatavad feromooni või osmootse stressi olemasolul rakutsükli G1-faasis (Holt, 2012). Multifosforüleerimise puhul väheneb teiste proliin-suunatud kinaaside aktiivsusest põhjustatud müra mõju Cdk1 väljundile, sest MAP kinaaside poolt läbiviidav multifosforüleerimine toimub eeldatavasti distributiivsel mehhanismil ja seetõttu on nende puhul multifosforüleerimine ebatõenäoline (Holt, 2012).

1.3.1 Cks1

S. pombe temperatuuritundliku Cdc2-ga mutante uurides leiti 1986. aastal, et kõrge koopiaarvuga plasmiid, mis sisaldab geeni *SUC1*, päästab rakud, milles on mutantne CDK-d kodeeriv geen *CDC2* (Hayles jt, 1986). *SUC1* kodeerib valku, mis seondub Cdc2 kompleksiga (Brizuela jt, 1987) ning mille ekspressioon on vajalik rakkude elumuseks (Hindley jt, 1987). *S. cerevisiae* geen *CKS1* (i.k *Cdc28 Kinase Subunit 1*) kodeerib valku molekulmassiga 18 kDa, mille järjestus on 67% identne *S. pombe* valguga Suc1 ning mis seondub *in vivo* Cdk1-ga (Hadwiger jt, 1989). Inimesel on pärmi geeniga *CKS1* homoloogilised geenid *CKS1* ja *CKS2*, mis on võimelised asendama geeni *CKS1* *S. cerevisiae* rakkudes, mis näitab Cks valkude funktsiooni ja struktuuri konserveeritust (Draetta jt, 1987; Richardson jt, 1990).

1.3.1.1 Tsükliin-CDK-Cks kompleks

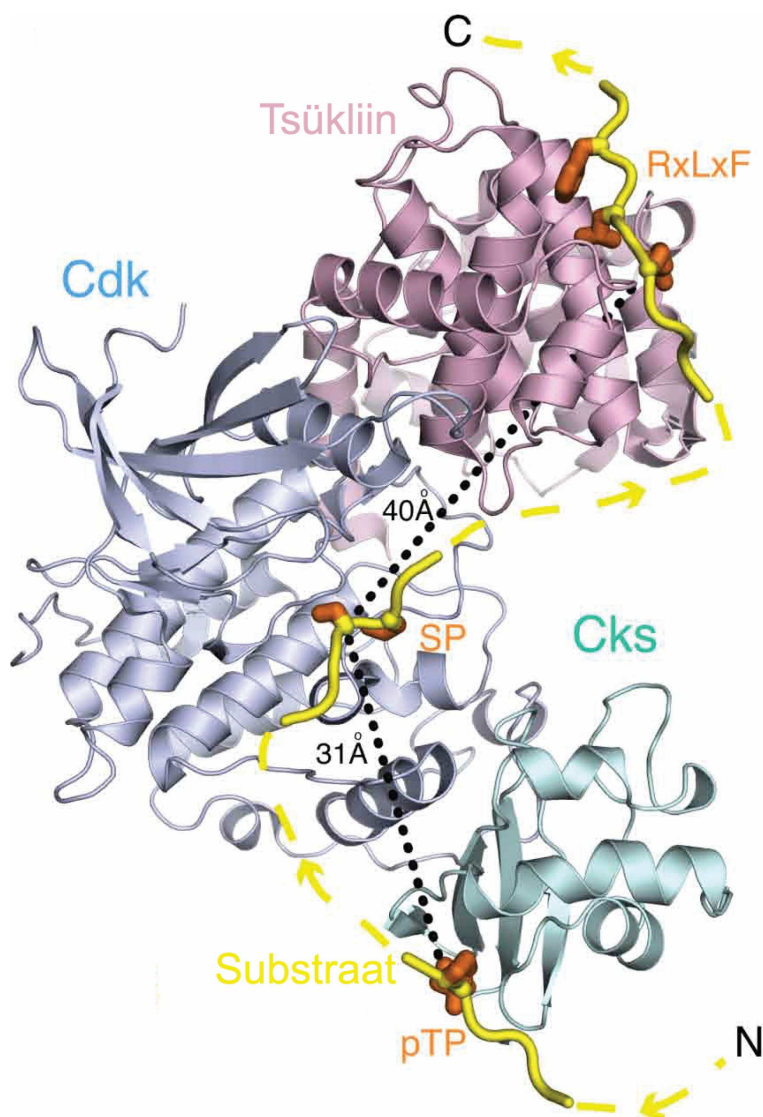
SILAC (i.k *Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) meetodil on näidatud, et vähemalt 50% *S. cerevisiae* rakkudest puhastatud kinaasist Cdk1 on seotud stabiilsesse kompleksi Cks1-ga (Kito jt, 2008). Cks valgu seondumist CDK-ga stimuleerib tsükliini seondumine kinaasiga ja CDK-d aktiveeriv fosforüleerimine (Egan ja Solomon, 1998). Inimese Cks1 koosneb neljast antiparalleelsest β -lehest ja kahest α -heeliksist ning on

struktuurilt sarnane CDK N-terminaalse osaga (Arvai jt, 1995). Cks1 seondub CDK C-terminaalse osaga laialdaste hüdrofoobsete ja polaarsete interaktsioonide kaudu, põhjustamata olulisi muutusi CDK ruumilises struktuuris (Bourne jt, 1996). Cks1-Cdk2 kompleksis interakteeruvad 17 Cks1 aminohapet, millest 15 on identsed kõigis Cks perekonna valkudes, ja 13 Cdk2 aminohapet, mis inimese ja pärmi CDK-des muutumatud (Bourne jt, 1996). Cks valgud sisaldavad konserveerunud katioonset taskut (Arvai jt, 1995), mis on Cks1-CDK kompleksis avatud CDK aktiivtsentriga samas suunas, seega võib Cks1 fosfaatühma sidumise kaudu abistada fosforüleeritud substraatide suunamist aktiivtsentrisse (Bourne jt, 1996). Cks1 katioonne tasku seondub vaid fosforüleeritud treoniiniga, kuid mitte fosforüleeritud seriiniga (Manuskript lisa 2). Saidi interaktsiooni Cks1-ga tugevdab fosforüleeritud treoniinist 2 aminohapet N-terminuse suunas paiknev suur hüdrofoobne aminohape, milleks võib olla fenüülalaniin, isoleutsiin, leutsiin, proliin, valiin, trüptofaan või türosiin (Seth Rubin, California Ülikool, Santa Cruz, avaldamata andmed). Fosforüleeritud aminohapetega seondumise kaudu osalevad ka Cks valgud CDK substraatide äratundmises (Joonis 3).

1.3.1.2 Cks1 funktsioon

Pärm, milles ei ekspresseeru geen *CKS1*, ei ole võimeline jagunema või teeb seda väga aeglaselt (Hadwiger jt, 1989; Yu ja Reed, 2004). Kasutades temperatuuritundlikku Cks1-te, on näidatud, et Cks1 on vajalik nii punga moodustamiseks kui ka G1/S-faasi ja G2/M-faasi üleminekutes (Tang ja Reed, 1993). Cks1 puudumine vähendab oluliselt Cln-Cdk1, kuid mitte B-tüüpi Cdk1 komplekside, kinaasit aktiivsust (Reynard jt, 2000). Cks1-ta rakkudest eraldatud Cln2-Cdk1 komplekse saab *in vitro* aktiveerida Cks1 lisamisega (Reynard jt, 2000). Cks1 aniooni siduv tasku koosneb aminohapetest R33, R42, S82, W85 ja R102 (Bourne jt, 2000). Cks1 mutant mutatsioonidega R33E, S82E ja R102A seondub pärmi kaksikhübrüidsüsteemis Cdk1-ga, kuid ei päästa deleteeritud metsiktüüpi *CKS1* geeniga rakkude fenotüüpi (Bourne jt, 2000). Lisaks ei suuda jaguneda rakud, milles metsiktüüpi Cks1 on asendatud Cdk1-ga mitteseonduva Cks1-ga (Bourne jt, 2000). Seega on Cks1 funktsioneerimisel *in vivo* oluline nii katioonne tasku kui Cdk1-ga seondumise võime. Kinaasikatsed *Xenopus* tsükliin-sõltuva kinaasiga Cdc2 on näidanud, et Cks1 homoloog Xep9 on vajalik mitmete CDK substraatide, nagu Wee1, Myt1, Cdc25, Cdc27, kiireks multifosforüleerimiseks, kuid samas ei mõjuta Cks valgu olemasolu histoon H1 fosforüleerimise kiirust ehk kinaasi üldist aktiivsust (Patra ja Dunphy, 1998; Patra jt, 1999). Multifosforüleerimine inaktiveerib CDK-d inhibeerivad kinaasid Wee1 ja Myt1, kuid tõstab

fosfataasi Cdc25 aktiivsust ning vastav Cks-sõltuv fosforüleerimine on vajalik mitoosi alustamiseks (Patra jt, 1999).



Joonis 3. Tsükliin-CDK-Cks kompleks. CDK kompleksil on kolm põhilist substraatide äratundmise mehhanismi: CDK aktiivtsenter interakteerub seriinide ja treoniinidega, millele järgneb proliin; Cks1 katioonne tasku seondub fosforüleeritud treoniiniga, millele järgneb proliin; tsükliinil asuv hüdrofoobne ala interakteerub substraatide tsükliini seondumismotiividega. Joonis on tehtud Dr. Seth Rubini poolt, kasutades PDB andmebaasi faile 1BUH ja 2CCI.

Pärmis *S. cerevisiae* on Cks1 olulisust näidatud rakutsükli G1/S faaside üleminekul (Kõivomägi jt, 2011a). Sic1 degradatsioon toimub SCF^{Cdc4} kompleksi osalusel (Feldman jt, 1997) ning vabanedes inhibitoorsest kompleksist Sic1-ga, viivad Clb5-Cdk1 kompleksid raku S-faasi (Schneider jt, 1996). Valgul Cdc4 on kaks fosforüleeritud aminohappeid siduvat taskut (Hao jt, 2007). Sic1 ja Cdc4 vaheliseks tugevaks interaktsiooniks peab Sic1 molekulis olema vähemalt kaks lähestikku asuvat fosforüleeritud seriini või treoniini, milleks võivad olla Sic1 aminohapped T5/S9, T45/T48 ja S76/S80 (Hao jt, 2007). Sic1 mutandis, milles on alles vaid üks Cdk1 fosforüleerimissait, fosforüleerib Clb5-Cdk1 kiiresti vaid optimaalseid järjestusi T5, T33, S76 ja S80 (Kõivomägi jt, 2011a). T45, T48 ja S69 fosforüleerimist stimuleerib oluliselt Cks1, mis seondub eelnevalt fosforüleeritud saidiga ja tugevdab ensüüm-substraat interaktsiooni, võimaldades nõrgemate saitide fosforüleerimist (Kõivomägi jt, 2011a). Sic1 fosforüleerimise väljundsaitide paarid sisaldavad vähemalt ühte suboptimaalset CDK

fosforüleerimismotiivi, seetõttu on nende paaride fosforüleerimine Cks1-sõltuv. Rakkudes, milles on vaid fosfaatrühma seondumisvõimetu Cks1, jääb endogeenne Sic1 rakutsüklist sõltumata stabiilseks, seega on Cks1 *in vivo* vajalik Sic1 lagundamiseks.

Lisaks Cks valkude osalusele substraatide multifosforüleerimises on leitud, et Cks1 omab ka funktsioone, mis on CDK kinaasest aktiivsusest sõltumatud. Inimese Cks1 seondub nii ubikvitiinligaasiga SCF kui ka fosforüleeritud valkudega ja on vajalik CDK inhibiitori p27 ubikvitinüleerimiseks (Ganoth jt, 2001; Spruck jt, 2001). G1-faasis inhibeerib p27 tsükliin E ja tsükliin D aktiivsuse, takistades rakutsükli liikumist S-faasi. Valgu p27 lagundamise kaudu toetab Cks1 G1/S üleminekut ja rakkude jagunemist (Ganoth jt, 2001; Spruck jt, 2001). Cks valkude üleekspressiooni on täheldatud mitmetes kasvajates ja Cks1 kõrge tase korreleerub patsientide madala elumusega (Lan jt, 2008). Lisaks p27 degradeerimise soodustamisele võivad Cks valgud kasvajates apoptoosi inhibeerida (Lan jt, 2008) ja stimuleerida rakutsükli p27-sõltumatul moel (Westbrook jt, 2009). Cks1 osaleb ka transkriptsiooni regulatsioonis, seondudes APC aktivaatori Cdc20 geeni promooterile (Morris jt, 2003; Yu jt, 2005). Promooterile seotuna võib Cks1 käituda transkriptsiooni aktivaatorina ning Cks1 puudumisel ilmnevad lisaks rakutsükli defektidele mitmed fenotüübid, mis ei ole rakutsükliga seotud, nagu inositolüüsi auksotroofia ja kõrgem tundlikkus soola kontsentratsiooni suhtes (Holic jt, 2010; Yu ja Reed, 2004). Seega võib Cks1 osalus transkriptsiooni regulatsioonis olla laiem kui vaid *CDC20* ekspressiooni stimuleerimine.

2 Eksperimentaalosa

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks on:

1. Sic1 alusel loodud mudelsüsteemi abil uurida, kuidas tsükliini seondumismotiivi ja fosforüleerimissaidi paiknemine mõjutab vastavat fosforüleerimisreaktsiooni;
2. hinnata 14 Cdk1 substraatvalgu põhjal, kui laialt on Cks1-sõltuv multifosforüleerimine levinud ja kuidas vastav protsess varieerub substraatide vahel;
3. uurida, kasutades mudelsüsteemina Sic1-te, kuidas Cks1-vahendatud multifosforüleerimine sõltub fosforüleerimisjärjestuste omavahelisest kaugusest, millised tegurid seda mõjutavad ning kuidas saitide paigutus mõjutab pärmi elumust *in vivo*;
4. vaadelda, milliste Ndd1 ja Stb1 saitide fosforüleerimine *in vitro* kinaasireaktsioonis on Cks1-sõltuv, kasutades mass-spektromeetrilist fosforüleerimissaitide analüüsi;
5. uurida erinevate *S. cerevisiae* tsükliin-Cdk1 komplekside protsessiivse fosforüleerimise võimet.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Sic1-l baseeruv mudelsüsteem

Fosforüleerimissaitide üksteise ja tsükliinide seondumismotiivide suhtes paiknemise mõju uurimiseks kasutati Sic1 baasil valmistatud mudelsüsteemi. Sic1 on kõrgema struktuurita valk (Brocca jt, 2009). Seetõttu sobib valk Sic1 hästi aluseks, kus varieerida ja uurida erinevate protsesside sõltuvust aminohappelistest distantidest. *In vivo* Cdk1 poolt fosforüleeritavatest aminohapetest üle 90% asuvad kas lingudes või kindla sekundaarse struktuurita alades (Holt jt, 2009), seega peaksid mõõdetud kaugused mõjuma sarnaselt enamike Cdk1 fosforüleerimissaitide puhul. Kõikides kinaasikatsetes kasutati Sic1 trunkeeritud varianti, milles puudus C-terminaalse inhibitoorse osa aminohapped positsioonides 216-284 (Sic1ΔC) (Hodge ja Mendenhall, 1999). Cks1-sõltuva multifosforüleerimise fosforüleerimissaitide vahelise kauguse mõju uurimise katsetes kasutati valgu Sic1ΔC variante, kus olid kõik Cdk1 fosforüleerimissaidid S/TP peale vastava praimersaidi (T33, -2P-T33 või T5) ja aktseptorsaidi (sekundaarse saidi) muteeritud alaniinideks. Lisaks olid mittekonsensuslikud potentsiaalsed sekundaarsed fosforüleerimissaidid S47, T48, T49 ja S51 asendatud järjestusega ⁴⁷QAAKA⁵¹.

Aktseptorina kasutati järjestust QATPQAAAQ, mis viidi Sic1 valgus positsioonidesse 8, 13, 23, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 65, 75, 85, 95 ja 105 (number näitab vastava treoniini positsiooni). Konstruktide, mis sisaldasid distantse -80, -60 ja -40, valmistamiseks liigutati praimersaiti T33 sisaldav järjestus QKTPQKPSQ positsioonidesse 47, 67 ja 87 ning aktseptor positsiooni 8. Tsükliin-substraat seondumise mõju uurimiseks valmistati mutandid, milles olid kõik S/TP-d asendatudalaniinidega, ⁴⁷STTKS⁵¹ asendatud järjestusega ⁴⁷QAAKA⁵¹ ning kõikide RxL-motiivide, peale ⁸⁹RTL⁹¹-i, arginiin ja leutsiin asendatudalaniinidega (¹³AYA¹⁵, ¹¹⁴AIA¹¹⁶, ¹⁴⁷AQA¹⁴⁹). Sic1 fosforüleerimissaidil T5 baseeruv järjestus PSTPPRSRG viidi positsioonidesse 25, 45, 67, 69, 73, 77, 81, 103, 115, 135, 155, 175 ja 195.

2.2.2 Tüved ja söötmed

Sic1-l baseeruvate konstruktide klonerimisel kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α (supE44, Δ lacU169(Φ lacZ Δ M15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1) (Invitrogen). Erinevate valkude ekspresseerimiseks kasutati *E. coli* tüve BL21-CodonPlus(DE3)-RP (*E. coli* B, F-, ompT, hsdS(rB-,mB-), dcm+, Tetr, gal, λ (DE3), endA, Hte, [argU proLCamr]) (Stratagene). Pärimi elulemuse katsetes kasutatud tüved baseerusid *S. cerevisiae* tüvel W303-1A (MATa {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15}), millesse olid eelnevalt transfomeeritud joonisel 12 näidatud Sic1 variantidega pRS413 plasmiidid.

Bakterirakke kasvatati LB (Luria Bertani) söötmes (10g/l baktotrüptooni (BD Biosciences), 5 g/l pärmiekstrakti (BD Biosciences), 10 g/l NaCl). Pämirakke kasvatati SC-His (i.k *synthetic complete media lacking histidine*) söötmes (70 g/l pärimi lämmastiku alust (BD Biosciences), 1,9 g/l CSM-His pulbrit (MP Biomedicals), 2% rafinoosi) ning plaaditi SC-His glükoos plaatidele, milles oli 2% glükoosi, või SC-His rafinoos/galaktoos plaatidele, milles oli 2% galaktoosi ja 2% rafinoosi.

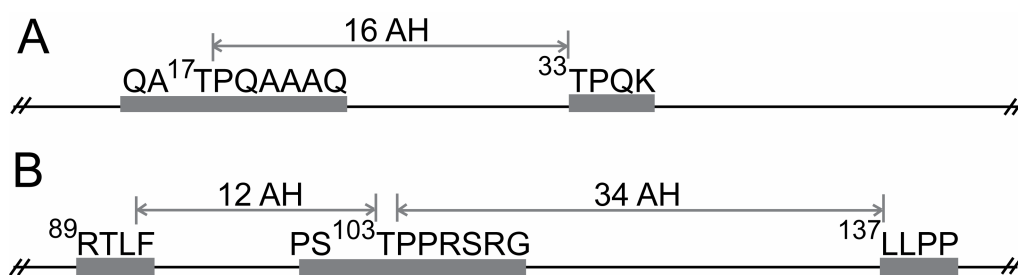
2.2.3 Algplasmiid ja ssDNA-d

Valgul Sic1 baseeruvate konstruktide valmistamisel kasutati eelnevalt valmistatud ssDNA-sid, milles oli pET28a vektorisse (Invitrogen) NheI ja BamHI restriksioonisaitide vahele sisestatud Sic1 Δ C. Praimersaidi ja aktseptori vahelise kauguse varieerimise aluseks olid eelnevalt valmistatud ssDNA-d Sic1 variantidest, milles oli Cdk1 fosforüleerimissaitidest alles vaid T33 või -2P-T33. Distantside -80, -60 ja -40 jaoks kasutati ssDNA-d, milles olid kõik S/TP-d muteeritudalaniinideks ja millesse oli sisse viidud aktseptorsaiti kodeeriv järjestus 8-ndas positsioonis. Hüdrofoobse seondumismotiivi ja fosforüleerimissaidi kauguste varieerimiseks kasutati ssDNA-d, milles olid kõik S/TP-d asendatudalaniinidega ja kõik RxL-

motiivid peale ⁸⁹RTL⁹¹-i AxA-dega. Mutandid, mis valmistati kasutades polümeraasi ahelreaktsiooni, sisestati restriктаasidega NheI ja BamHI lõigatud pET28a vektorisse.

2.2.4 Oligonukleotiid-suunatud mutagenees

Erinevate Sic1 konstruktide valmistamiseks kasutati oligonukleotiide, mis sisaldasid keskel komplementaarsel ahelal muudetavat järjestust ja otstes vähemalt 15 nukleotiidi pikkust komplementaarset ala vastava ssDNA kindlate positsioonidega. Cks1-sõltuva fosforüleerimise uurimiseks varieeriti aktseptorjärjestuse (QATPQAAAQ) positsiooni (Joonis 4A). Mutageneesi oligonukleotiidides oli keskel järjestus 5' TTGCGCTGCAGCTTGGGGGGTAGCTTG 3', mille vastasahel kodeeriks aktseptorsaiti, ning otsad olid komplementaarsed ssDNA vastavate positsioonidega, et mutatsioon läheks soovitud kohta. Selleks, et valmistada tsükliin-CDK kompleksi ja substraadi hüdrofoobse seondumise katsete mutante, muudeti fosforüleerimissaidi järjestusega PSTPPRSRG positsiooni (Joonis 4B). Oligonukleotiidides kasutati selleks järjestust 5' ACCACGGCTACGCGGGGAGTGCTCGG 3'.



Joonis 4. Skeemid, mis selgitavad valmistatud konstrukte. (A) Cks1-sõltuva multifosforüleerimise uurimisel kasutatud konstruktid T33 -16 näitel. Saamaks erinevate praimer- ja aktseptorsaidiga substraatvalke, muudeti järjestuse QATPQAAAQ asukohta valgu primaarjärjestuses. (B) Tsükliinide seondumismotiivide kauguse mõju uurimisel kasutatud konstruktid RxL +12 näitel. Erinevates konstruktidest varieeriti järjestuse PSTPPRSRG asukohta.

Oligonukleotiid-suunatud mutageneesiga valmistati järgnevad konstruktid: Cks1-sõltuva multifosforüleerimise analüüsise jaoks T33 -16, T33 -14, -2P-T33 +6, -2P-T33 +12, -2P-T33 +22, -2P-T33 +62 ning hüdrofoobse seondumise uurimiseks RxL -20, RxL -16, RxL -12, RxL -8, RxL +12, RxL +64 ja RxL +104. Lisaks valmistati antud töö käigus polümeraasi ahelreaktsiooni kasutades konstruktid T33 -40, T33 -60 ja T33 -80. Ülejäänud *in vitro* kinaasikatsetes kasutatud konstruktid olid valmistatud teiste laborikaaslaste poolt (Mardo Kõivomägi, Ilona Faustova, Sander Pihelgas, Rait Kivi, Anna Iofik).

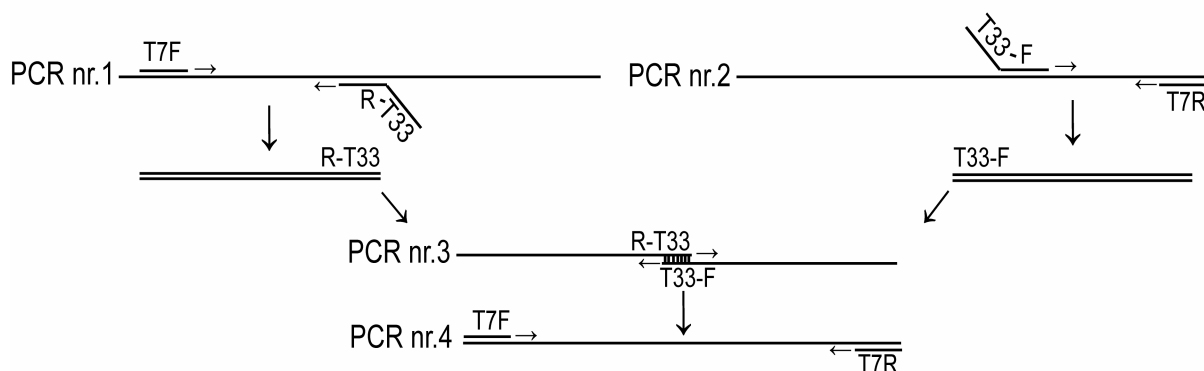
Oligonukleotiide kineerimisreaktsioon toimus 45 minutit 37 °C juures segus, mille koostises oli 100 mM Tris, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 425 μM ATP, 6,5 μM oligonukleotiid

ja 0,15 U/ μ l T4 polinukleotiidi kinaasi (Thermo Scientific). Ensüümi inaktiveerimiseks kuumutati segu 10 minutit 65 °C juures. Oligonukleotiidide seondumiseks üheaahelisele DNA-le segati kokku 50 ng ssDNA-d, 0,5 μ l 6,5 μ M kineeritud oligonukleotiidi, 1 μ l 10x seondumispuhvrit (500 mM NaCl, 200 mM Tris, pH 7,4, 20 mM MgCl₂) ja vett lõppmahuni 10 μ l. Reaktsioonisegusid kuumutati 10 minutit 70 °C juures termostaadis, mille järel tõsteti blokk masinast välja ja lasti aeglaselt jahtuda toatemperatuurile, et oligonukleotiidid seonduks ssDNA-le. ssDNA-le komplementaarse ahela sünteesimiseks ja otste ligeerimiseks lisati 10 μ l seondumissegule 1,35 μ l 10x sünteesi puhvrit (100 mM Tris, pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 10 mM ATP, 5 mM dNTP), 1,5 μ l T4 DNA ligaasi aktiivsusega 5 Weiss u/ μ l (Thermo Scientific) ja 0,83 μ l 5 u/ μ l T4 DNA polümeraasi (Thermo Scientific). Saadud segu hoiti esmalt 5 minutit jääl, seejärel 5 minutit toatemperatuuril ja 90 minutit 37 °C juures. Ensüümide inaktiveerimiseks lisati 5 μ l 1xTE (10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA). Reaktsioonisegud transformeeriti *E.coli* tüvesse DH5 α .

2.2.5 Konstruktide tegemine, kasutades polümeraasi ahelreaktsiooni

PCR (i.k *polymerase chain reaction*) meetodit kasutati multifosforüleerimise T33-40, T33-60 ja T33-80 distantsidega konstruktide valmistamiseks. PCR-i jaoks kasutati *Phusion*TM (Finnzymes) polümeraasi ja oligonukleotiide, mis telliti firmalt Microsynth. Reaktsioonid viidi läbi vastavalt polümeraasi tootja juhistele.

Praimerid T7F ja T7R olid komplementaarsed vastavalt pET28a vektori (Invitrogen) üles- ja allavoolu paiknevate järjestustega, mille vahele oli inserteeritud Sic1 geeni trunkeeritud versioon Sic1 Δ C, milles oli fikseeritud positsioonis suboptimaalne fosforüleerimissait QATPQAAAQ. Erinevad T33-F ja T33-R oligonukleotiidid sisaldasid algse Sic1 matriitsiga mittepaarduvat T33 fosforüleerimissaiti kodeerivat või sellega komplementaarset järjestust ja matriitsiga komplementaarset järjestust. Reaktsioonide 1 ja 2 matriitsiks oli pET28a vektoris olev geen, mis kodeeris Sic1 varianti, millel olid kõik metsiktüüpi S/TP saidid asendatud topeltalaniinidega ja positsiooni 8 viidud suboptimaalne sait QATPQAAAQ. Esimese kahe PCR-iga viidi soovitud positsiooni produkti otsa oligonukleotiididega sisse saidil T33 baseeruvat fosforüleerimissaiti QKTPQKPSQ kodeeriv järjestus (Joonis 5). Reaktsioonis nr. 4 paardusid omavahel komplementaarse T33 järjestuse kaudu esimese kahe PCR-i produktid ning üheaahelalistele osadele sünteesiti teine ahel. Seejärel lisati PCR nr.3 segule praimerid T7F ja T7R, mille abil amplifitseeriti saadud Sic1 konstrukt. Kasutades kolme erinevat T33F ja T33R praimerite paari, viidi selle skeemi alusel T33 Sic1 valgus positsioonidesse 47, 67 ja 87.



Joonis 5. Skeem, mille alusel valmistati polümeraasi ahelreaktsioonidega Sic1 konstruktid. Praimerid T33-F ja T33-R koosnesid matriitsiga komplementaarsest osast ja T33 järjestust kodeerivast matriitsiga mittepaarduvast osast. Konstruktide valmistamiseks viidi läbi neli polümeraasi ahelreaktsiooni. Esimese kahega viidi praimeritega soovitud positsiooni T33 saiti kodeeriv järjestus, kolmanda reaktsiooniga sünteesiti kahe esimese PCR-i produktide seondumisel Sic1 Δ C kodeeriv lõik, mida paljundati PCR-ga nr. 4.

PCR-i produktide lahutamiseks kasutati geelelektroforeesi. Selleks lisati PCR-i reaktsioonile *6x Orange DNA Loading Dye* (Thermo Scientific), segu laaditi 1% agarosgeelile, millesse oli lisatud 0,3 $\mu\text{g/ml}$ etiidumbromiidi. Elektroforees agarosgeelis teostati Amersham Bioservices foreesiaparaadiga. Produktid puhastati geelist, kasutades *QIAquick Gel Extraction Kit*-i (Qiagen) tootjafirma protokoll järgi.

PCR-i produkti sisestamiseks pET28a vektorisse lõigati PCR-i produkti NheI ja BamHI-ga, kasutades *FastDigest* ensüüme (Thermo Scientific). Restriksiooniks pipeteeriti kokku 27 μl geelist puhastatud PCR-i produkti, 3 μl 10x *FastDigest* puhvrit ja 1 μl kumbagi ensüümi. Proove inkubeeriti 60 minutit 37 $^{\circ}\text{C}$, seejärel lahutati lõigud geelelektroforeesil. Geelist lõigati sobiva pikkusega DNA lõik välja ja külmutati -20 $^{\circ}\text{C}$.

pET28a vektorisse ligeerimiseks sulatati temperatuuril -20 $^{\circ}\text{C}$ hoitud restriктаasidega lõigatud DNA ja valmistati segu, mis sisaldas 3 μl geelist sulanud DNA-d, 1 μl eelnevalt NheI ja BamHI-ga lõigatud pET28a vektorit, 1 μl T4 ligaasi puhvrit, 1 μl T4 ligaasi (Thermo Scientific) ja vett lõppmahuni 10 μl . Enne *E. coli* tüvesse DH5 α transformeerimist hoiti ligatsioonisegu 4 tundi temperatuuril 16 $^{\circ}\text{C}$.

Nii oligonukleotiididega kui PCR-iga tehtud konstruktide nukleotiidset järjestust kontrolliti sekveneerimisega (EBK DNA sekveneerimise tuumiklaboris). *E. coli* tüvest DH5 α eraldati plasmiidne DNA *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*-iga (Thermo Scientific) vastavalt tootja protokollile.

2.2.6 *E. coli* tüvede DH5 α ja BL21 transformatsioon

Kompetentsed rakud (valmistatud Jevgen Mihhejevi poolt; säilitatud -80 °C juures) sulatati ja pandi jäävannile. Transformeerimiseks pipeteeriti tuubi 15 μ l 5x KCM lahust (0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂, 0,25 M MgCl₂), millele lisati BL21 puhul 30-50 ng DNA-d ning DH5 α puhul 2-10 μ l mutageneesi sünteesi reaktsioonisegu või ligatsioonisegu, misjärel lisati vett lõppmahuni 75 μ l; saadud segule lisati 75 μ l kompetentseid rakke. Transformatsioonisegu hoiti jääl BL21 puhul 10 minutit ja DH5 α puhul 30 minutit. Seejärel tekitati rakkudele kuumašokk, pannes BL21 rakud 1 minutiks ja DH5 α rakud 1,5 minutiks 42 °C termostaati. Järgnevalt tõsteti rakud kiiresti jääle vähemalt kaheks minutiks. Lisati 600 μ l LB söödet ja inkubeeriti 30-60 minutit 37 °C loksutil. Rakud tsentrifugeeriti lauatsentrifuugis 1 minut 6000 rpm. Enamik supernatandist valati ära, jättes alles umbes 100 μ l, milles rakkude sade suspendeeriti, ning suspensioon plaaditi. DH5 α rakud külvati LB plaatidele, mis sisaldasid 100 μ g/ml kanamütsiini (Applichem), ning BL21 rakud LB plaatidele, mis sisaldasid kanamütsiini 100 μ g/ml ja klooramfenikooli 50 μ g/ml (Applichem).

2.2.7 6xHis-Sic1 variantide puhastamine

6xHis-Sic1 valkude puhastamiseks transformeeriti konstruktid *E. coli* BL21 rakkudesse, mida kasvatati 50 ml-s LB söötmes (mis sisaldas 100 μ g/ml kanamütsiini) temperatuuril 37 °C. Tihedusel OD₆₀₀=0,6 indutseeriti valgu ekspressioon, lisades IPTG (Biosolve Chemicals) lõppkontsentratsiooniga 1 mM. Kolm tundi pärast IPTG lisamist tsentrifugeeriti rakud 5 minutit 5000 rpm Sigma 4K15 tsentrifuugi Sigma 12169-H rootoriga ja rakkude sade külmutati -80 °C. Rakkude sade sulatati jääl ja suspendeeriti ühes milliliitris lüüsipuhvril (25 mM Hepes pH 7,4, 300 mM NaCl, 10% glütserool, 1 mg/ml lüsotsüüm, 0,1 U/ μ l DNAas I ning proteaaside inhibiitorid: 1 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatiin A, 1 μ g/ml aprotiniin, 1 μ g/ml leupeptiin. Rakke lüüsi 20 minutit 4 °C *end-over-end* segajal (Rotator-Mixer, Biosan). Lüsaati tsentrifugeeriti raku sademe eemaldamiseks 4 °C lauatsentrifuugis 10 minutit 14000 rpm. Supernatant kanti 100 μ l *Chelating Sepharose* (GE Healthcare) kolonnile, mis oli eelnevalt esmalt pestud kümne kolonni ruumala H₂O-ga, seejärel küllastatud ühe kolonni ruumala 200 mM CoCl₂-ga ning pestud kümne kolonni ruumala puhvri A-ga (25 mM Hepes pH 7,4, 300 mM NaCl, 10% glütserool). Kui lüsaadi supernatant oli läbi kolonni jooksnud, pesti kolonni esmalt kümne kolonni ruumala puhvri A-ga ja seejärel sama koguse puhvri A-ga, milles oli lisaks 50 mM imidasool. Elueerimiseks kasutati puhvrit A, millele oli lisatud imidasool lõppkontsentratsiooniga 200 mM. Elueerimine teostati kolmes etapis, kandes iga kord kolonnile ühe kolonni ruumala puhvrit. Kinaasikatsetes kasutati üldjuhul valke, mis vabanesid kolonnist teise eluatsiooni. Sic1 moodustas vastates eluaatides vähemalt 90% kogu valgust.

Multifosforüleerimise uurimiseks puhastati T33 praimersaidiga -80, -60, -40, -16, -14 ja +42 ning -2P-T33 praimersaidiga +12 ja +62 distantsidega valgud. Tsükliini seondumismotiivi ja fosforüleerimissaidi vahelise kauguse mõju vaatlemiseks puhastati T5 fosforüleerimissaidiga valgud, milles antud kauguseks oli -20, -16, -12, -8, +12, +24, +44, +64, +84, +104. Lisaks puhastati Sic1 Δ C-T5/T33 ja Sic1 Δ C-T5/T33+3A. Ülejäänud kinaasikatsetes kasutatud Sic1 mutandid puhastasid Mardo Kõivomägi, Jevgeni Mihhejev ja Anna Iofik.

2.2.8 Teiste His-märgisega substraatvalkude puhastamine

Hcm1, Ace2, Bop3, Ash1 ja Gic2 puhastati 0,5 liitris 2xYT söötmes Jevgeni Mihhejevi poolt kasvatatud BL21 rakkude sademest. Sade sulatati jääl ja suspendeeriti üles 15 ml ilma lüotsüümita lüüsi puhvris (25 mM Hepes pH 7,4, 300 mM NaCl, 10% glütserool, 0,1 U/ μ l DNAas I ning proteaaside inhibiitorid: 1 mM PMSF, 1 μ g/ml pepstatiin A, 1 μ g/ml aprotiniin, 1 μ g/ml leupeptiin). Seejärel lisati 5 ml 4 mg/ml lüotsüümita lüüsi puhvrit ning rakke lüüsi 15 minutit 4 °C *end-over-end* segajal (Rotator-Mixer, Biosan). Lüsaati sonikeeriti 50% võimsusel 3 korda 30 sekundi, kasutades Bandelin Sonoplus HD 2070 masinat, sonikeerimiste vahel hoiti lüsaati 1 minut jääl. Rakkude sadestamiseks tsentrifugeeriti lüsaati Sorvalli SS-34 rootoriga 10 minutit 4 °C 14000 rpm. Samal ajal valmistati ette 200 μ l *Chelating Sepharose* (GE Healthcare) kolonnid, mida pesti kümne kolonni ruumala H₂O-ga, kolonni laadimiseks lisati 1 kolonni ruumala 200 mM CoCl₂ ja pesti kümne kolonni ruumala puhvri A-ga (25 mM Hepes pH 7,4, 300 mM NaCl ja 10% glütserool). Tsentrifugeeritud lüsaadi supernatant kanti kolonnile, misjärel kolonni pesti kümne kolonni ruumala puhvri A-ga (25 mM Hepes pH 7,4, 300 mM NaCl ja 10% glütserool) ja kümne kolonni ruumala puhvri A-ga, milles oli lisaks 15 mM imidasool. Valke elueeriti kolmes etapis, kasutades iga kord ühe kolonni ruumala puhvrit A, milles oli lisaks 200 mM imidasool. Kinaasikatsetes kasutati puhastatud valkude teist või kolmandat eluatsiooni, mille kogu valgu sisaldusest vähemalt 25% moodustas vastav 6xHis-märgisega valk. Bakterist His-märgisega valkude puhastamisel kaasa tulevad valgud ei mõjuta kinaasireaktsiooni kulgemist (meie labori avaldamata andmed).

Antud bakalaureusetöö käigus puhastati sel meetodil Hcm1, Ace2, Bop3, Ash1 ja Gic2. Ülejäänud joonisel 8 näidatud valgud puhastasid Mardo Kõivomägi, Jevgeni Mihhejev, Rainis Venta ja Ervin Valk.

2.2.9 *In vitro* kinaasikatse

In vitro kinaasikatseteks kasutati tsükliin-Cdk1 komplekse, mis olid puhastatud eelnevalt kirjeldatud meetoditel (Kõivomägi jt, 2011b), ja 6xHis-märgisega

koobaltafiinsuskromatograafiaga puhastatud substraatvalke. Substraatvalkude kontsentratsioonide määramisel võrreldi valkude signaalide intensiivsust *Coomassie brilliant blue G-250*-ga (Applichem) värvitud akrüülamiidgeelidel teadaolevate valgukogustega BSA (i.k. *bovine serum albumin*) (Thermo Scientific) signaalide baasil tehtud kalibreerimiskõverga. Valkude fikseerimiseks loksutati geele 15 minutit fikseerimispuhvril, mis koosnes 30% etanoolist ja 30% äädikhapest. Geele värviti vähemalt kolm tundi ja pesti veega. Geelid skaneeriti ja valgu signaalide intensiivsus kvantiseeriti programmiga ImageQuant TL (Amersham). Sic1 mutantide kontsentratsioon kinaasikatsetes oli 1,5 μM (vähemalt 5 korda madalam kui hinnatud K_m -i). Ensüümi kontsentratsioon oli üldjuhul 2-3 nM. Joonisel 6 esitatud katsetes oli kõikide ensüümide kontsentratsioon 1 nM ning reaktsioon toimus algkiiruse tingimustel (katse jooksul fosforüleeriti alla 10% kõigist Cdk1 saitidest substraadis). Protsessiivsuse katsetes kasutati madalamaid ensüümi kontsentratsioone (~0,1-0,4 nM), et vähendada kooperatiivsel mehhanismil toimuvat multifosforüleerimist. Kinaasikatsed viidi läbi reaktsioonisegudes, mille koostis oli järgmine: 50 mM Hepes pH 7,4, 180 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM imidasool, 0,1 mg/ml 2HA peptiid, 2% glütserool, 2 mM EGTA, 0,2 mg/ml BSA, 500 nM Cks1, 500 μM ATP, 0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ γ -³²P]ATP, ensüüm, substraatvalk. Kinaasikatsed toimusid üldjuhul ruumalas 20 μl , välja arvatud joonisel 13 Sic1 Δ C-T5/T33 protsessiivsuse uurimise katsed, mis teostati 220 μl segudes, ning joonistel 9, 10 ja 14, kus reaktsioonimahuks oli 30 μl . Reaktsioonid viidi läbi toatemperatuuril, koguti vähemalt kaks ajapunkti (üldjuhul 8 ja 16 minutit). Reaktsioonid peatati Laemmli SDS puhvril (60 mM Tris-Cl pH 6,8, 2% SDS, 10% glütserool, 5% β -merkaptopetaanool, 0,01% bromofenoolsinine) ja reaktsioonisegud lahutati SDS-PAA geelelektroforeesil. Multifosforüleerimise Cks1-sõltuvuse uurimiseks kasutati fosfaatrühma mittesiduvat Cks1-te (Cks1mut), milles oli aniooni siduva tasku olulised aminohapped asendatud järjekorras: R33E, S82E, R102A. Tsükliin-Cdk1 komplekside puhastamisel ensüümiga seotud Cks1-e asendamiseks Cks1mut-ga, inkubeeriti ensüüme koos vastava Cks1 variandiga 45 minutit enne reaktsioonide alustamist toatemperatuuril segus, mille koostises oli 50 mM Hepes pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2% glütserool, 0,2 mg/ml HA peptiid, 0,4 mg/ml BSA, 500 μM ATP, 1250 nM Cks1, 0,25-10 nM ensüüm. Joonise 8 graafikutel näidatud multifosforüleerimise efektiivsus on topelfosforüleeritud vormi (2P) osa totaalsest fosforüleeritud substraadist (1P+2P), mis on läbi jagatud ensüümi kontsentratsiooniga. Kõik kinaasikatsed teostati vähemalt kahes korduses.

Ensüümi ja substraatvalgu vahelise hüdrofoobse seondumise uurimiseks kasutati Clb5-Cdk1 ja Clb2-Cdk1 puhul mutantseid tsükliine, millel oli vastav hüdrofoobne tasku muudetud seondumisvõimeks (Clb5hpm ja Clb2hpm) (Loog ja Morgan, 2005). Cln2 puhul lisati

reaktsioonidele hüdrofoobsel seandumisel konkureerivat LP peptiidi (VLLPPSRPTS), mille kontsentratsioon katsetes oli 4 mM.

Protsessiivse fosforüleerimise uurimisel nõrkade signaalide võimendamiseks sadestati 50 µl kinaasireaktsiooni 5 µl trikloroäädikhappega (TCA). Kinaasireaktsioon peatati TCA lisamisega, saadud segu hoiti jääl vähemalt tund aega ning seejärel tsentrifugeeriti lauatsentrifuugis 15 minutit pööratel 13400 rpm. Supernatant eemaldati ja sadet pesti 1 ml külma atsetooniga ning tsentrifugeeriti lauatsentrifuugis 5 minutit pööratel 13400 rpm. Atsetooniga pesemist teostati 2 korda, misjärel supernatant eemaldati ja sademel lasti kuivada 10 minutit toatemperatuuril. Sade resuspendeeriti 15 µl 3x SDS Laemmlis puhvril.

Multifosforüleerimise uurimise kinaasikatsete analüüsimiseks lahutati fosforüleeritud vormid Phos-Tag (Wako Chemicals) SDS-PAAG meetodil, milles rohkem fosforüleeritud vormid liiguvad aeglasemalt. Kuna suured ja kõrgelt fosforüleeritud valgud ei pruugi standardses Phos-Tag geelis piisava kiirusega liikuda, kasutati eri valkude lahutamiseks erineva akrüülamiidi ja Phos-Tag ligandi kontsentratsiooniga geele. MnCl₂ kontsentratsiooni langetati võrdselt Phos-Tag ligandiga. Yhp1 jooksutati 0,08% bis 10% polüakrüülamiid geelil. Phos-Tag SDS-PAA geele foreesiti konstantsel voolutugevusel 15 mA. Joonise 6 katsetes lahutati Sic1ΔC 10% SDS-polüakrüülamiidgeelidel. Geelid foreesiti puhvril, mis sisaldas 25 mM Tris-i, 192 mM glütsiini ning 0,1% SDS-i. Geelid värviti *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Applichem) lahusega (40% metanooli, 7% äädikhapet, 0,025% *Coomassie Brilliant Blue R-250*) ja pesti esmalt *High Methanol Destain* lahusega (40% metanooli, 7% äädikhapet) ja siis veega. Reaktsioone analüüsiti autoradiograafiliselt (Typhoon TRIO, Amersham) ja signaalid kvantiseeriti programmiga ImageQuant TL (Amersham).

Tabel 1. Kinaasikatsetes valkude fosfovormide lahutamiseks kasutatud Phos-Tag SDS-PAA geelid.

Akrüülamiid	Phos-Tag	Foreesitud valgud	Elektroforeesi aeg
10%	100 µM	Sic1ΔC, Stb1, Ypr174c, Fin1	3 tundi
10%	20 µM	Hcm1, Ace2, Bop3, Gic2	2,5 tundi
8%	100 µM	Yox1	3 tundi
7%	70 µM	N-Swe1	3 tundi
7%	100µM	Tos4, Ash1, Swi5	3 tundi

2.2.10 *In vitro* kinaasikatsete mass-spektromeetiline analüüs

Kinaasikatsete teostati nagu kirjeldatud peatükis 2.2.9, kuid reaktsioonis ei olnud $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP-d. Uurimaks, milliste saitide fosforüleerimine on Cks1-sõltuv, teostati võrdse koguse substraadiga reaktsioonid metsiktüüpi Cks1-ga ning fosfaatrühma mittesiduva Cks1-ga, kusjuures ühes reaktsioonis oli (^{16}O)-ATP ning teises (^{18}O)-ATP (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). Katsed teostati kahes korduses, ühes katses oli Cks1wt-ga reaktsioonis (^{16}O)-ATP ja Cks1mut-ga (^{18}O)-ATP ning teises katses vastupidi. Reaktsioonid peatati SDS-Laemmleri puhvriga ning võrdsed kogused Cks1wt ja Cks1mut-ga reaktsioonidest tõsteti ühte tuubi. Valgud lahutati SDS-PAAG meetodil ning geelid värviti *Coomassie brilliant blue G-250*-ga nagu kirjeldatud peatükis 2.2.9. Geelist lõigati välja uuritava valguga vöö, mis tükeldati umbes 1 mm³ suurusteks tükkideks ning tõsteti 1,5 ml Eppendorf LoBind tuubidesse. Värvieemaldamiseks lisati geelitükkidele 200 µl värvitustamise lahust (1 osa atseetonitriili ning 1 osa 100 mM ammooniumbikarbonaati), segu segati vortexil 30 minutit, misjärel supernatant eemaldati. Geelitükkidele lisati 200 µl atseetonitriili ning inkubeeriti 5 minutit enne supernatandi eemaldamist. Tsüsteiinide redutseerimiseks inkubeeriti geelitükke 30 minutit temperatuuril 56 °C 10 mM DTT 100 mM ammooniumbikarbonaadi lahuses, peale mida lisati geelitükkidele 500 µl atseetonitriili, segati vortexil ning hoiti 10 minutit toatemperatuuril. Supernatant eemaldati ning tsüsteiinide alküleerimiseks lisati 30 µl 50 mM jodoatseetamiidi 100 mM ammooniumbikarbonaadis ning inkubeeriti valguse eest kaitstult 20 minutit toatemperatuuril. Järgnevalt lisati 500 µl atseetonitriiliga ning käituti proovidega nagu eelneval korral. Geelisiseks valkude proteolüütiliseks töötamiseks lisati tuubidesse 20 ng/µl trüpsiini lahust 100 mM ammooniumbikarbonaadis koguses, et geelitükid oleks kaetud lahusega. Segu hoiti jääl 2 tundi, misjärel vajadusel lisati 15 µl 100 mM ammooniumbikarbonaati. Trüpsineerimiseks inkubeeriti segu 18 tundi 37 °C juures, peale mida proove sonikeeriti 5 minutit vesivannil (Bandelin Sonorex Digitec) ning supernatant tõsteti uude 1,5 ml Eppendorf LoBind tuubi. Peptiidide eraldamiseks geelitükkidest lisati 200 µl ekstraheerimispuhvrit (1 osa 5% trifluoroäädikhape (TFA), 2 osa atseetonitriili), segati vortexil 15 minutit ning eemaldatud supernatant segati eelmises etapis saaduga. Peptiidide ekstraheeriti veel esmalt 50 µl atseetonitriili, siis 50 µl 0,5% TFA, 100 µl atseetonitriili ning viimaks 100 µl ekstraheerimispuhvriga, lisades supernatandid eelnevalt kogutud supernatantidele. Lahus kontseentreeriti vaakumsentrifuugides (Heto vacuum centrifuge) ruumalani 20 µl ning lisati 200 µl 0,5% TFA, segati vortexil ja sonikeeriti vesivannil 5 minutit. Peptiidid puhastati StageTip meetodil (Rappsilber jt, 2007). Peptiidid seoti kolmekihilisele C18 filtrile (Empore). Pärast peptiidide sidumist pesti StageTip-e 200 µl 0,5% TFA-ga. C18 filtrile seondunud peptiidid elueeriti kahes järgus, lisades mõlemal korral 20 µl

0,5% TFA ja 80% atseetonitriili lahust ning surudes vedeliku süstlaga läbi filtrite. Atseetonitriili eemaldamiseks vaakumtsentrifuugiti eluaate, kuni alles jäi mõni µl vedelikku. Proovidele lisati 10 µl 0,5% TFA, sonikeeriti 5 minutit vesivannil, segati vortexil ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 10 minutit 13200 rpm. Proovid saadeti LC-MS/MS meetodil analüüsimisele Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi proteoomika tuumiklaborisse. Peptiidid identifitseeriti Mascot otsinguga (www.matrixscience.com) *S. cerevisiae* valgularjenduste andmebaasi vastu. Peptiidide otsingus lubati kahte lõikamata trüpsiin/P lõikesaiti, peptiidi masstolerants oli 7 ppm ja fragmendiiooni masstolerants 0,6 Da. Kindel modifikatsioon oli karbamidometüül-tsüsteiin. Varieeruvad modifikatsioonid olid metioniini oksüdatsioon ning seriini ja treoniini fosforüleerimine. Peptiidide suhtelised intensiivsused leiti programmiga Xcalibur (Thermo Scientific).

2.2.11 Pärmilumuse uurimine lahjenduste ridadega

Pärmirakke kasvatati üleöö 30 °C juures 5 ml SC-His söötmes, kus süsiniku- ja energiallikaks oli rafinoos, kuni tiheduseni, kus kultuuri optiline tihedus lainepikkusel 600 nm oli 0,2 kuni 0,8. Lahjendusrea esimeseks punktiks võeti 10⁶ rakku/ml. Sellest tehti edasi lahjenduste rida, kus lõpplahjendused algsest olid vastavalt 1/2, 1/10, 1/100 ja 1/500. Eri tüvede lahjendusridadest külvati 5 µl kas SC-His glükoos või SC-His galaktoos/rafinoos plaadile. Pärmirakke kasvatati 30 °C juures 48-64h. Katset teostati üks kord.

Tulemused ja arutelu

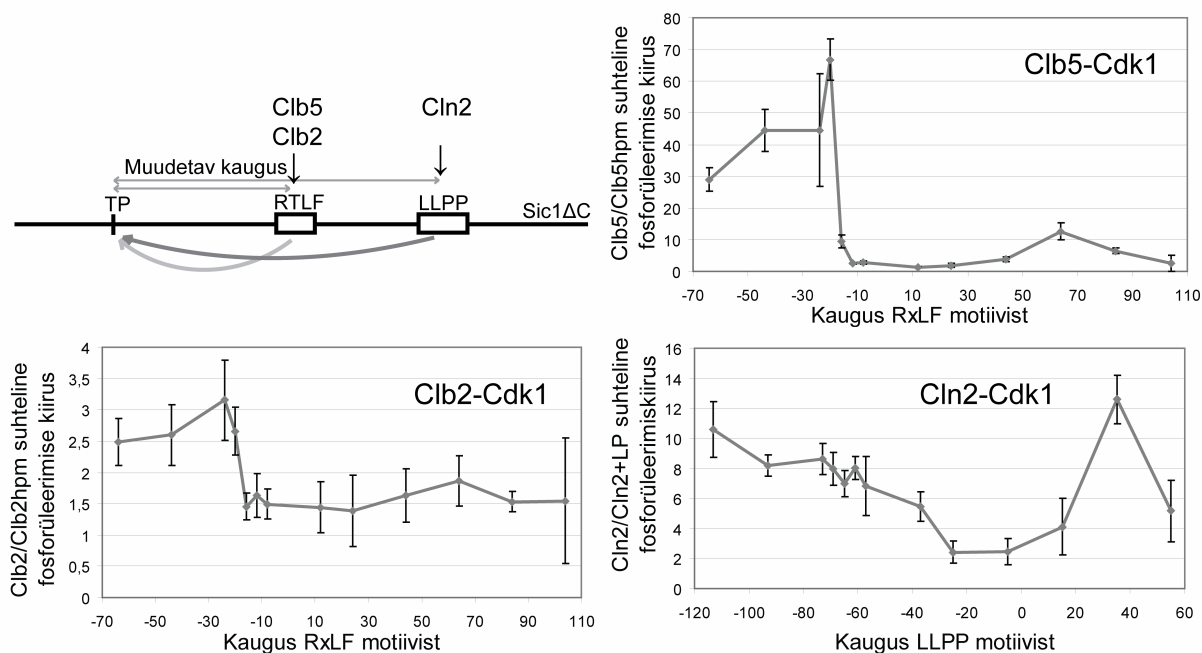
2.2.12 Tsükliin-substraat seondumise mõju fosforüleerimisele sõltub

fosforüleerimissaidi paiknemisest seondumismotiivi suhtes

Erinevate substraatide fosforüleerimist tugevdab tsükliin-substraat seondumine erineval määral (Kõivomägi jt, 2011b). Seondumise efekti võib mõjutada seondumismotiivi ja fosforüleeritava aminohappe vaheline kaugus ja suund. Küsimuse uurimiseks mõõdeti *in vitro* optimaalse Cdk1 fosforüleerimissaidi fosforüleerimist 13 erinevas substraadis, milles vastav järjestus paiknes erinevatel kaugustel tsükliinide seondumismotiividest. Selleks kasutati Sic1 Δ C alusel loodud süsteemi, milles oli vaid üks Clb5-spetsiifiline RxL motiiv ja LP motiiv Cln2 seondumiseks ning üks optimaalne Cdk1 fosforüleerimissait järjestusega PSTPPSRG, mis konstrueeritud Sic1 Δ C variantides oli viidud erinevasse positsiooni (Joonis 6A). Tsükliini ja substraadi vahelise seondumise mõju fosforüleerimisele uuriti kolmel kinaasikompleksil: Clb5-, Clb2- ja Cln2-Cdk1. Tsükliin-sõltuva seondumise efekti tugevuse leidmiseks võrreldi Clb5 ja Clb2 puhul metsiktüüpi ja mutantsete tsükliin-Cdk komplekse, millel oli muteeritud seondumisel osalev tsükliini hüdrofoobne tasku (Clb5hpm ja Clb2hpm), fosforüleerimiskiirust (Joonis 6B,C). Cln2 puhul kasutati tsükliin-substraat interaktsiooni inhibeerimiseks seondumisel konkureerivat LP motiivi sisaldavat peptiidi (LP peptiid) (Joonis 6D).

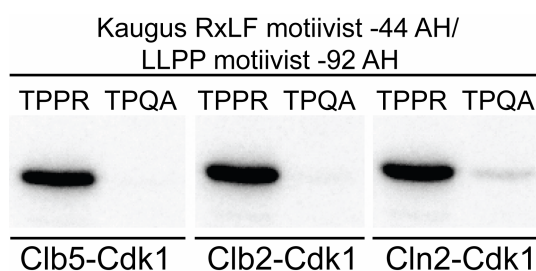
Hüdrofoobse seondumise efekt on suurim Clb5-Cdk1 kompleksil, tugevdades fosforüleerimist kuni 60 korda (Joonis 6B). Clb5 kompleksil on seondumismotiivi ja saidi vahelisel kaugusel ka suurim mõju: saidi paiknedes RxL motiivi lähedal, kaugustel -12 kuni +24 aminohapet stimuleerib hüdrofoobne seondumine fosforüleerimist vaid 1,5 kuni 3 korda, kaugustel -20 kuni -44 aga 40 kuni 60 korda. Liikudes RxL motiivist N-terminuse suunas, tõuseb tsükliin-sõltuva seondumise võimendav mõju fosforüleermisele kiiresti vahemikus 16 kuni 20 aminohapet. Clb5-Cdk1 puhul 16 aminohapet minimaalse fosforüleerimist toetava kaugusena on sarnane eelnevalt publitseeritud tulemustega tsükliin A-Cdk2 kompleksi kohta, mille puhul RxL motiivi minimaalseks fosforüleerimist tugevdavaks kauguseks on 15-16 aminohapet (Cheng jt, 2006). Distanti suurenedes 20-aminohappelisest optimumist edasi N-terminuse suunas väheneb seondumise efekt stabiilselt. C-terminuse suunas paiknevate saitide fosforüleerimist toetab seondumismotiiv umbes 5 korda nõrgemini ja suurematel kaugustel kui N-terminuse suunas, seetõttu võib oletada, et ülesvoolu paiknevate saitide fosforüleerimisel peab substraadi valguahel moodustama lingu. Seega võib RxL motiiv suunata Clb5-Cdk1 kompleksi fosforüleerima saite, mis paiknevad motiivist N-terminuse

suunas. Clb2-Cdk1 puhul stimuleerib RxL motiiv fosforüleerimist ainult N-terminuse suunas ja kuni 3 korda (Joonis 6C), mis on kooskõlas ka eelnevalt publitseeritud andmetega, et substraatide äratundmine RxL motiivi kaudu on olulisem Clb5 kompleksil (Loog ja Morgan, 2005). Cln2-Cdk1 puhul varieerub tsükliin-LP motiiv seondumise efekt fosforüleerimisele vahemikus 2 kuni 12 korda (Joonis 6D). LP motiiv võimendab Cln2-Cdk1 fosforüleermist suhteliselt sarnaselt nii N- kui C-terminuse suunas, vihjates, et Cln2 hüdrofoobse motiivi sidumise tasku on orienteeritud teisiti kui kindlalt suunaval tsükliinil Clb5. LP-Cln2 seondumise efekt on oluliselt nõrgem vaid saidi paiknedes motiivile lähemal kui umbes 30 aminohapet. Minimaalse kauguse olemasolu alusel toetavad nii RxL kui ka LP motiiv fosforüleerimist mehhanismil, mis nõuab fosforüleerimissaidi ja tsükliini seondumismotiivi samaaegset sidumist Cdk1 kompleksi poolt.



Joonis 6. Tsükliini seondumismotiivi kaugus mõjutab saidi fosforüleerimise kiirust. (A) Selgitav skeem, mis näitab kasutatud süsteemi ja uuritavat kaugust RxL ja LP seondumismotiivi suhtes. Erineva kauguse saavutamiseks muudeti optimaalse fosforüleerimissaidi järjestusega PSTPPRSRG positsiooni valgus, mis põhines Cdk1 substraadil Sic1. (B, C, D) Tsükliini ja substraadi vahelise seondumise mõju substraadi fosforüleerimisele *in vitro* kinaasireaktsioonis. Clb5 (B) ja Clb2 (C) puhul on seondumise mõju arvatud metsiktüüpi ja hüdrofoobse interaktsiooni võimetu ensüümkompleksi fosforüleerimiskiiruste suhtena. (D) Cln2 seondumise efekti leidmiseks on ilma peptiidita reaktsiooni kiirus jagatud reaktsiooni, millesse oli lisatud seondumisel konkureerivat LP peptiidi, kiirusega. (B, C, D) Graafikutel on esitatud kahe katse keskmine väärtus, veapiirideks on +/- standardhälve.

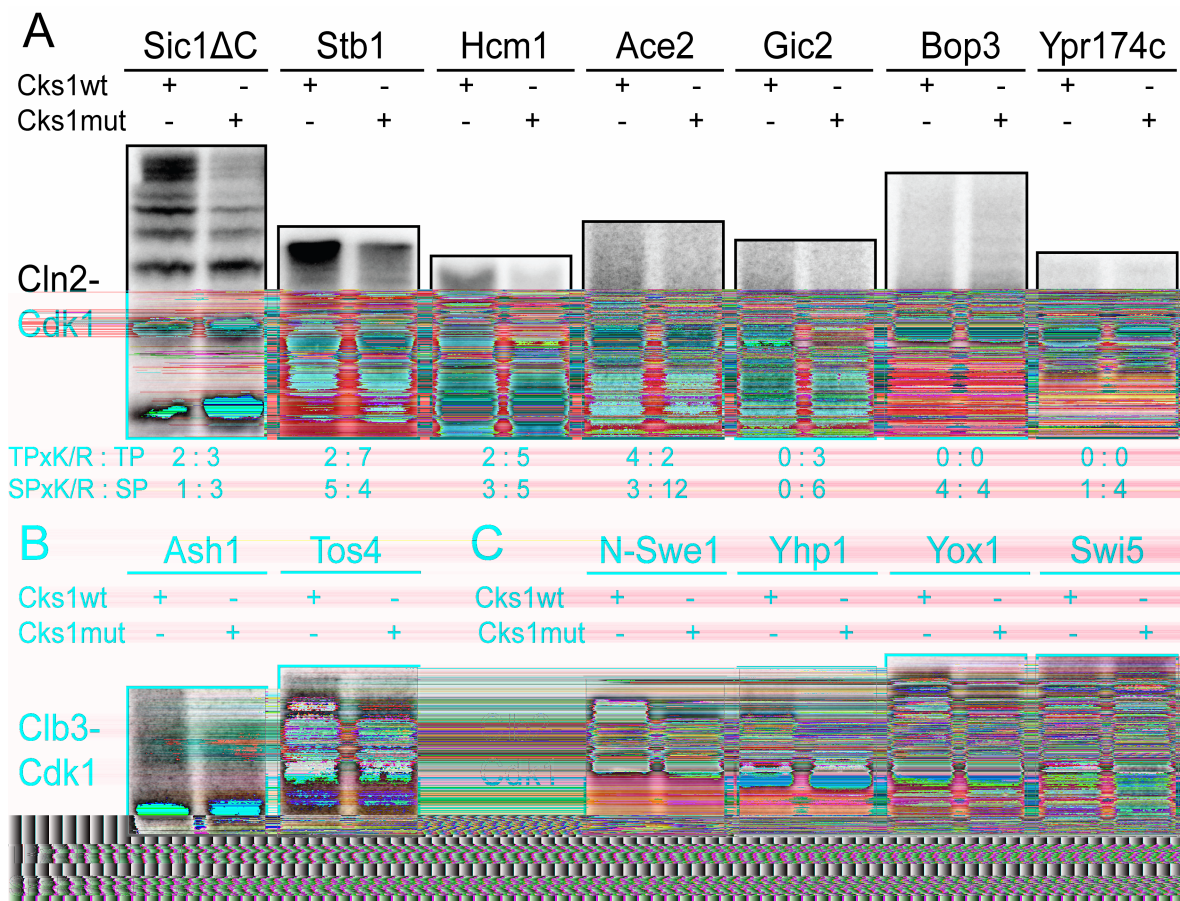
Uurimaks, kas tsükliin-sõltuv substraatide seondumine võimaldab kiiresti fosforüleerida ka suboptimaalseid saite, kasutati Sic1 Δ C baasil tehtud konstrukti, milles oli vaid üks suboptimaalne fosforüleerimissait, mis paiknes tsükliini seondumismotiividest fosforüleerimiseks optimaalsel kaugusel (Joonis 7). Ainult hüdrofoobse seondumise abil fosforüleeriti kasutatud kinaasikatsete tingimustes üksikut suboptimaalset saiti (TPQA) võrreldes optimaalse saidiga (TPPR) minimaalselt. Samas on näidatud, et Cdk1 fosforüleerib ka suboptimaalseid saite (Harvey jt, 2005) ning et seda võimaldab fosfoadaptormolekul Cks1 (Kõivomägi jt, 2011a)



Joonis 7. Tsükliinide seondumismotiividest sobival kaugusel paiknevat suboptimaalset fosforüleerimissaiti fosforüleerib Cdk1 võrreldes optimaalse fosforüleerimissaidiga väga aeglaselt. Joonisel on näidatud autoradiograafid SDS-PAA geelidel elektroforeesitud *in vitro* kinaasireaktsioonidest, milles oli Clb5-, Clb2- ja Cln2-Cdk1 substraadiks kas ühe optimaalse (PSTPPRSRG) või ühe suboptimaalse (QATPQAAAQ) RxL motiivist 44 ja LP motiivist 92 aminohappe kaugusel N-terminuse suunas paikneva fosforüleerimissaidiga Sic1 Δ C konstrukti.

2.2.13 Erinevate Cdk1 substraatvalkude multifosforüleerimise Cks1-sõltuvus on erinev

Enamik Cdk1 substraate sisaldavad mitut fosforüleerimissaiti ja on näidatud, et *in vivo* on Cdk1 substraadid sageli multifosforüleeritud (Holt jt, 2009). Samas on Cdk1 substraatide multifosforüleerimise mehhanism sageli teadmata, kusjuures pärmis *S. cerevisiae* on Cks1 rolli näidatud vaid Sic1 multifosforüleerimisel (Kõivomägi jt, 2011a). Uurimaks, kui laialt on levinud ja kuidas Cks1-sõltuv multifosforüleerimine varieerub erinevate Cdk1 substraatide puhul, viidi läbi kinaasikatsed 13 valguga (Joonis 8). Protsessi Cks1-sõltuvuse hindamiseks lisati Cdk1 kompleksidele kas metsiktüüpi Cks1 (Cks1wt) või fosfaatrühma mitesiduv Cks1 (Cks1mut). Erinevate valkude fosforüleerimisel omab Cks1 erinevat mõju. Kui näiteks Sic1 Δ C, Stb1, N-Swe1 ja Yhp1 puhul kogunevad kõrgelt fosforüleeritud vormid oluliselt kiiremini metsiktüüpi Cks1-ga reaktsioonides, siis Bop3, Ypr174 ja Swi5 multifosforüleerimist Cks1 ei mõjuta. On tähelepanuväärne, et uuritud substraadid erinevad fosforüleeritavate seriinide ja treoniinide jaotuses ning Bop3, Ypr174 ega Swi5 ei sisalda ühtegi optimaalset treoniini.



Joonis 8. Cdk1 substraaside multifosforüleerimise Cks1-sõltuvus. Multifosforüleerimise Cks1-sõltuvuse uurimiseks teostati *in vitro* kinnasireaktsioonid tsükliin-Cdk1 kompleksidega Cln2-Cdk1 (A), Clb3-Cdk1 (B) ja Clb2-Cdk1 (C), millele lisati kas metsiktüüpi Cks1 (Cks1wt) või fosfaatrühma mittesiduv Cks1 (Cks1mut). Valkude erinevalt fosforüleeritud vormide lahutamiseks elektroforeesiti reaktsioonisegud Phos-Tag SDS-PAA geelidel. Autoradiograafide all on näidatud optimaalsete (T/SPxK/R) ja suboptimaalsete (T/SP) seriinide ja treoniinide jaotus vastavas valgus.

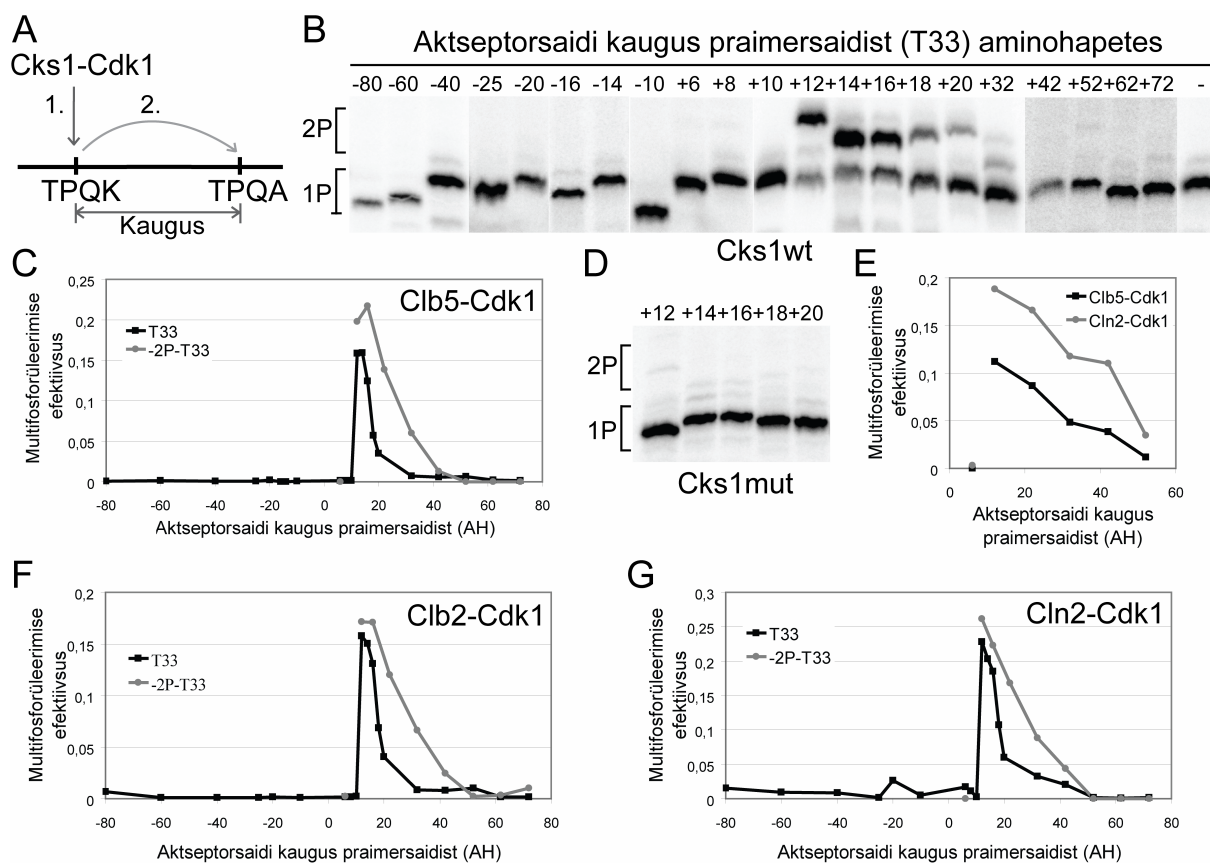
Nende valkude fosforüleerimist Cks1 ei mõjuta, sest Cks1 on võimeline siduma üksnes fosforüleeritud treoniini (Manuskript lisas 2). Vaid 13-valgulisest valimist on kõigil uuritud Cdk1 kompleksidel mitu substraati, mille multifosforüleerimist Cks1 stimuleerib, seega võib Cks1-sõltuv fosforüleerimine olla Cdk1 substraaside regulatsioonil laialt levinud mehhanism. Lisaks neile valkudele, mille fosforüleerimist Cks1 üldse ei mõjuta, varieerub Cks1 mõju tugevus ka ülejäänud substraaside hulgas. Näiteks on nii Stb1, Hcm1, Yhp1 kui ka Yox1 multifosforüleerimine Cks1-sõltuv, kuid Stb1 ja Yhp1 fosforüleerimisel on Cks1 võimendav mõju suurem kui Hcm1 ja Yox1 puhul.

2.2.14 Cks1-sõltuva multifosforüleerimise efektiivsust mõjutab praimer- ja aktseptorsaidi vaheline kaugus

Selgitamaks, mis põhjusel võiks joonisel 8 näidatud valkude seas kõrgelt fosforüleeritud vormide kogunemine varieeruda, uuriti edasi, kuidas kahe fosforüleerimissaidi vaheline

kaugus mõjutab Cks1-sõltuvat multifosforüleerimist. Selleks kasutati Sic1 Δ C baasil loodud ühe optimaalse ja ühe suboptimaalse fosforüleerimissaidiga substraatide süsteemi, milles igas konstruktis oli muudetud suboptimaalse saidi asukohta, saamaks erineva kahe saidi vahelise distantliga substraatide kogu (Joonis 9A). Kuna kasutatud kinaasikatsete tingimustes fosforüleeriti üksikut suboptimaalset saiti minimaalselt (andmed näitamata), fosforüleeritakse enamikul juhtudel esmalt optimaalne primersait, misjärel saab toimuda sekundaarse saidi Cks1-sõltuv fosforüleerimine (Joonis 9A).

Substraatide, milles suboptimaalne sait paikneb optimaalsest saidist N-terminaalses või kuni 10 aminohappe kaugusel C-terminaalses suunas, fosforüleerimisel tekib kahe fosfaadiga saadusi minimaalselt (Joonis 9B, C). Multifosforüleerimise efektiivsus tõuseb hüppeliselt alates suboptimaalse saidi paiknemisest 12 aminohappe kaugusel optimaalsest. Samas aktseptorjärjestuse paiknemisel kaugemal +12 kuni +14 aminohappelisest optimumist, nõrgeneb kinaasi võime substraati multifosforüleerida. Kasutatud süsteemis on suhteliselt kitsas saitidevahelise kauguse vahemik (+12 kuni +32), milles toimub detekteeritav multifosforüleerimine. Cks1-st sõltuv kahe saidi vaheline multifosforüleerimise vahemik suureneb, kui primersaidiks on T33, millel fosforüleeritavast treoniinist 2 aminohapet N-terminuse suunas paiknev glutamiin on asendatud proliiniga (-2P-T33). On näidatud, et proliin ja mitmed teised suured hüdrofoobsed aminohapped vastavas positsioonis interakteeruvad valgu Cks1 arginiiniga R75 (Seth Rubin, California ülikool, Santa Cruz, publitseerimata andmed). Seega moodustub -2P-T33 primersaidi puhul stabiilsem kompleks Cks1 ja fosforüleeritud substraadi vahel, võimaldades fosforüleerida kaugemal paiknevaid sekundaarseid saite. Protsessi Cks1-sõltuvuse kontrollimiseks teostati samade substraatidega reaktsioonid, kasutades anioone mittesiduvat Cks1-te (Cks1mut) (Joonis 9D). Mutantse Cks1-ga reaktsioonides tekib kahe fosfaadiga vorme minimaalselt ka optimaalsete positsioonidega substraatides, järelikult on funktsionaalne Cks1 vajalik nende substraatide multifosforüleerimiseks ning Cks1-sõltuva fosforüleerimise efektiivsust mõjutab oluliselt kahe saidi vaheline kaugus. Kontrollimaks, et kauguse suurenedes multifosforüleerimise vähenemine ei ole põhjustatud struktuursetest muutustest saidist T33 C-terminuse poole jäävas alas, uuriti samade kauguste ja aktseptorsaidiga süsteemi, milles oli optimaalseks saidiks valgu Sic1 fosforüleerimissait T5 (Joonis 9E). Aminohappes T5 (järjestus PSTPPRSRG) 2 aminohapet N-terminuse suunas asub proliin ning seega peaks T5-saidiga substraadid olema võrreldavad -2P-T33 primersaiti sisaldavate konstruktidega. Ka T5 konstruktidel puhul langes multifosforüleerimine kiiresti kauguse suurenedes, kinnitades Cks1-vahendatud fosforüleerimise efektiivsuse sõltuvust saitide paiknemisest.

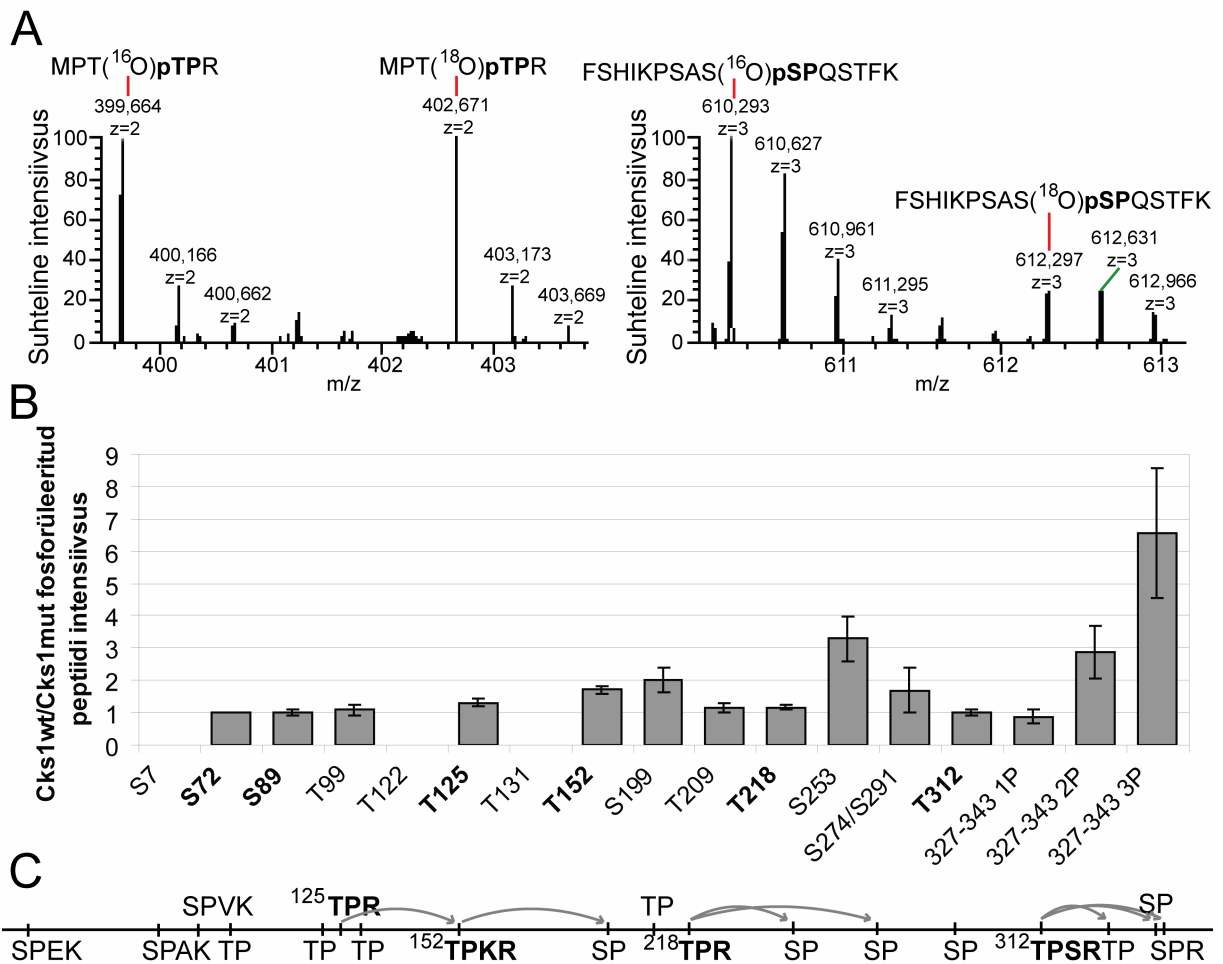


Joonis 9. Cks1 vahendusel toimuva multifosforüleerimise efektiivsus sõltub praimer- ja aktseptorsaidi vahelisest kaugusest. (A) Skeem Cks1-sõltuva multifosforüleerimise mehhanismist, mille korral tsükliin-Cdk1-Cks1 kompleks fosforüleerib esmalt optimaalse saidi, seejärel seondub Cks1 fosforüleeritud saidiga, toetades sekundaarse saidi fosforüleerimist. (B) Autoradiograafid Phos-Tag SDS-PAA geelidest, millel on Clb5-Cdk1 kompleksiga tehtud kinaasireaktsioonid Sic1 alusel loodud substraatidega, milles on kaks fosforüleerimissaiti: optimaalne sait T33 ning suboptimaalne sait erinevatel kaugustel praimersaidist (T33) (C) Kvantifitseeritud signaalide alusel arvatati Clb5-Cdk1 multifosforüleerimise efektiivsus, mis näitab kahekordselt fosforüleeritud vormide osa kogu fosforüleeritud substraadist, T33 ja -2P-T33 (glutamiin positsioonis 31 oli asendatud proliiniga) praimersaitide puhul. Multifosforüleerimise efektiivsus arvatati umbes 15% substraatvalgu läbireageerimise tasemel. Saadud väärtus ei ole kineetiline konstant, sest selle täpne väärtus kehtib vaid kindlates tingimustes (D) Samasugused reaktsioonid nagu alajoonisel B teostati ensüümkompleksiga Clb5-Cdk1, millele lisati fosfaatrühma mittesiduv Cks1 (Cks1mut). (E) Clb5- ja Cln2-Cdk1 multifosforüleerimise efektiivsus T5 praimersaidi puhul. (F, G) Multifosforüleerimise efektiivsus Clb2-Cdk1 (F) ja Cln2-Cdk1 (G) puhul. Katsed teostati vähemalt kahes korduses, graafikutele on näidatud esindusliku katse tulemused.

Vaatamata sellele, et tugevamalt Cks1-ga seondub praimer ja optimaalne aktseptorsait võimaldavad efektiivset multifosforüleerimist suuremal kaugusel (Joonis 9C, joonis 13A, B), jäi lähimaks piiriks kõigi katsetatud süsteemide puhul 12 aminohapet. Range minimaalse kauguse olemasolust võib järeldada, et sarnaselt tsükliin-substraat seondumisega toetab ka Cks1 fosforüleerimist mehhanismil, mille puhul Cdk1 kompleks seob samaaegselt nii Cks1 kaudu praimersaidi kui ka aktiivsentriga aktseptorsaidi. Kõigi kolme katsetatud tsükliin-Cdk1 kompleksi puhul on Cks1-vahendatud mehhanismi sõltuvus saitidevahelisest kaugusest

sarnane (Joonis 9C, F, G), mis vihjab, et tsükliinid ei mõjuta kompleksi Cks1-Cdk1 osa struktuuri ja Cks1 funktsioneerimist.

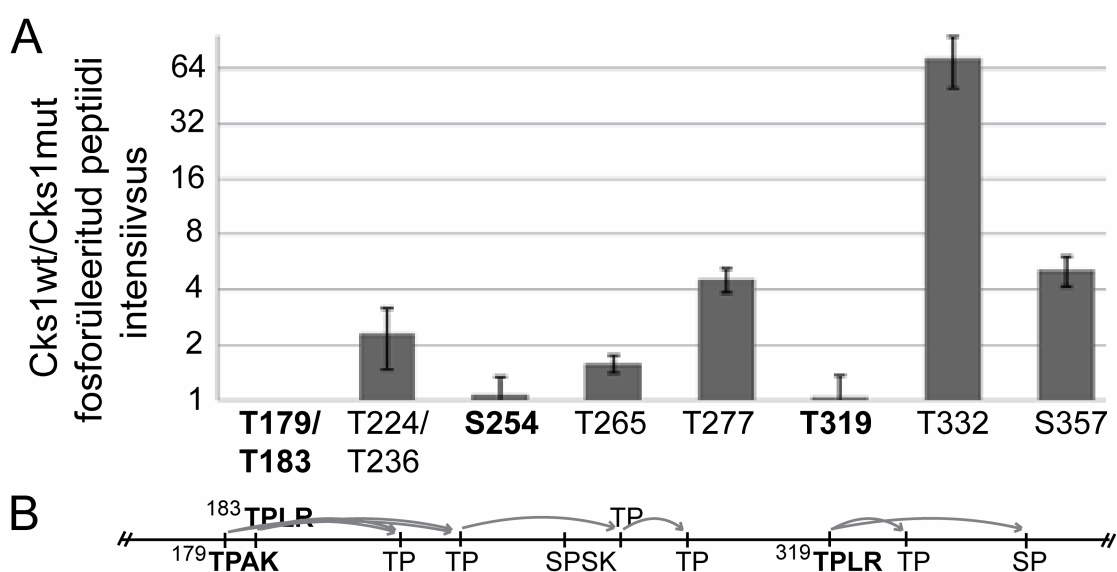
Leitud tulemuste alusel peaks Cks1-sõltuvalt multifosforüleeritavas substraadis erinevatel saitidel olema erinev fosfoadaptormolekulist Cks1 tulenev mõju. Hüpooteesi kinnitamiseks analüüsiti mass-spektromeetriliselt Cdk1 füsioloogiliste substraatide Stb1 ja Ndd1 fosforüleerimissaitide Cks1-sõltuvat fosforüleerimist. Kooskõlas joonise 9 tulemusega, et Cks1-sõltuv fosforüleerimine toimub praimersaidist C-terminuse suunas, ei ole Stb1 aminohapete S72, S89, T99 ning T125 fosforüleerimine Cks1-sõltuv (Joonis 10A). Esimene potentsiaalne praimersait on T125, millest +27 aminohappe kaugusel paikneva järgmise optimaalse saidi T152 fosforüleerimine on 1,7 korda Cks1-sõltuvalt võimendatud (Joonis 10A, B). T152 suhtes positsioonis -2 asub fenüülalaniin, mis on Cks1 sidumist soodustav faktor. T152 võiks joonise 9 alusel toetada S199 fosforüleerimist, mis on samuti tugevam metsiktüüpi Cks1-ga reaktsioonis. Optimaalsest saidist T152 57 aminohappe kaugusel asuva T209 fosforüleerimine ei ole mõjutatud valgust Cks1. Fosforüleeritavast treoniinist +2 positsioonis oleva arginiini tõttu on T218 Cln2-Cdk1 jaoks optimaalne sait, millel on ka Cks1 sidumist toetav proliin treoniinist 2 aminohapet N-terminuse suunas, seetõttu võib T218 olla praimersaidiks saitidele S253 ja S274. S253 on kaks korda enam Cks1-sõltuvalt fosforüleeritud kui S274, mis kinnitab eelnevaid tulemusi, et Cks1-vahendatud fosforüleerimise efektiivsus väheneb aktseptorsaidi paiknedes optimaalsest distantist kaugemal. Cks1 tugevdab ka T327, S341 ja S343 fosforüleerimist, millest potentsiaalne praimersait T312 paikneb vastavalt +15, +29 ja +31 aminohappe kaugusel. Cln2 puhul on Cks1-sõltuva fosforüleerimise efektid väiksemad kui joonisel 9 näidatud Clb5 kompleksil, sest Cln2-Cdk1 kompleksil ei toimu Cks1 vahetus täielikult ning ka Cks1mut-ga reaktsioonis jääb osa Cln2-Cdk1-Cks1wt komplekse (Kõivomägi jt, 2011a).



Joonis 10. Cks1 mõju Stb1 fosforüleerimissaitidele. Kinaasireaktsioonid teostati Cln2-Cdk1 kompleksidega, millele lisati kas metsiktüüpi või mutantne Cks1, ning analüüsiti mass-spektromeetriliselt. (A) Spektrid, mis näitavad fosforüleeritud potentsiaalset praimersaiti T218 sisaldava ning aktseptorsaiti S253 sisaldava peptiidi intensiivsusi. Näidatud spektritel on ¹⁶O-ATP-ga metsiktüüpi Cks1-ga Cln2-Cdk kompleksi poolt fosforüleeritud peptiid ja ¹⁸O-ATP-ga katioonse tasku mutantse Cks1-ga kompleksi poolt fosforüleeritud peptiid. (B) Kahe katse keskmised Cks1wt-ga ja Cks1mut-ga komplekside poolt fosforüleeritud peptiidide intensiivsuste suhted kõigi Stb1 fosforüleerimissaitide puhul. Optimaalsed fosforüleerimissaidid on tähistatud rasvase kirjaga. Vähendamaks ensüümi ja substraadi pipeteerimisest tulenevat viga fosforüleerimissaitide Cks1-sõltuvuse analüüsimisel, normaliseeriti peptiidide intensiivsused pS72 järgi, mis on esimene optimaalne sait ning mille intensiivsus võeti Cks1wt ja Cks1mut puhul võrdseks. Veapiirideks on 95% usalduspiirid. Fosforüleeritud S7, T122 ning T131 aminohappeid sisaldavaid peptiide ei leitud. (C) Skeem, mis näitab Stb1 Cdk1 fosforüleerimissaitide paiknemist valgu primaarjärjestuses. Stb1 valgu järjestus võeti veebilehelt <http://www.yeastgenome.org/>. Nooltega on kujutatud osajoonise A tulemustest lähtuvad hüpoteetilised Cks1-sõltuvad fosforüleerimise kaskaadid.

Ndd1 esimene optimaalne sait, mis võiks funktsioneerida praimersaidina, on T179, millest efektiivseks multifosforüleerimiseks suhteliselt kaugel paikneva saite T224 ja T236 sisaldava peptiidi fosforüleerimine on 2 korda tugevam metsiktüüpi Cks1 sisaldavas reaktsioonis (Joonis 11A). Eelnevate tulemuste alusel on vastavas peptiidis fosforüleeritud pigem T236, millest +4 positsioonis asub lüsiin, mis soodustab fosforüleerimist Cdk1 poolt (Kõivomägi jt,

2011a). Kuigi pT224 võiks olla primersaidiks saidile T236, ei ole neid kahte sisaldavas peptiidis suurt Cks1 efekti tõenäoliselt selle pärast, et T224 on ise primersaidist suure kauguse tõttu minimaalselt fosforüleeritud (Joonis 11A, B). T236 on suboptimaalne sait, mis paikneb 53 aminohappe kaugusel primersaidist. Seetõttu on T236 fosforüleerituse tase eelduste kohaselt madal ning ei tugevda Cks1 vahendusel optimaalse saidi S254 fosforüleerimist, mis võib toimuda kiiresti ka Cks1-sõltumatult. Ka vähesel määral fosforüleeritud T236 võiks toetada teise suboptimaalse saidi T265 fosforüleerimist, mis on 1,5 korda tugevamalt fosforüleeritud funktsionaalset Cks1-te sisaldavas reaktsioonis. pT265 võib omakorda soosida sobival 12-aminohappelisel kaugusel paikneva T277 Cks1-sõltuvat fosforüleerimist.



Joonis 11. Ndd1 saitide fosforüleerimise Cks1-sõltuvus. Ndd1 saitide fosforüleerimise Cks1-sõltuvust *in vitro* kinaasireaktsioonis Clb2-Cdk1-ga uuriti mass-spektromeetriliselt. (A) Cks1wt-ga ja Cks1mut-ga komplekside poolt fosforüleeritud peptiidide intensiivsuste suhted kõigi detekteeritud Ndd1 fosforüleerimissaitide puhul. Optimaalsed saidid on tähistatud rasvase kirjaga. Vähendamaks ensüümi ja substraadi pipeteerimisest tulenevat viga fosforüleerimissaitide Cks1-sõltuvuse analüüsimisel, normaliseeriti peptiidide intensiivsused fosforüleeritud T179 ja T183 sisaldava peptiidi järgi, mis on esimene optimaalset saiti sisaldav peptiid ning mille intensiivsus võeti Cks1wt ja Cks1mut puhul võrdseks. Tulbad on kahe katse keskmised väärtused ning veapiiridena on esitatud 95% usalduspiirid. Ndd1 aminohappeid S47, T57, S157, S168, S409, T411 sisaldavaid fosforüleeritud peptiidide ei leitud. (B) Skeem, mis näitab Ndd1 positsioonides 170 kuni 370 olevate CDK fosforüleerimissaitide paiknemist valgu primaarjärjestuses. Ndd1 valgu järjestus võeti veebilehelt <http://www.yeastgenome.org/>. Nooltega on kujutatud osajoonise A tulemustest lähtuvad hüpoteetilised Cks1-sõltuvad fosforüleerimise kaskaadid.

Enim (72 korda) võimendas Cks1 suboptimaalse saidi T332 fosforüleerimist, millest 13 aminohapet N-terminuse suunas asub optimaalne primersait. Kooskõlas joonise 9 tulemustega väheneb Cks1-vahendatud fosforüleerimise efektiivsus saitidevahelise kauguse

suurenedes. Praimersaidist 38 aminohappe kaugusel paikneva S357 fosforüleerimine on samuti Cks1-sõltuv, kuid Cks1 võimendav efekt on 14 korda nõrgem, kui T332 puhul, mis on 13 aminohappe kaugusel samast praimersaidist.

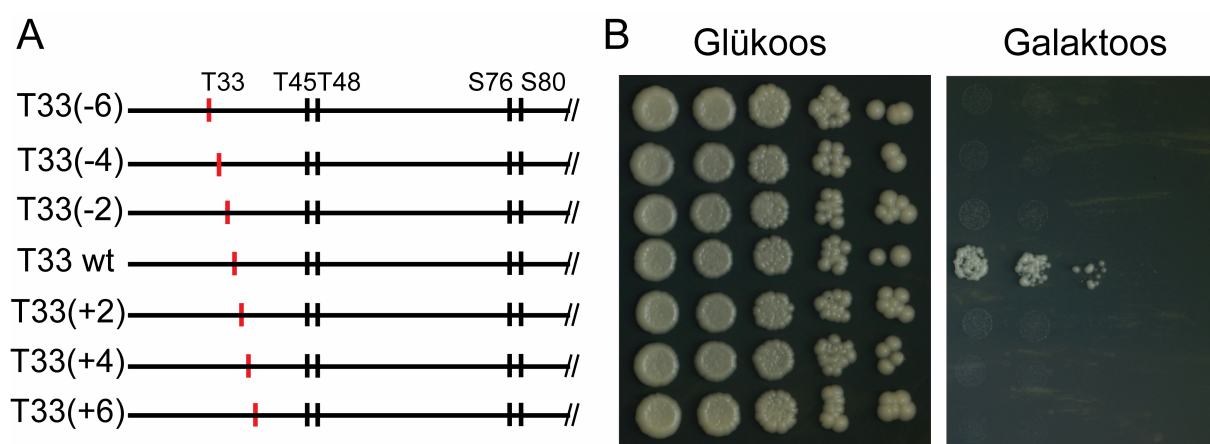
Multifosforüleerimise sõltuvus saitidevahelisest kaugusest lisab võimalusi, mille tõttu erinevate valkude erinevate saitide fosforüleerimiskiirus võib varieeruda. Sellest lähtuvalt on fosforüleerimissaitide võrgustikes peale optimaalsete ja suboptimaalsete saitide arvu oluline ka saitide omavaheline paiknemine. Näiteks kui mingi substraadi lagundamiseks peab valk olema fosforüleeritud kindlast suboptimaalsest Cdk1 saidist ja valgu lagundamiskiirus sõltub fosforüleerimiskiirusest, siis kui vastav suboptimaalne sait paikneb 12 kuni 20 aminohappe kaugusel optimaalsest saidist, fosforüleeritakse ja lagundatakse valk kiiresti. Sama protsess võiks toimuda oluliselt aeglasemalt, kui suboptimaalne väljundsait paikneks näiteks 50 aminohappe kaugusel praimersaidist. Saitide omavahelisest paiknemisest sõltuv multifosforüleerimise mehhanism aitab selgitada, miks joonisel 8 olevate valkude multifosforüleerimine sõltub fosfoadaptorist Cks1 väga erineval määral.

Seni on näidatud vaid väike arv Cks1-sõltuvalt multifosforüleeritavaid substraate (Joonis 8, manuskript lisas 2), seetõttu kasutati saadud teadmisi Cks1-sõltuvast fosforüleerimisest, et hinnata, kui suure osa Cdk1 substraatide multifosforüleerimist võiks Cks1 mõjutada. Kasutades *Saccharomyces Genome Database*'i veebilehel olevat *Yeast Genome Pattern Matching* tööriista (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/PATMATCH/nph-patmatch>), otsiti *S. cerevisiae* proteoomist valke, milles optimaalne Cdk1 fosforüleerimissait T-P-x-K/R paikneb 12 kuni 32 aminohappe kaugusel või Cks1 valku tugevamalt siduv motiiv F/I/L/P/V/W/Y-x-T-P-x-K/R (Seth Rubin, California Ülikool, Santa Cruz, avaldamata andmed) 12 kuni 52 aminohappe kaugusel N-terminuse suunas potentsiaalsest aktseptorsaidist. Otsinguga leiti 218 valku, millest 58 on suuremahulises Cdk1 substraatide uuringus, milles leiti 185 Cdk1 substraati, näidatud kui Cdk1 substraadid (Ubersax jt, 2003). Selle ennustuse kohaselt võiks Cks1 mõjutada 31% Cdk1 substraatide multifosforüleerimist. Lisaks seondumisele Cdk1 poolt fosforüleeritud treoniinidega võib Cks1 interakteeruda ka teiste proliin-suunatud kinaaside poolt fosforüleeritud saitidega.

2.2.15 Fosforüleerimissaitide paiknemine mõjutab Cdk1 väljundsignaali *in vivo*

Selgitamaks, kas leitud Cks1-sõltuvat fosforüleerimist mõjutavad kaugused on olulised Cdk1 väljundsignaalis *in vivo*, uuriti pärmitüvede elumuse vaatlemise kaudu pärmi võimet Sic1 mutante fosforüleerida (Joonis 12). Kui Cdk1 ei suuda B-tüüpi tsükliinide inhibiitorit Sic1

piisavalt fosforüleerida, et üleekspressseeritud Sic1 lagundataks, jäävad rakud G1-faasi, kuna B-tüüpi tsükliinid ei saa funktsioneerida ja algatada S-faasi spetsiifilisi protsesse (Verma jt, 1997). Sic1 kiireks degradatsiooniks peab Cdk1 fosforüleerima väljundsaitide paarid T45-T48 ja S76-S80 (Hao jt, 2007; Kõivomägi jt, 2011a). Saitide omavahelise paiknemise olulisuse uurimiseks ekspresseeriti pärmis *S. cerevisiae* galaktoosi promooterilt Sic1 mutante, milles oli 5 Cdk1 saiti: T33, T45, T48, S76 ja S80. Erinevates konstruktidest oli T33 fosforüleerimissaidi positsiooni nihutatud kahe aminohappe kaupa N- või C-terminuse suunas (Joonis 12A). T45 ja T48 ei ole optimaalsed Cdk1 fosforüleerimissaidid, seetõttu toimub nende fosforüleerimine põhiliselt Cks1-sõltuval mehhanismil (Kõivomägi jt, 2011a).



Joonis 12. T33 paiknemine optimaalsel kaugusel saitidest T45 ja T48 on vajalik Sic1 kiireks degradatsiooniks *in vivo*. Pärmis elumuse katse erinevates tüvedega, milles on galaktoosi promooteri kontrolli all erinevad Sic1 versioonid, mis sisaldavad fosforüleerimissaiti T33, T45, T48, S76 ja S80. (A) Erinevates konstruktidest oli muudetud T33 asukohta 2 aminohappe kaupa C- ja N-terminuse suunas. (B) Erinevate pärmitüvede lahjendusridade väljakülvid kas glükoosi või galaktoosi sisaldavatele söötmetassidele.

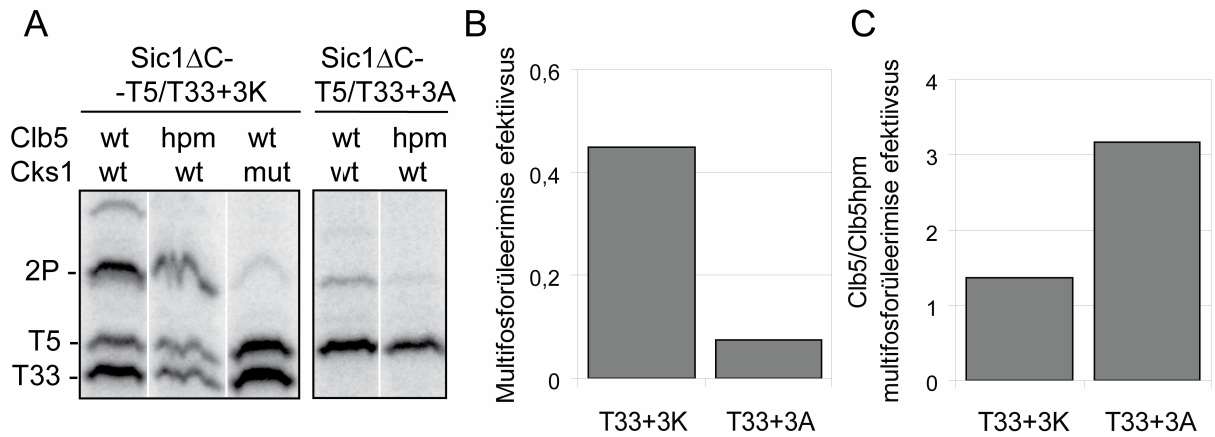
Metsiktüüpi Sic1 valgus paikneb T45 praimersaidist T33 12 aminohappe kaugusel, võimaldades Cks1 vahendusel kiiret multifosforüleerimist. Nihutades konstruktidest praimersaiti vaid kahe aminohappe võrra kummaski suunas, ei suuda vastavat Sic1 üleekspressseerivad rakud jaguneda (Joonis 12A, B). Liigutades T33 positsiooni, muutub praimer- ja aktseptorsaidi vaheline kaugus. T33(+2) mutandis on T33 ja T45 vaheline kaugus 10 aminohapet, mis vähem kui Cks1-sõltuvaks fosforüleerimiseks vajalik väikseim distant (Joonis 9B). Kui praimersaiti liigutada N-terminuse poole, suureneb kaugus saidist T48 17 aminohappeni. T48 ei ole tavapärase CDK saiti, kuna fosforüleeritavale treoniinile ei järgne T48 puhul proliini. Seetõttu võib tema fosforüleerimine sõltuda praimersaidi kaugusest tugevamalt kui suboptimaalse TP saiti puhul, mistõttu saab efektiivne fosforüleerimine toimuda vaid väga kitsas vahemikus. Rakutsükli kulgemiseks lagundatakse üleekspressseeritud Sic1 piisava kiirusega vaid T45-T48 paari paiknedes optimaalsel 12-16 aminohappelisel

kaugusel praimersaidist (Joonis 12B). Seega mõjutab saitide paiknemine multifosforüleerimisvõrgustikes Cdk1 väljundsignaali *in vivo* ning praimer- ja aktseptorsaidi vahelisest kaugusest sõltub Cdk1 aktiivsuse künnis, mis on vajalik Sic1 degradatsiooniks.

2.2.16 Multifosforüleerimise efektiivsust suurendavad optimaalne aktseptorsait ja tsükliin-substraat seondumine

Cks1 vahendusel toimuva multifosforüleerimise tugev sõltuvus praimer- ja aktseptorsaidi vahelisest kaugusest vihjab, et multifosforüleerimiseks peab ensüüm samaaegselt seonduma nii Cks1 kui aktiivtsentri kaudu. Kuna tsükliini ja substraadi vaheline täiendav interaktsioon stabiliseerib CDK-substraat kompleksi, võib vastav seondumine toetada Cks1-sõltuvat multifosforüleerimist. Hüpoteesi uurimiseks võrreldi metsiktüüpi Clb5-Cdk1 ja muteeritud hüdrofoobse taskuga Clb5hpm-Cdk1 multifosforüleerimise võimet (Joonis 13A, C). *In vitro* kinaasireaktsioonis oli substraadiks kahe fosforüleerimissaidiga Sic1ΔC konstrukt, milles oli praimersaidiks T5 ja aktseptorsaidiks kas metsiktüüpi T33 või suboptimaalseks saidiks muudetud T33+3A.

Multifosforüleeritud produkti osakaal on oluliselt suurem, kui aktseptoriks on optimaalne sait (Joonis 13A, B). Aktseptorsaidist T33 +3 positsioonis oleva lüsiini muteeriminealaniiniks vähendab multifosforüleerimise efektiivsust üle 5 korra. Kuigi optimaalseid saite fosforüleeritakse kiiresti ka ilma Cks1 abita (Joonis 6), toimus joonisel 12 esitatud kinaasikatse tingimustes T5 ja T33 sisaldava substraadi kahekordne fosforüleerimine põhiliselt Cks1-sõltuval mehhanismil (joonis 13A). Kahe optimaalse saidi suhteliselt kiire multifosforüleerimine saitidevahelisel kaugusel 28 aminohapet näitab, et optimaalse aktseptorsaidi puhul võib Cks1-sõltuv multifosforüleerimine toimida laiemas kauguste vahemikus kui joonisel 9 näidatud suboptimaalse aktseptori puhul. Kui optimaalse aktseptorsaidi puhul ei erine metsiktüüpi ja RxL-seondumisvõimetu Clb5 multifosforüleerimise võime oluliselt, siis suboptimaalse aktseptori korral suurendab tsükliin-vahendatud seondumine kahekordset fosforüleerimist umbes 3 korda (joonis 13C). Sic1ΔC-T5/T33+3K multifosforüleerimist ei mõjuta tsükliin-substraat seondumine ilmselt seetõttu, et Cks1 seondumisel võib praimersaidist sobival distantisil paikneva optimaalse sekundaarse saidi fosforüleerimine toimuda väga kiiresti. Cdk1 jaoks madalama afiinsusega saidi fosforüleerimine toimub aeglasemalt ja seetõttu võib RxL-tsükliin interaktsiooni tõttu moodustuv stabiilsem kompleks võimaldada suuremat fosfaatrühma ülekande tõenäosust suboptimaalsele saidile. Seega mõjutab lisaks aktseptor- ja praimersaidile ning nende paiknemisele Cks1-sõltuvat multifosforüleerimist ka tsükliini ja substraadi vaheline seondumine.



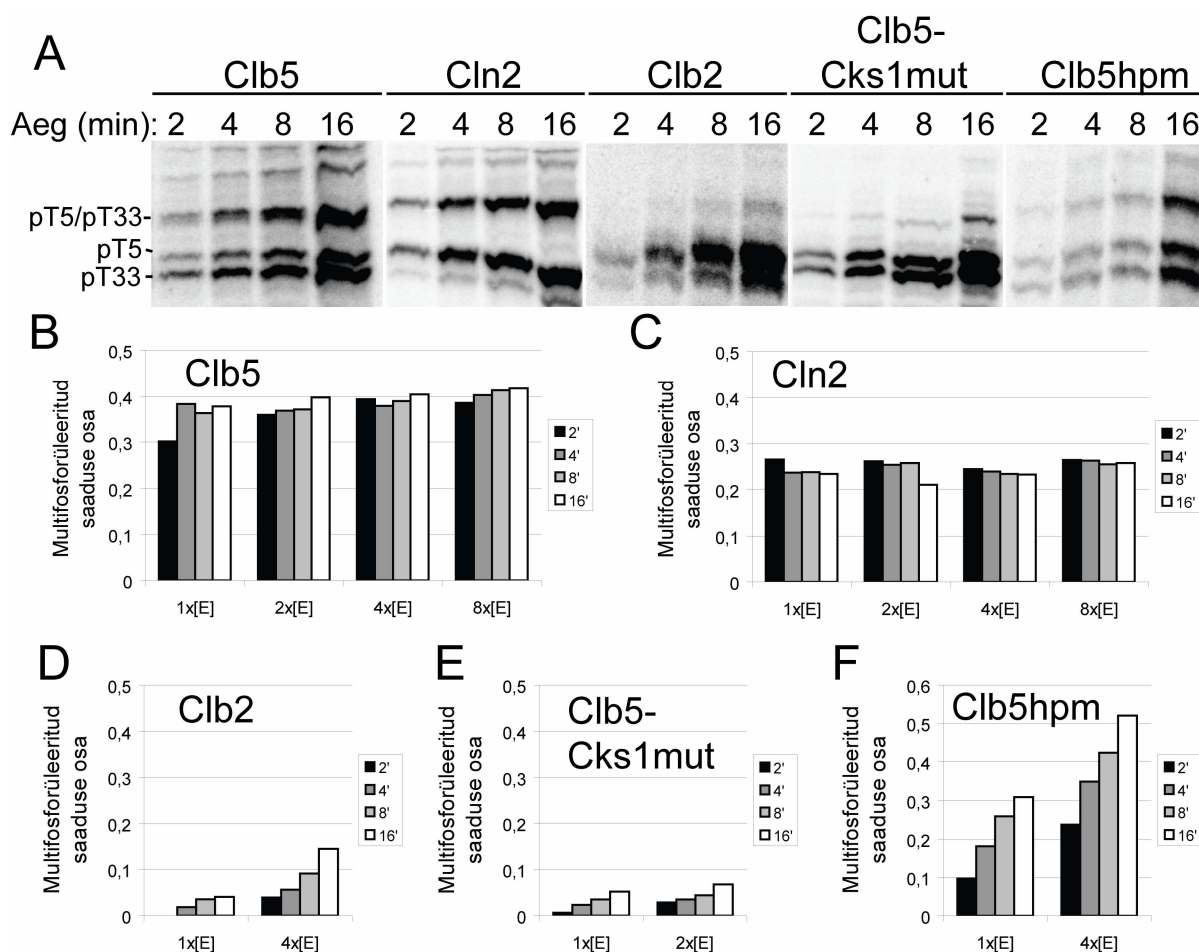
Joonis 13. Optimaalne aktseptorsait ning tsükliini ja substraadi vaheline seondumine toetavad multifosforüeerimist. (A) Kahe CDK fosforüeerimissaidiga Sic1ΔC konstrukti fosforüeerimist uuriti *in vitro* ning fosforüeeritud vormid lahutati Phos-Tag SDS-PAAG meetodil. (B) Clb5-Cdk1 kompleksi võime multifosforüeerida aktseptorsaidina metsiktüüpi T33 ja +3alaniiniga T33 saiti sisaldavat Sic1ΔC konstrukti. Kvantifitseeritud fosfovormide põhjal arutati multifosforüeerimise efektiivsus, jagades multifosforüeeritud vormi (2P) fosforüeeritud T5 ja 2P summaga. (C) Metsiktüüpi ja hüdrofoobse tasku mutantse Clb5 multifosforüeerimise efektiivsuste suhe alajoonisega B samade substraadide puhul.

2.2.17 Cks1 ja tsükliin-substraat seondumine võimaldavad protsessiivset fosforüeerimist

Lisaks eelmistes peaktükkides uuritud faktoritele võimaldaks Cdk1 substraadide multifosforüeerimist ajaliselt eristada protsessiivselt ja distributiivselt fosforüeeritavate substraadide olemasolu. Uurimaks, mil määral ja milliste mehhanismide vahendusel võib Cdk1 substraadide multifosforüeerimine toimuda protsessiivselt, vaadeldi kinaasikatsetes kahte fosforüeerimissaiti sisaldava konstrukti Sic1ΔC-T5/T33 topelfosforüeeritud saaduse teket erinevatel ensüümi kontsentratsioonidel ning ajapunktidel (Joonis 14A). Kinaasikatsed teostati madalal (alla 3% totaalsest) läbireageerinud substraadi hulgal, et minimaliseerida multifosforüeeritud vormide teket distributiivsel või fosfokooperatiivsel mehhanismil. Erinevalt distributiivsest või kooperatiivsest mehhanismist ei sõltu protsessiivsel fosforüeerimisel multifosforüeeritud saaduste osakaal fosforüeeritud substraadi kontsentratsioonist, kuna multifosforüeeritud vormid tekivad seondumisel fosforüeerimata substraadiga.

Clb5 ja Cln2 puhul on multifosforüeeritud vormide teke erinevatel ensüümi kontsentratsioonidel ja ajahetkedel väga sarnane, seetõttu peab valdav osa multifosforüeeritud produktist olema tekkinud protsessiivsel mehhanismil (Joonis 14A, B, C). Clb2-Cdk1 kompleksiga läbi viidud reaktsioonides on multifosforüeeritud saadust

varajastes ajapunktides minimaalselt ja selle teke sõltub läbi reageerinud substraadi hulgest, seega ei fosforüleeri Clb2-Cdk1 substraati Sic1 Δ C- T5/T33 protsessiivselt (Joonis 14D).

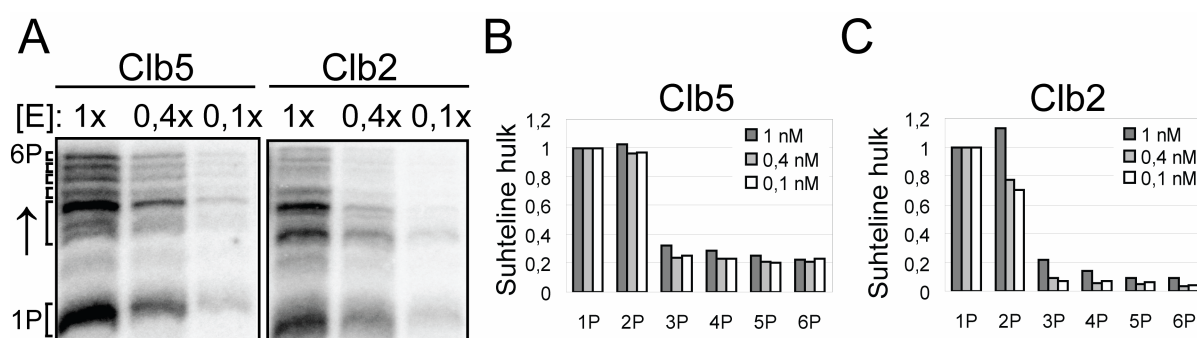


Joonis 14. Clb5-Cdk1 ja Cln2-Cdk1, kuid mitte Clb2-Cdk1, fosforüleerivad kahe optimaalse fosforüleerimissaidiga substraati Sic1 Δ C-T5/T33 semiprotsessiivselt. (A) Kinaasireaktsioonid lahutati Phos-Tag SDS-PAA geelelektroforeesil. Autoradiograafidel on kahe optimaalse fosforüleerimissaidiga Sic1 konstrukti Sic1 Δ C-T5/T33 fosforüleerimise ajaread erinevate ensüümkompleksidega. (B-F) Protsessiivsuse hindamiseks arvutati multifosforüleeritud saaduse osa, mis näitab pT5/pT33 produkti osa pT5 ja pT5/pT33 summast. Kuna kasutatud substraadi multifosforüleerimine toimus Cks1-sõltuvalt, tekivad topelfosforüleeritud saadused vaid reaktsioonides, kus esmalt fosforüleeritakse T5. Kui vastav osa on ajapunktides ja erinevatel ensüümi kontsentratsioonidel mõõtmisvea piires sama, siis näitab see, kui suur osa T5 fosforüleerimisreaktsioonidest läks protsessiivselt edasi T33 fosforüleerimiseni.

Selgitamaks, mis mehhanism võimaldab Clb5 ja Cln2 kompleksidel protsessiivset fosforüleerimist, uuriti Cks1 ja tsükliin-substraat seondumise mõju vastavale protsessile. Kuna mittefunktsionaalse Cks1 korral kaob Clb5-Cdk1 kompleksil võime substraati efektiivselt multifosforüleerida, on Cks1 vajalik protsessiivseks fosforüleerimiseks (Joonis 14 A, E). Ka Clb5hpm puhul on topelfosforüleeritud saaduse osakaalul tugev sõltuvus aja ja ensüümi kontsentratsiooniga ning vaatamata kiirele multifosforüleeritud vormi kogunemisele Cks1-sõltuva fosfokooperatiivsuse tõttu, fosforüleeritakse vähem kui 10% fosforüleeritud T5

saitide puhul protsessiivselt edasi ka sait T33 (Joonis 14 A, F). Kuna Clb5 hüdrofoobse seondumistasku muteerimise ainus teadaolev efekt on RxL motiiviga seondumise nõrgenemine, võib järeldada, et antud Sic1 konstrukti protsessiivseks fosforüleerimiseks on vaja nii Cks1 kui ka tsükliin-substraat hüdrofoobset interaktsiooni. Võrreldes tsükliinidega Cln2 ja Clb5 omab Clb2 vaid nõrka võimet seonduda Sic1 hüdrofoobsete seondumismotiividega (Joonis 6). Sekundaarse fosforüleerimise Cks1-sõltuvus vihjab, et pärast esimese saidi fosforüleerimist peab fosforüleeritud sait seonduma Cks1 katioonsesse taskusse. Clb5 ja Cln2 puhul võib substraat saidi liikumisel aktiivsenti ja Cks1 vahel olla seotud tsükliini hüdrofoobse taskuga, võimaldades umbes 25-40% substraatidest fosforüleerida protsessiivselt. Clb5hpm ja Clb2 puhul ei ole aga ümberhüppe toetamiseks ühtegi täiendavat komponenti ja fosforüleeritud substraat dissotsieerub suurema tõenäosusega ensüümkompleksi küljest lahti.

Lisaks Sic1 konstruktile võrreldi Clb5- ja Clb2-Cdk1 protsessiivse multifosforüleerimise võimet ka füsioloogilise substraadi Fin1 puhul. Fin1 (i.k *Filaments In between Nuclei 1*) on kääviniidistikku stabiliseeriv valk, mis seondub kääviniidistikuga anafaasis, kui Cdk1 on inaktiveeritud ja Fin1 defosforüleeritakse (Woodbury ja Morgan, 2007). Fosforüleerimise puudumisel toimub seondumine enne anafaasi, kahjustades kromosoomide lahknemist. Clb5-Cdk1 fosforüleerib Fin1-te osalise protsessiivsusega (Joonis 15 A, B), tagades rakkudes Fin1 kõrge fosforüleerituse ka madala ensüümi aktiivsuse juures või kõrge substraatide kontsentratsiooni puhul. Sarnaselt Sic1 konstruktile fosforüleerib Clb2-Cdk1 ka Fin1-te oluliselt väiksema protsessiivsusega kui Clb5-Cdk1 (Joonis 15A, C).



Joonis 15. Clb5-Cdk1 ja Clb2-Cdk1 substraatvalgu Fin1 fosforüleerimise protsessiivsuse võrdlus. (A) Fin1 fosforüleerimisreaktsioonid teostati kolmel ensüümi kontsentratsioonil, fosfovormid lahutati Phos-Tag SDS-PAAG meetodil. (B, C) Autoradiograafidelt kvantiseeriti signaalid, mis on märgitud autoradiograafi kõrvale, ning arvutati erinevate signaalide suhteline osa Clb5-Cdk1 (B) ja Clb2-Cdk1 (C) jaoks. Graafikutel näidatud 1P-6P on oletatavad fosfaatide arvud, mis põhinevad eeldusel, et rohkem fosforüleeritud vormid liiguvad Phos-Tag SDS-PAA geelis aeglasemalt.

Kokkuvõte

Käesoleva töö põhiliseks eesmärgiks oli uurida, kuidas Cdk1 fosforüleerimissaidi paiknemine teiste fosforüleerimissaitide või tsükliini seondumismotiivide suhtes võib mõjutada vastavat fosforüleerimisreaktsiooni. Selleks analüüsiti kahte tsükliin-Cdk1-Cks1 ensüümkompleksi substraatide äratundmismehhanismi: tsükliin-substraat interaktsiooni ja fosfoadaptorvalgu Cks1 vahendatud seondumist.

In vitro kinaasireaktsioonidega näidati, et tsükliini seondumismotiivide mõju fosforüleerimisele sõltub fosforüleerimisjärjestuse ja seondumismotiivi paiknemisest. G1 tsükliini Cln2 spetsiifiline motiiv (LP motiiv) stimuleerib Cln2-Cdk1 kompleksi sarnasel määral fosforüleerima saite seondumismotiivist nii N- kui ka C-terminuse suunas, kuid ei toeta fosforüleerimist saidi paiknedes seondumismotiivi vahetus läheduses. RxL motiiv aga suunab S-faasi-spetsiifilise Clb5-Cdk1 kompleksi fosforüleerima saite, mis asuvad motiivist N-terminuse suunas. Suboptimaalse saidi fosforüleerimine tsükliin-substraat seondumise vahendusel toimus ka saidi optimaalsel paiknemisel väga aeglaselt.

Suboptimaalsete saitide fosforüleerimisel on eelnevalt näidatud fosfoadaptorvalgu Cks1 olulisust, kuid vaid ühe Cdk1 substraadi puhul. Cks1 seondub fosforüleeritud treoniiniga, mis sel juhul võib toimida praimersaidina järgmiste saitide fosforüleerimisel. Kasutades 14 Cdk1 substraati leiti, et kõik uuritud kompleksid, nii Cln2-, Clb3- kui ka mitootiline Clb2-Cdk1 omavad füsioloogilisi substraate, mille multifosforüleerimist vastava ensüümkompleksi poolt tugevdab Cks1. Seega võib Cks1-sõltuv multifosforüleerimine olla *S. cerevisiae* Cdk1 substraatide regulatsioonil levinud mehhanism, kuigi Cks1 mõju tugevus on erinevate substraatide puhul varieeruv. Tulemuse selgitamiseks uuriti Cks1-sõltuvat multifosforüleerimist kahe saidiga süsteemis ning leiti, et Cks1-vahendatud multifosforüleerimise efektiivsusel on tugev seos praimer- ja aktseptorsaidi omavahelise paiknemisega. Cks1 toetab multifosforüleerimist sekundaarse saidi paiknedes vähemalt 12 aminohappe kaugusel C-terminuse suunas. Cks1-sõltuv multifosforüleerimine toimub efektiivselt vaid suhteliselt kitsas kahe saidi vaheliste kauguste vahemikus, kusjuures vastav kaugus sõltub nii praimersaidi Cks1 sidumise afiinsusest, aktseptorsaidist kui ka tsükliin-substraat seondumisest. Cks1-vahendatud fosforüleerimise sõltuvus saitide omavahelisest paiknemisest leidis kinnitust ka kahe metsiktüüpi Cdk1 substraadi fosforüleerimise mass-spektromeetrilisel analüüsimisel. Lisaks leiti, et tsükliin-substraat ja Cks1-sõltuv seondumine võimaldavad Cln2- ja Clb5-Cdk1 kompleksidel Sic1 konstrukti fosforüleerida osalise protsessiivsusega.

Cks1-vahendatud fosforüleerimist ja tsükliin-substraat seondumist arvestades mõjutavad Cdk1 substraatide fosforüleerimise dünaamikat lisaks optimaalsete ja suboptimaalsete fosforüleerimissaitide arvule ka nende paiknemine nii üksteise kui ka tsükliini seondumismotiivide suhtes.

The positioning of phosphorylation sites affects multiphosphorylation of Cdk1 substrates

Mihkel Örd

Summary

Cyclin-dependent kinases (CDK-s) are the central regulators of the eukaryotic cell cycle. For the cell cycle to function properly, CDK-s must phosphorylate specific proteins with precise timing. To understand the dynamics of CDK-dependent phosphorylation, CDK substrate recognition mechanisms have to be studied. In the present study we investigated two different Cdk1 complex substrate recognition mechanisms, the cyclin-dependent docking and Cks1-mediated docking. It was shown that the strength of phosphorylation stimulation by cyclin-dependent docking depends on the positioning of the phosphorylation site relative to cyclin docking motifs. S-phase complex Clb5-Cdk1 phosphorylates the sites that are N-terminal from the docking site containing the RxL motif. On the other hand, the G1-cyclin Cln2-specific LP motif enhances Cln2-Cdk1-dependent phosphorylation in both N- and C-terminal direction. In order to evaluate the importance of Cks1 in phosphorylation of Cdk1 targets, the multisite phosphorylation patterns of 14 Cdk1 substrates were analyzed. Cks1-dependent multiphosphorylation is potentially a widespread mechanism, because all tested complexes, Cln2-, Clb3- and Clb2-Cdk1 had targets which were multiphosphorylated more efficiently in the presence of Cks1. To investigate the mechanism of Cks1-dependent phosphorylation, a set of constructs with two phosphorylation sites was used. The efficiency of Cks1-mediated phosphorylation was shown to depend strongly on the relative positioning of phosphorylation sites. For efficient Cks1-dependent phosphorylation the secondary site had to be positioned at least 12 amino acids C-terminal of the primary site. However phosphorylation rate of the secondary site decreased rapidly, when the site was positioned C-terminally further from the primary site. The distance of effective Cks1-dependent phosphorylation depends on the affinity of the primary site towards Cks1, on the specificity of secondary site towards Cdk1 active site and on the position of the cyclin docking sites. The Cln2- and Clb5-Cdk1 complexes, but not Clb2-Cdk1, were able to multiphosphorylate a Sic1 construct in a semiprocessive manner, which was found to depend on Cks1 and cyclin-dependent docking. Taking together, in case of both of the two studied substrate recognition mechanisms, the relative positioning of phosphorylation sites affects the kinetics of Cdk1-dependent multisite phosphorylation.

Kasutatud kirjanduse loetelu

- Adams, P.D., W.R. Sellers, S.K. Sharma, A.D. Wu, C.M. Nalin ja W.G. Kaelin, Jr. (1996). Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol.* 16:6623-33.
- Arvai, A.S., Y. Bourne, M.J. Hickey ja J.A. Tainer. (1995). Crystal structure of the human cell cycle protein CksHs1: single domain fold with similarity to kinase N-lobe domain. *J Mol Biol.* 249:835-42.
- Bhaduri, S. ja P.M. Pryciak. (2011). Cyclin-specific docking motifs promote phosphorylation of yeast signaling proteins by G1/S Cdk complexes. *Curr Biol.* 21:1615-23.
- Bourne, Y., M.H. Watson, A.S. Arvai, S.L. Bernstein, S.I. Reed ja J.A. Tainer. (2000). Crystal structure and mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle regulatory protein Cks1: implications for domain swapping, anion binding and protein interactions. *Structure.* 8:841-50.
- Bourne, Y., M.H. Watson, M.J. Hickey, W. Holmes, W. Rocque, S.I. Reed ja J.A. Tainer. (1996). Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell.* 84:863-74.
- Brizuela, L., G. Draetta ja D. Beach. (1987). p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase. *EMBO J.* 6:3507-14.
- Brocca, S., M. Samalikova, V.N. Uversky, M. Lotti, M. Vanoni, L. Alberghina ja R. Grandori. (2009). Order propensity of an intrinsically disordered protein, the cyclin-dependent-kinase inhibitor Sic1. *Proteins.* 76:731-46.
- Brown, N.R., M.E. Noble, J.A. Endicott ja L.N. Johnson. (1999). The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol.* 1:438-43.
- Chen, J., P. Saha, S. Kornbluth, B.D. Dynlacht ja A. Dutta. (1996). Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol Cell Biol.* 16:4673-82.
- Cheng, K.Y., M.E. Noble, V. Skamnaki, N.R. Brown, E.D. Lowe, L. Kontogiannis, K. Shen, P.A. Cole, G. Siligardi ja L.N. Johnson. (2006). The role of the phospho-CDK2/cyclin A recruitment site in substrate recognition. *J Biol Chem.* 281:23167-79.
- Costanzo, M., J.L. Nishikawa, X. Tang, J.S. Millman, O. Schub, K. Breitkreuz, D. Dewar, I. Rupes, B. Andrews ja M. Tyers. (2004). CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell.* 117:899-913.
- Cross, F.R., M. Yuste-Rojas, S. Gray ja M.D. Jacobson. (1999). Specialization and targeting of B-type cyclins. *Mol Cell.* 4:11-9.
- Dai, L., Y. Liu, J. Liu, X. Wen, Z. Xu, Z. Wang, H. Sun, S. Tang, A.R. Maguire, J. Quan, H. Zhang ja T. Ye. (2013). A novel CyclinE/CyclinA-CDK Inhibitor targets p27(Kip1) degradation, cell cycle progression and cell survival: Implications in cancer therapy. *Cancer Lett.*
- de Bruin, R.A., W.H. McDonald, T.I. Kalashnikova, J. Yates, 3rd ja C. Wittenberg. (2004). Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell.* 117:887-98.

- Deibler, R.W. ja M.W. Kirschner. (2010). Quantitative reconstitution of mitotic CDK1 activation in somatic cell extracts. *Mol Cell*. 37:753-67.
- Donaldson, A.D. (2000). The yeast mitotic cyclin Clb2 cannot substitute for S phase cyclins in replication origin firing. *EMBO Rep*. 1:507-12.
- Draetta, G., L. Brizuela, J. Potashkin ja D. Beach. (1987). Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2+* and *suc1+*. *Cell*. 50:319-25.
- Driscoll, B., A. T'Ang, Y.H. Hu, C.L. Yan, Y. Fu, Y. Luo, K.J. Wu, S. Wen, X.H. Shi, L. Barsky, K. Weinberg, A.L. Murphree ja Y.K. Fung. (1999). Discovery of a regulatory motif that controls the exposure of specific upstream cyclin-dependent kinase sites that determine both conformation and growth suppressing activity of pRb. *J Biol Chem*. 274:9463-71.
- Egan, E.A. ja M.J. Solomon. (1998). Cyclin-stimulated binding of Cks proteins to cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*. 18:3659-67.
- Enserink, J.M. ja R.D. Kolodner. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div*. 5:11.
- Feldman, R.M., C.C. Correll, K.B. Kaplan ja R.J. Deshaies. (1997). A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell*. 91:221-30.
- Foe, I.T., S.A. Foster, S.K. Cheung, S.Z. DeLuca, D.O. Morgan ja D.P. Toczyski. (2011). Ubiquitination of Cdc20 by the APC occurs through an intramolecular mechanism. *Curr Biol*. 21:1870-7.
- Ganoth, D., G. Bornstein, T.K. Ko, B. Larsen, M. Tyers, M. Pagano ja A. Hershko. (2001). The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitylation of p27. *Nat Cell Biol*. 3:321-4.
- Gavet, O. ja J. Pines. (2010). Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell*. 18:533-43.
- Guida, P. ja L. Zhu. (1999). DP1 phosphorylation in multimeric complexes: weaker interaction with cyclin A through the E2F1 cyclin A binding domain leads to more efficient phosphorylation than stronger interaction through the p107 cyclin A binding domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 258:596-604.
- 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.
- Hadwiger, J.A., C. Wittenberg, M.D. Mendenhall ja S.I. Reed. (1989). The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* *suc1+* gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex. *Mol Cell Biol*. 9:2034-41.
- Hao, B., S. Oehlmann, M.E. Sowa, J.W. Harper ja N.P. Pavletich. (2007). Structure of a Fbw7-Skp1-cyclin E complex: multisite-phosphorylated substrate recognition by SCF ubiquitin ligases. *Mol Cell*. 26:131-43.
- Hara, K., P. Tydeman ja M. Kirschner. (1980). A cytoplasmic clock with the same period as the division cycle in *Xenopus* eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77:462-6.

- Harvey, S.L., A. Charlet, W. Haas, S.P. Gygi ja D.R. Kellogg. (2005). Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. *Cell*. 122:407-20.
- Hayles, J., D. Beach, B. Durkacz ja P. Nurse. (1986). The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *sucl* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol Gen Genet*. 202:291-3.
- Hindley, J., G. Phear, M. Stein ja D. Beach. (1987). *Sucl+* encodes a predicted 13-kilodalton protein that is essential for cell viability and is directly involved in the division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*. 7:504-11.
- Hodge, A. ja 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*. 262:55-64.
- Holic, R., A. Kukalev, S. Lane, E.J. Andress, I. Lau, C.W. Yu, M.J. Edelman, B.M. Kessler ja V.P. Yu. (2010). Cks1 activates transcription by binding to the ubiquitylated proteasome. *Mol Cell Biol*. 30:3894-901.
- Holmes, J.K. ja M.J. Solomon. (1996). A predictive scale for evaluating cyclin-dependent kinase substrates. A comparison of p34cdc2 and p33cdk2. *J Biol Chem*. 271:25240-6.
- Holt, L.J. (2012). Regulatory modules: Coupling protein stability to phosphoregulation during cell division. *FEBS Lett*. 586:2773-7.
- Holt, L.J., B.B. Tuch, J. Villen, A.D. Johnson, S.P. Gygi ja D.O. Morgan. (2009). Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science*. 325:1682-6.
- Hu, F. ja 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*. 102:8910-5.
- Ikui, A.E., V. Archambault, B.J. Drapkin, V. Campbell ja F.R. Cross. (2007). Cyclin and cyclin-dependent kinase substrate requirements for preventing rereplication reveal the need for concomitant activation and inhibition. *Genetics*. 175:1011-22.
- Jackson, L.P., S.I. Reed ja S.B. Haase. (2006). Distinct mechanisms control the stability of the related S-phase cyclins Clb5 and Clb6. *Mol Cell Biol*. 26:2456-66.
- Jeffrey, P.D., A.A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, J. Hurwitz, J. Massague ja N.P. Pavletich. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*. 376:313-20.
- Kapuy, O., D. Barik, M.R. Sananes, J.J. Tyson ja B. Novak. (2009). Bistability by multiple phosphorylation of regulatory proteins. *Prog Biophys Mol Biol*. 100:47-56.
- Kato, J., H. Matsushime, S.W. Hiebert, M.E. Ewen ja C.J. Sherr. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev*. 7:331-42.
- Kim, J. ja M.D. Rose. (2012). A mechanism for the coordination of proliferation and differentiation by spatial regulation of Fus2p in budding yeast. *Genes Dev*. 26:1110-21.

- Kito, K., N. Kawaguchi, S. Okada ja T. Ito. (2008). Discrimination between stable and dynamic components of protein complexes by means of quantitative proteomics. *Proteomics*. 8:2366-70.
- Koch, C., A. Schleiffer, G. Ammerer ja K. Nasmyth. (1996). Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. *Genes Dev*. 10:129-41.
- Kõivomägi, M., E. Valk, R. Venta, A. Iofik, M. Lepiku, E.R. Balog, S.M. Rubin, D.O. Morgan ja M. Loog. (2011a). Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature*. 480:128-31.
- Kõivomägi, M., E. Valk, R. Venta, A. Iofik, M. Lepiku, D.O. Morgan ja M. Loog. (2011b). Dynamics of Cdk1 substrate specificity during the cell cycle. *Mol Cell*. 42:610-23.
- Lan, Y., Y. Zhang, J. Wang, C. Lin, M.M. Ittmann ja F. Wang. (2008). Aberrant expression of Cks1 and Cks2 contributes to prostate tumorigenesis by promoting proliferation and inhibiting programmed cell death. *Int J Cancer*. 123:543-51.
- Lee, M.G. ja P. Nurse. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*. 327:31-5.
- 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.
- Li, F., T. Long, Y. Lu, Q. Ouyang ja C. Tang. (2004). The yeast cell-cycle network is robustly designed. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:4781-6.
- Loog, M. ja D.O. Morgan. (2005). Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature*. 434:104-8.
- Lowe, E.D., I. Tews, K.Y. Cheng, N.R. Brown, S. Gul, M.E. Noble, S.J. Gamblin ja L.N. Johnson. (2002). Specificity determinants of recruitment peptides bound to phospho-CDK2/cyclin A. *Biochemistry*. 41:15625-34.
- Mendenhall, M.D. ja 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*. 62:1191-243.
- Mendoza, N., S. Fong, J. Marsters, H. Koeppen, R. Schwall ja D. Wickramasinghe. (2003). Selective cyclin-dependent kinase 2/cyclin A antagonists that differ from ATP site inhibitors block tumor growth. *Cancer Res*. 63:1020-4.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13:261-91.
- Morris, M.C., P. Kaiser, S. Rudyak, C. Baskerville, M.H. Watson ja S.I. Reed. (2003). Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature*. 423:1009-13.
- Nash, P., X. Tang, S. Orlicky, Q. Chen, F.B. Gertler, M.D. Mendenhall, F. Sicheri, T. Pawson ja M. Tyers. (2001). Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature*. 414:514-21.

- Oehlen, L.J. ja F.R. Cross. (1998). Potential regulation of Ste20 function by the Cln1-Cdc28 and Cln2-Cdc28 cyclin-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 273:25089-97.
- Oikonomou, C. ja F.R. Cross. (2011). Rising cyclin-CDK levels order cell cycle events. *PLoS One.* 6:e20788.
- Patra, D. ja W.G. Dunphy. (1998). Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes Dev.* 12:2549-59.
- Patra, D., S.X. Wang, A. Kumagai ja W.G. Dunphy. (1999). The *xenopus* Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators. *J Biol Chem.* 274:36839-42.
- Rappsilber, J., M. Mann ja Y. Ishihama. (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc.* 2:1896-906.
- Reynard, G.J., W. Reynolds, R. Verma ja R.J. Deshaies. (2000). Cks1 is required for G(1) cyclin-cyclin-dependent kinase activity in budding yeast. *Mol Cell Biol.* 20:5858-64.
- Richardson, H., D.J. Lew, M. Henze, K. Sugimoto ja S.I. Reed. (1992). Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes Dev.* 6:2021-34.
- Richardson, H.E., C.S. Stueland, J. Thomas, P. Russell ja S.I. Reed. (1990). Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* 4:1332-44.
- Rudner, A.D. ja A.W. Murray. (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol.* 149:1377-90.
- Salazar, C., A. Brummer, L. Alberghina ja T. Hofer. (2010). Timing control in regulatory networks by multisite protein modifications. *Trends Cell Biol.* 20:634-41.
- Salazar, C. ja T. Hofer. (2009). Multisite protein phosphorylation--from molecular mechanisms to kinetic models. *FEBS J.* 276:3177-98.
- Schneider, B.L., Q.H. Yang ja A.B. Futcher. (1996). Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science.* 272:560-2.
- Schulman, B.A., D.L. Lindstrom ja E. Harlow. (1998). Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10453-8.
- Skowyra, D., D.M. Koepp, T. Kamura, M.N. Conrad, R.C. Conaway, J.W. Conaway, S.J. Elledge ja J.W. Harper. (1999). Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1. *Science.* 284:662-5.
- Songyang, Z., S. Blechner, N. Hoagland, M.F. Hoekstra, H. Piwnica-Worms ja L.C. Cantley. (1994). Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr Biol.* 4:973-82.
- Spellman, P.T., G. Sherlock, M.Q. Zhang, V.R. Iyer, K. Anders, M.B. Eisen, P.O. Brown, D. Botstein ja B. Futcher. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell.* 9:3273-97.

- Spruck, C., H. Strohmaier, M. Watson, A.P. Smith, A. Ryan, T.W. Krek ja S.I. Reed. (2001). A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell*. 7:639-50.
- Stern, B. ja P. Nurse. (1996). A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet*. 12:345-50.
- Zachariae, W., M. Schwab, K. Nasmyth ja W. Seufert. (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science*. 282:1721-4.
- Takeda, D.Y., J.A. Wohlschlegel ja A. Dutta. (2001). A bipartite substrate recognition motif for cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*. 276:1993-7.
- Tang, Y. ja S.I. Reed. (1993). The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G1 and G2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 7:822-32.
- Thomson, M. ja J. Gunawardena. (2009). Unlimited multistability in multisite phosphorylation systems. *Nature*. 460:274-7.
- Tyers, M., G. Tokiwa, R. Nash ja B. Futcher. (1992). The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J*. 11:1773-84.
- Ubersax, J.A., E.L. Woodbury, P.N. Quang, M. Paraz, J.D. Blethrow, K. Shah, K.M. Shokat ja D.O. Morgan. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*. 425:859-64.
- Verma, R., R.S. Annan, M.J. Huddleston, S.A. Carr, G. Reynard ja R.J. Deshaies. (1997). Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science*. 278:455-60.
- Westbrook, L., H.N. Ramanathan, T. Isayeva, A.R. Mittal, Z. Qu, M.D. Johnson, F.G. Kern, S. Ponnazhagan, C.J. Grubbs ja J.V. Thottassery. (2009). High Cks1 expression in transgenic and carcinogen-initiated mammary tumors is not always accompanied by reduction in p27Kip1. *Int J Oncol*. 34:1425-31.
- Woodbury, E.L. ja D.O. Morgan. (2007). Cdk and APC activities limit the spindle-stabilizing function of Fin1 to anaphase. *Nat Cell Biol*. 9:106-12.
- Wu, C., T. Leeuw, E. Leberer, D.Y. Thomas ja M. Whiteway. (1998). Cell cycle- and Cln2p-Cdc28p-dependent phosphorylation of the yeast Ste20p protein kinase. *J Biol Chem*. 273:28107-15.
- Yu, V.P., C. Baskerville, B. Grunenfelder ja S.I. Reed. (2005). A kinase-independent function of Cks1 and Cdk1 in regulation of transcription. *Mol Cell*. 17:145-51.
- Yu, V.P. ja S.I. Reed. (2004). Cks1 is dispensable for survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle*. 3:1402-4.

Kasutatud veebiaadressid

<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/PATMATCH/nph-patmatch>

www.matrixscience.com

<http://www.yeastgenome.org/>

Lisad

Lisa 1. Substraadid, mille multifosforüleerimist võiks ennustuse järgi mõjutada

Cks1

S. cerevisiae valgud, mis sisaldavad motiivi TPX[KR]X{8,28}[ST]P või motiivi [FILPVWY]XTPX[KR]X{8,48}[ST]P, kus X tähistab suvalist aminohapet, [] ühte sulgudes loetletud aminohapetest, {n,m}n kuni m vastavat aminohapet, ning mis on kirjeldatud kui Cdk1 substraadid Ubersax jt poolt (Ubersax jt, 2003).

Valgu nimi					
ACE2	DNA2	KIP3	PLM2	SPO11	YOR066W
ACF4	ELM1	LRE1	RAD9	SRC1	YOR315W
ASE1	EXO84	LTE1	RGA1	SRL3	YOX1
ASH1	FAR1	LUV1	RLF2	STB1	
BEM1	FIR1	MCM3	RTS1	SWE1	
BUD4	FMT1	MOB1	SAC7	WHI5	
CAF120	FUS1	NDD1	SFI1	YBR138C	
CDC5	HCM1	NET1	SIC1	YGL235W	
CDH1	KAR3	ORC2	SIR4	YHR149C	
CNN1	KEL1	ORC6	SLD2	YHR159W	
DAL81	KEL2	PHD1	SLK19	YJL084C	

Lisa 2. Koostatud käsikiri, mis sisaldab käesolevas töös saadud tulemusi

Multisite phosphorylation networks as signal processors for Cdk1

Mardo Kõivomägi¹, Anna Iofik¹, Mihkel Örd¹, Ervin Valk¹, Rainis Venta¹, Ilona Faustova¹,
Rait Kivi¹, Eva Rose M. Balog², Seth M. Rubin³, and Mart Loog¹

¹Institute of Technology, University of Tartu, Estonia

²Department of Molecular, Cell, and Developmental Biology,

University of California, Santa Cruz

³Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Santa Cruz

Abstract

The quantitative model for cyclin-dependent kinase (CDK) control of the cell cycle states that different CDK activity thresholds control the order and timing of cell cycle events. However, it is not understood how a single protein kinase can trigger hundreds of switches in a sufficiently time-resolved fashion. We show that the output signal of cyclin-Cdk1-Cks1-dependent phosphorylation of multisite targets is controlled by key set of parameters including distances between phosphorylation sites, the distribution of serines and threonines as phospho-acceptors, the positioning of cyclin-docking motifs, processivity factors, and the number of sites in the network. We propose that variation of these parameters within the networks of multiple phosphorylation sites in different targets provides a wide range of possibilities for the differential amplification of a Cdk1 input signal, providing a mechanism to generate a wide range of well-defined thresholds in the cell cycle.

Introduction

Cyclin-dependent kinases (CDKs) are the master regulators of the eukaryotic cell division cycle. Together with a set of periodically expressed cyclin subunits they form a central control unit responsible for the cell cycle clock¹. CDKs catalyze an ordered phosphorylation of hundreds of targets that trigger a sequence of coordinated molecular events that drive the cell through the stages of cell division²⁻⁵. Several individual CDK-driven switches have been identified⁶, but our understanding of CDK function as a general coordinator of the entire process of cell division is not clear.

The existing model states that as levels of CDK activity rise during the cell cycle, specific molecular events are executed at each of a series of activity thresholds⁷⁻¹¹. This model requires that substrates are phosphorylated with a wide range of efficiencies, such that very good substrates are phosphorylated early, at a low CDK activity threshold, while poor substrates are phosphorylated only when much higher CDK activity is achieved, later in the cell cycle. CDK targets contain both optimal consensus phosphorylation motifs (S/T-P-x-K/R)^{12, 13} and suboptimal consensus sites (S/T-P) that are phosphorylated much less efficiently^{12, 14}. Therefore, a mechanism in which optimal motifs are used for the ‘early’ switches and suboptimal motifs for the ‘later’ switches is conceivable, but it would require a very wide range of CDK activity, providing both a low and high threshold. However, total cyclin accumulation is not more than 2-3 times higher in mitosis compared with S phase in budding yeast¹⁵. Furthermore, cells can be arrested before mitosis with a CDK inhibitor concentration that is only a fraction of the estimated peak cyclin levels in mitosis^{8, 16}. In budding yeast, the estimated peak nuclear concentration of mitotic cyclins is about 2-3 μM ^{15, 17}, while the inhibitor concentration required for G2/M arrest is 500 nM¹⁶. Similarly, in fission yeast, the CDK inhibitor concentration required for arrest in G2 was 300 nM⁸. Thus, only a relatively small increase in CDK levels must be able to trigger discrete temporally resolved events. In addition, if the system relied entirely on the distinction between optimal and suboptimal consensus motifs, there could be, in principle, only two robustly resolved thresholds. However, several studies have shown that even within the narrow window of time at the onset of mitosis there is a finely resolved order of discrete events that are triggered in response to different levels of accumulating mitotic cyclins¹⁸⁻²⁰. How do relatively small changes in total CDK levels provide temporally resolved triggering of these events?

Cyclin specificity in substrate recognition has provided some insight into the mechanism by which CDKs coordinate cell cycle events²¹⁻²⁵. In budding yeast, the intrinsic activities of different cyclin-Cdk1 complexes increase during the cycle, and the low activity of early complexes is compensated by cyclin-dependent docking sites^{14, 26}. This setup helps to enhance the abrupt phosphorylation of selected early targets in late G1 and early S phases without interference from later targets (due to their higher K_M values with the early cyclin-Cdk1 complexes). Although this specificity allows early cyclins to efficiently target early targets, they cannot drive the later stages of the cell cycle in budding yeast²⁷. This difference in cyclin specificities provides a coarse mechanism to separate early and late events but it still fails to explain how relatively small changes in CDK activity can trigger the ordered sequence of discrete events observed on a finer time scale.

The complexity of CDK function is further increased by the multisite nature of most of its targets. The input CDK signal is often processed through several phosphorylation steps to yield a multi-phosphorylated output state of the target²⁸⁻³². Recently, we demonstrated that a network of phosphorylation sites in a budding yeast Cdk1 target, Sic1, is phosphorylated in semi-processive cascades. This processivity is determined by a phospho-adaptor subunit of the cyclin-Cdk1 complex, Cks1, together with cyclin-substrate docking sites²⁵. The output of the cascade is the phosphorylation of two diphosphodegrons that direct Sic1 to degradation

via the SCF-proteasome pathway^{33, 34}. The degron phosphorylation sites are not specific enough to be efficiently phosphorylated by Cdk1 directly, because they contain suboptimal sets of recognition elements. Instead, the suboptimal degron sites become phosphorylated due to docking-dependent amplification of Cdk1 specificity via sequential steps of priming phosphorylations. Once the Sic1 molecule has accumulated several phosphates, the CDK complex binds to these phosphates via Cks1, and is held at high local concentration with respect to the suboptimal sites, allowing suboptimal sites to be efficiently phosphorylated.

These semi-processive cascades, whose net phosphorylation output does not depend solely on the consensus motifs of the critical sites, but also on other parameters, lead us to a hypothesis that may provide a solution to the mechanistic problems of the threshold model described above. According to our hypothesis, the positions and the distances of phosphorylation sites and cyclin-dependent docking sites within these clusters encode signal processors that govern the net phosphorylation rate through the cascades and allow a large dynamic range in the possible input-output relationship – thereby generating thresholds for phosphorylation of functional sites at any CDK activity level. Variation of these parameters provides a wide range of possibilities for the differential amplification of outputs in response to moderate changes of CDK input strengths.

The central element defining the output signal strength of these multisite processor systems is the phospho-adaptor Cks1. Cks1 was first discovered in *S. pombe* as a high-copy suppressor of a defective Cdk1 mutant³⁵. In budding yeast, Cks1 is essential for both G1/S and G2/M transitions^{36, 37} and associates with cyclin-Cdk1 complexes at close to stoichiometric ratios *in vivo*³⁸. An *in vitro* study with the *Xenopus* version of Cks1 demonstrated its possible role in promoting the multisite phosphorylation of the CDK regulators Wee1, Myt1, and Cdc25, as well as the APC^{39, 40}, while in budding yeast the G1-specific complex Cln1,2-Cdk1 requires the Cks1 subunit for activity⁴¹. However, the function of Cks1 as a phospho-adaptor protein in the mechanism of CDK-driven switches has been largely overlooked. Also, recent large-scale proteomic screens have identified hundreds of CDK targets^{2, 4}, but these studies have not touched on the level of complexity that the multisite nature of these targets may present for the mechanism of CDK signal processing.

In the present study we analyzed the biochemical parameters that control Cdk1 signal flux through multisite phosphorylation networks. We explored how different combinations of these parameters influence the net output of the signal, and we analyzed the mechanism of Cks1-dependent multiphosphorylation cascades and how processivity can be used for differential amplification of output signals. Based on these data, we propose a new mechanism that provides a solution to the question of how accumulating CDK activity triggers the correct timing and sequence of cell cycle events.

Results

Phosphorylation of multisite targets by Cdk1 shows different levels of Cks1-dependent processivity. Because nearly all known Cdk1 targets contain multiple phosphorylation sites, it was of interest to obtain an overview of the relative importance of Cks1 in promoting processive phosphorylation cascades in different targets. We analyzed the multisite phosphorylation dynamics of a set of Cdk1 targets in Cdk1 phosphorylation assays involving either the wild type Cks1 or a version of Cks1 with a mutated phosphate-binding pocket (*Cks1mut*)^{25, 42}. The autoradiographs of the phosphorylation patterns, presented in Figure 1a, reveal that there are wide variations in Cks1 dependence among the targets. In some cases, the abrupt appearance of multi-phosphorylated patterns is highly dependent on Cks1. In other cases, phosphorylation is not affected by Cks1. Also, there are targets that display

intermediate effects, suggesting that only a subset of sites is enhanced by Cks1. We also found that different cyclin-Cdk1 complexes exhibit different rates of Cks1-dependent hyperphosphorylation: for example, compare phosphorylation of the G1 transcriptional regulator Whi5 by G1-specific Cln2-Cdk1 and M-phase specific Clb2-Cdk1 complexes. However, Cks1 dependence seems to be a general mechanism throughout the cell cycle. Note that in control experiments, Cks1 had little effect on the phosphorylation of a substrate containing a single Cdk1 site (T5-Sic1 Δ C; Fig. 1b).

The differences among the targets indicate that the multisite networks may have functionally different patterns. What are the parameters that determine Cdk1 processivity through the networks? We aimed to study these parameters using the Cdk1 target Sic1 as a model system. The specificity of cyclin-Cdk1 complexes is controlled at three different levels: first, by the active site specificity of Cdk1, second, by cyclin-specific docking interactions, and third, by the specificity of Cks1 (Fig. 1c). Using a non-inhibitory form of Sic1 (Sic1 Δ C) we designed several sets of combinatorial mutants to study how these three factors control the Cdk1-dependent phosphorylation of multisite networks.

The phospho-binding pocket of Cks1 binds phospho-threonines but not phospho-serines.

One source of variation among the targets of Cdk1 presented in Figure 1 is the ratio of threonines to serines as phospho-acceptor residues. Interestingly, we noticed that three of the targets that do not display Cks1 dependence (Bop3, Sld2, and Ypr174) had only serine residues within optimal consensus motifs (S-P-x-K/R). Therefore, we questioned if Cks1 is able to dock via both pSer and pThr residues, or whether it prefers one over the other. Of the nine CDK consensus motifs in Sic1, five are Thr and four are Ser residues (Fig. 2a). The N-terminal residues T2, T5, and T33 were shown previously to serve as phospho-docking sites for Cks1, thereby promoting fast phosphorylation of the C-terminal phospho-degrons²⁵. To test if Ser residues are equally able to mediate Cks1-dependent phosphorylation, we replaced the threonine residues in the CDK consensus sites of Sic1 with serine residues. Strikingly, the abrupt accumulation of multiply phosphorylated species was severely suppressed (Fig. 2b). The effect was as strong as that of the *Cks1mut* presented in Figure 1a, indicating that the entire phospho-binding capacity of Cks1 was lost. The effect was entirely due to Cks1 specificity because the Cks1-independent phosphorylation sites in the all-serine mutant was not affected (Supplementary Fig. 1a,b).

To directly confirm the inability of a serine to prime a single Cks1-dependent phosphorylation step we constructed a version of Sic1 Δ C containing only two sites: the optimal Cdk1 target T33 (or S33) served as a priming site and a suboptimal site T48, with very weak direct specificity towards Cdk1²⁵, served as a secondary site. Indeed, the threonine was required for the accumulation of the doubly phosphorylated species (Fig. 2c).

Cells overexpressing the all-Ser form of Sic1 are inviable, unlike cells overexpressing wild-type Sic1 (Fig. 2d). This result indicates that Cdk1 is not able to phosphorylate Sic1-Ser to a sufficient level to cause its proper degradation. It is most likely that inviability is caused by weak binding of pSer sites to Cks1 because no pSer versus pThr specificity has been observed for SCF-Cdc4 phospho-degrons³⁴. Additionally, a single serine substitution in the crucial priming site at position 33 caused a partial loss of viability (Fig. 2d). Thus, it is possible to disrupt the docking connections of the Cks1-dependent cascade by replacing threonine residues in CDK sites with serine residues. The resulting construct follows a distributive phosphorylation mode (Fig. 2b) in which phosphorylation of one site is not dependent on previous phosphorylation of the other. In fact, such a distributive mode was the basis of an earlier model of Sic1 phosphorylation⁴³, and these results provide an additional argument supporting the processive Cks1-dependent cascade model²⁵.

To measure the direct binding affinity between the phosphorylated sites of Sic1 and Cks1 we used an isothermal calorimetry (ITC) assay with purified proteins. We produced stoichiometrically phosphorylated versions of Sic1 Δ C containing single phosphorylation sites. The data obtained further confirmed the exclusive preference of pThr over pSer in Cks1 binding (Fig. 2e, Supplementary Table 1).

Finally, we demonstrated the requirement for threonine as the crucial priming residue by directly following the appearance of multi-phosphorylated forms of Sic1 *in vivo*. The replacement of the threonine at the crucial N-terminal priming site T5 resulted in a severe reduction in the multi-phosphorylated forms of an artificial Sic1 substrate construct containing five evenly-paced serine consensus motifs downstream of the priming site (Fig. 2f).

We also performed a set of positional variations by introducing basic and hydrophobic residues around the T33 site. We found that a proline residue at position -2 relative to pThr enhanced the interaction of the phospho-epitope with Cks1 (Table 1, Supplementary Fig. 1c,d; see also cosubmitted paper⁴⁴).

Cks1-dependent phosphorylation depends on a well-defined distance between the priming site and a C-terminal secondary site.

The second parameter that is likely to control signal flux through multisite cascades is the distance and relative positioning between the priming phosphorylation site and the secondary phosphorylation site. To analyze the impact of this parameter on the rate of Cks1-dependent phosphorylation steps, we created a series of Sic1 Δ C-based substrate constructs containing two phosphorylation sites at different distances from each other. Due to its intrinsically disordered nature,^{45, 46} the Sic1 polypeptide is an excellent system to study such distance requirements. By varying the distance between the two phosphorylation sites in the Sic1 constructs we aimed to measure the optimal distances between the sites in terms of the number of amino acids in the polypeptide chain.

We constructed a series of Sic1 proteins carrying the site T33, which contains the optimal CDK consensus motif (**TPQK**), as the primary phosphorylation site. The secondary site was a short sequence bearing a suboptimal CDK motif (**TPQA**), which was placed at various distances from T33 (see Supplementary Methods for details). The priming site T33 was efficiently phosphorylated by cyclin-Cdk1 complexes, while the suboptimal motif used in the secondary site was not phosphorylated in the kinase assay conditions used (data not shown). Therefore, when doubly-phosphorylated species were detected, the sequence of the two-step cascade was always primary phosphorylation of T33 first, followed by the phosphorylation of the secondary site (Fig. 3a).

A striking distance dependence in the rates of Cks1-dependent secondary steps was observed (Fig. 3b). Furthermore, a surprisingly sharp change in rates was observed in the step from 10 to 12 amino acids from the T33 priming site: a distance of 10 amino acids yielded no secondary phosphorylation, while a distance of 12 amino acids showed very rapid accumulation of the doubly phosphorylated form. This drastic distance cut-off was similar for all three cyclin-Cdk1 complexes tested (Fig. 3c-e), indicating that the Cks1-Cdk1 module has a similar architecture and functional capability that does not depend on cyclin specificity. In all three enzyme complexes tested, a sharp peak value of 12-16 amino acids in the secondary rates was followed by rapid decline around the distance of 20-30 amino acids downstream from the priming site.

A surprising feature of the Cks1-dependent secondary step was that the docking-dependent cascade operates exclusively in the N-to-C direction (Fig. 3c-e). We did not observe any docking-enhanced secondary phosphorylation even when the priming site T33 was moved further downstream, yielding distances of -40, -60 and -80 amino acids (Fig. 3c-e).

Interestingly, the relatively sharp distance optimum was broadened when the Cks1 specificity was improved by introducing a proline residue at position -2 from the T33 priming site. This suggests that the negative effect of above-optimal distances can be compensated by stabilizing the enzyme substrate complex via improved binding of the phosphorylated site to Cks1. The improved Cks1 specificity, however, did not improve activity with a distance shorter than the 10 amino acid minimal cut-off. Additionally, it is possible to increase the effective distance window for secondary phosphorylation by introducing the optimal CDK consensus site in the secondary site (Supplementary Fig. 2b-d). Also, we confirmed that the distance relationship was not specific for the particular sequence context downstream from the site T33. For this we created a control set of similar constructs with the priming site T5 bearing an optimal motif PSTPPR (Supplementary Fig. 2a).

To test if the distances between sites are also important for multisite phosphorylation *in vivo*, we varied the positions of phosphorylation sites in a non-destructible version of Sic1 Δ C and analyzed phosphorylation by western blotting, as in the experiment presented in Figure 2f. We made one artificial substrate with 5 phosphorylation sites in their original positions, but lacking the intermediate sites T33 and T45 to remove the possibility for Cks1-dependent docking. This substrate was compared to a construct that was identical, except that three serine Cdk1 sites were repositioned to be 16 amino acids apart, as indicated in the scheme in Figure 3f (d16-Sic1 Δ C). These constructs contain a single optimal priming site T5, while the other sites were serine-based suboptimal sites. The first construct, which has sites either amino-terminal of T5 or greater than 64 amino acids downstream, showed almost no change in phosphorylation profiles after entry into S phase. In contrast, the construct with the sites repositioned at accessible distances from the T5 priming site displayed mobility shifts of singly- and doubly-phosphorylated species. The phosphorylation pattern of the construct with repositioned sites fits well within the distance relationship observed in the case of the optimal priming site containing a proline in position -2 (Fig. 3c-e, Supplementary Fig. 2a). The sites at distances of +16 and +32 are within the range of relatively fast rates while the longer distances apparently fail to gain any enhancement from Cks1-dependent docking.

These experiments reveal a strikingly sharp minimal distance cut-off and strict N-to-C-directionality both *in vitro* and *in vivo*. From this we can conclude that the underlying mechanism involves simultaneous binding of the phosphorylated priming site to the Cks1 pocket and the secondary site to the active site pocket of Cdk1 (Fig. 3g).

Distances between phosphorylation sites are critical for Cdk1 biological function. To further confirm that the distances between sites encode biological information in multisite phosphorylation networks, we performed a series of viability assays as described in Figure 2d. To increase the sensitivity of the critical distance variations we used a version of Sic1 with a minimally viable set of 5 phosphorylation sites (Fig. 4). Surprisingly, moving the priming site T33 in these constructs by only 2 amino acids upstream or downstream caused inviability. Apparently, in these constructs a docking distance that perfectly fits the optimum of 12-16 amino acids (Fig. 3c-e) is required for efficient phosphorylation of both sites of the diphosphodegron (T45 and T48). One of the acceptor sites of the diphosphodegron is a ‘non-CDK’ consensus site (T48) whose phosphorylation could be even more sensitive to the docking distance compared with the consensus sites. We also moved the position of the

diphosphodegron T45/T48 by 10 amino acids in a version of Sic1 containing all physiological sites. Similarly, this moderate shift of the position caused a severe reduction of viability. These data indicate that site positioning in multisite networks in Cdk1 targets is not random, but involves critical distances between primer and acceptor sites that must fit the distance between Cks1 phosphate binding pockets and the active site of Cdk1.

Docking to B-type cyclin positions phosphorylation at a specific C-to-N distance. Next we studied the effect of altering the distance of phosphorylation sites from cyclin-specific docking sites. In the model substrate Sic1 there are two Clb5-specific docking sites (RXL)^{21-23, 47-52}, and a single Cln2-specific docking motif (LLPP)^{14, 53}. We analyzed constructs containing only one of the RXL motifs and the LLPP motif (Fig. 5a). The position of an optimal CDK consensus motif based on site T5 was varied over a wide range in both C- and N-terminal directions. We tested phosphorylation of these constructs with wild-type Clb5-Cdk1 or Clb2-Cdk1, as well as with kinase complexes in which the cyclin carried a mutation in the hydrophobic patch docking site (hpm)^{21, 22}. In Figure 5b and c the distance profiles are plotted as ratios of the phosphorylation rates obtained with wild-type and hpm kinase complexes. For Clb5, a striking increase of docking-enhanced phosphorylation rate was observed when the phosphoacceptor site was 16-20 amino acids N-terminal from the RXL motif. No strong potentiation was observed when the phospho-acceptor site was C-terminal to the RXL (Fig. 5b, e). For Clb2, only a small increase in activity was observed at the same distance. These data are consistent with our previous results that Clb2 has much weaker hydrophobic patch specificity towards its substrates compared with Clb5²³.

Cln2-dependent docking can potentiate phosphorylation of sites both N- and C-terminal from the docking site. In Figure 5d the specificity profile is plotted for the Cln2-Cdk1-Cks1 complex in the absence and in the presence of a competitor peptide containing the Cln2-specific LLPP docking site. A gradual increase in docking-dependent enhancement of the phosphorylation of N-terminally located sites was observed, as well as, quite surprisingly, a large potentiation towards a distant C-terminal site. These data suggest that the LLPP binding site, whose location in Cln2 is not known, is less directionally constrained than the Cks1 phospho-docking or hydrophobic patch/RXL docking interactions (Fig. 3e, Fig. 5d,e).

Suboptimal sites are not phosphorylated in the absence of priming phosphorylation and Cks1-dependent docking. We also tested the ability of cyclin docking mechanisms to promote phosphorylation of a suboptimal Cdk site. When the optimal CDK consensus motif was replaced with a suboptimal motif, the potentiation of phosphorylation due to cyclin docking was lost, as illustrated for a construct with 44 amino acid distance from the RXL motif, chosen from the set of constructs used in experiments presented in Figure 5b-d (Fig. 5f). Since suboptimal sites were efficiently phosphorylated in the experiments addressing Cks1-dependent docking (in which the cyclin docking motifs were not mutated, Fig. 3), we also analyzed cyclin docking effects for three different optimal Cks1-distance mutants from the set of constructs analysed in Figure 3b-e. In the case of Clb5-Cdk1, the hydrophobic patch stimulated Cks1-dependent phosphorylation (Fig. 5g). A slightly lesser effect was observed with Cln2-Cdk1 and the competitor peptide. However, in the case of Clb2-Cdk1, cyclin docking had almost no effect. These data suggest that both Cks1-dependent docking via a priming phosphorylation site and cyclin-dependent docking are required for phosphorylation of suboptimal CDK sites by earlier cyclin-Cdk1 complexes (Fig. 5h, see also Supplementary

Fig. 2b and 3). The mitotic complex Clb2-Cdk1 can phosphorylate suboptimal sites with the help of Cks1 alone, presumably due to its higher intrinsic activity.

The net output rate of the multi-phosphorylation cascade depends on its degree of processivity. Our observations suggest that abrupt multisite phosphorylation of many Cdk1 substrates depends on multiple interactions between the substrate and kinase. It is likely that these interactions enable the processive or semi-processive attachment of multiple phosphates during a single substrate-binding event (Fig. 6a).

In the case of Cks1-dependent multisite cascades, there are two mechanisms by which the processive step could take place. The first mechanism allows that the phosphorylated priming site withdraws from the active site of Cdk1 and subsequently reassociates with the phosphate-binding pocket of Cks1 without dissociation from the enzyme (Fig. 6b). Support from cyclin docking sites would be required to maintain the complex during such a displacement. To explore the existence of such a mechanism we used two Sic1 Δ C-based constructs, containing pairs of physiological phosphorylation sites (T5/T33 or T33/T45) (Fig. 6c, d). We performed kinase assays in which we measured the accumulation of singly and doubly phosphorylated forms, which were resolved in Phos-Tag gels. The enzyme was used at two-fold different concentrations at subnanomolar range. We did not see any significant change in the ratios of doubly and singly phosphorylated species, arguing that the reactions were independent of enzyme concentration and thus processive (see Fig. 6a). Interestingly, we observed a considerable degree of processivity for both substrate constructs when either Clb5- or Cln2-Cdk1 was used. The processivity factors suggest that after the phosphorylation of the first site there is about a 30-40 % chance to add the secondary phosphate without dissociation. Intriguingly, in the case of the hpm version of Clb5 the secondary phosphate was almost undetectable. Thus, support from the cyclin docking site is necessary for processivity, as depicted in Figure 6b. Furthermore, while Cln2-Cdk1 showed only a slightly lower level of processivity compared with Clb5-Cdk1, the mitotic Clb2-Cdk1 complex showed almost no processivity. This finding correlates with the fact that the hydrophobic patch of Clb2 is unable to strongly potentiate phosphorylation (Fig. 5b). Thus, the earlier cyclin complexes show higher processivity because they can use cyclin docking sites.

The second possible mechanism for Cks1-dependent processivity is the sequential addition of phosphates without dissociation of the primed phosphate from Cks1 pocket (Fig. 6e). To analyze this mechanism we used a substrate construct containing T33 as a priming site and a triple-serine cluster S69/S76/S80 as secondary sites. These experiments showed that this type of processivity exists as well. The processivity factors at subsequent steps showed a 20-30% probability to continue with the next phosphorylation step without dissociation (Fig. 6f).

Thus, the degree of processivity may be an additional factor that can differentiate the output signals of networks in different Cdk1 substrates. We tested this possibility on two additional physiological targets: Whi5 and Fin1. Our results (Supplementary Fig. 4) suggest that various multisite phosphorylation networks can provide different degrees of processivity for each cyclin-Cdk complex, illustrating the potential for broad dynamic range in the processing of Cdk1 signals by different substrates.

Discussion

In this study we analyzed parameters that control the phosphorylation of multisite targets of Cdk1. We propose that the overall spatial pattern of the multisite cluster, the distances

between the sites, the direction of docking connections, the composition of the network with respect to serine versus threonine residues, Cks1-phosphoepitope specificity, and the processivity at each step determine the ability of Cdk1 to produce the multiphosphorylated output form of its targets. This model changes the prevailing understanding that the strength of a response to a Cdk1 signal is defined simply by the specificity of phosphorylation consensus motifs (and cyclin-specific docking consensus motifs).

The network parameters together form a pattern or a code that is read by the cyclin-Cdk1-Cks1 complex. The fixed architecture of the cyclin-Cdk1-Cks1 complex defines the rate and processivity of each step. The model in Figure 7a, constructed from crystal structures of domains in complex with substrate peptides, shows the positioning of the three key substrate pockets in the complex. In addition, the directionality requirements observed for the Cks and hydrophobic path-docking enhancement are consistent with the directionality of the peptides in the crystal structures. As shown, one can model a continuous polypeptide chain that has an N-terminal Cks-docking phosphate, a middle phosphor-acceptor site, and a C-terminal RxLxF cyclin-docking sequence. Assuming a substrate in an extended conformation, the minimum sequence lengths between these elements roughly correspond to the minimum distance requirements found in our kinetics experiments.

One way these phosphorylation cascades can progress is along an intrinsically disordered peptide stretch. The cascade starts at specific N-terminal priming site(s) and proceeds, in a Cks1-dependent manner and with help from cyclin docking sites, towards C-terminal output sites (e.g. diphosphodegrons) (Fig. 7b, top). Interestingly, we have observed that in several cases (Sic1, Far1, and Cdc6; data not shown), one of the sites in the diphosphodegrons is a suboptimal CDK site. This setup prevents short-circuiting of the cascade and ensures that the signal flux is directed through the network. This enables the overall signal flux and the timing of the switches to be controlled because different networks present different resistance to the signal current (using an electronic circuit analogy). On the other hand, when the distances are too short or too long, or alternatively, if there are only serines in the phosphorylation sites, then the network has no connections (Fig. 7b, bottom). In this case, the multisite output state is achieved via independent phosphorylation events. We note that such networks of sites could also exist in globular protein, with analogous connections drawn between the disordered loops containing the phosphorylation sites. In multidimensional space, it is conceivable that closed circles, in which docking sites become docking-dependent sites, and sites with branching connections could exist.

In a simplified cell cycle model with rising CDK activity, the window on the specificity scale that could provide thresholds for temporal resolution of switches falls between the specificity for optimal and suboptimal sites. Within this window the specificity can be varied by changing the distances, Cks1 specificity or other network parameters. While the bulk phosphorylation of optimal sites in the networks, and substrates having only optimal sites, takes place roughly at the same time early in the cell cycle, the substrates with connected networks containing the steps with limiting rates (e.g. steps between sites connected by longer than optimal distance, but still having a docking-potentiated effect) must have a delayed accumulation rate of the multi-phosphorylated output forms. The limiting steps in these targets link the timing of the cell cycle switch to a certain Cdk1 activity threshold. As demonstrated by us recently, the rate-limiting Cks1-dependent phosphorylation steps in Sic1 determine the timing and the cyclin-Cdk1 activity threshold of the G1/S switch

25

Finally, there is also a possibility that dephosphorylation specificity contributes to the timing of CDK-dependent phosphorylation, with earlier targets being more resistant to phosphatases. Gradually changing phosphatase specificity has been shown to play role in

ordered dephosphorylation of Cdk1 targets in mitotic exit by Cdc14⁵⁴. However, it is not clear if the same is true for phosphatases counteracting the rising Cdk1 activity before mitotic exit. Instead, a phosphatase was shown to have highly specific interaction with a mammalian early CDK target, the pRb protein⁵⁵. Indeed, different phosphatase specificity at each step would further increase the possible complexity of the networks.

Similar principles of stepwise modulation of the output signal of Cdk1 targets can be extended to other kinases that use phosphorylated Cdk sites as priming sites (e.g. GSK, Cdc7 and Cdc5), as demonstrated recently^{56, 57}. Future studies of the mechanisms of Cdk1-dependent multisite processor systems will hopefully uncover the intricate complexity of Cdk1 switches and will finally provide a full understanding of the general mechanism of the Cdk-controlled cell cycle clock.

Acknowledgements

We would like to thank Liam Holt and David Morgan for valuable comments on the manuscript. We thank Doug Kellogg for kindly providing the strains and Jevgeni Mihhejev for excellent technical assistance. This work was supported by International Senior Research Fellowship No. 079014/Z/06/Z from the Wellcome Trust, an installation grant from EMBO and HHMI, No. 1253, a targeted financing scheme from the Estonian government, EMP grant No. 08071N from the Norwegian government.

References

1. Morgan, D. O. in *The Cell Cycle: Principles of Control* (New Science Press Ltd, 2007).
2. Ubersax, J. A. *et al.* Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **425**, 859-864 (2003).
3. Holt, L. J. *et al.* Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science* **325**, 1682-1686 (2009).
4. Errico, A., Deshmukh, K., Tanaka, Y., Pozniakovsky, A. & Hunt, T. Identification of Substrates for Cyclin Dependent Kinases. *Adv. Enzyme Regul.* (2009).
5. Pagliuca, F. W. *et al.* Quantitative proteomics reveals the basis for the biochemical specificity of the cell-cycle machinery. *Mol. Cell* **43**, 406-417 (2011).
6. Enserink, J. M. & Kolodner, R. D. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell. Div.* **5**, 11-1028-5-11 (2010).
7. Stern, B. & Nurse, P. A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.* **12**, 345-350 (1996).
8. Coudreuse, D. & Nurse, P. Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* **468**, 1074-1079 (2010).
9. Uhlmann, F., Bouchoux, C. & Lopez-Aviles, S. A quantitative model for cyclin-dependent kinase control of the cell cycle: revisited. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **366**, 3572-3583 (2011).
10. Fisher, D., Krasinska, L., Coudreuse, D. & Novak, B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *J. Cell. Sci.* **125**, 4703-4711 (2012).
11. Fisher, D. L. & Nurse, P. A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO J.* **15**, 850-860 (1996).
12. Songyang, Z. *et al.* Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr. Biol.* **4**, 973-982 (1994).

13. Mok, J. *et al.* Deciphering protein kinase specificity through large-scale analysis of yeast phosphorylation site motifs. *Sci. Signal.* **3**, ra12 (2010).
14. Koivomagi, M. *et al.* Dynamics of Cdk1 Substrate Specificity during the Cell Cycle. *Mol. Cell* **42**, 610-623 (2011).
15. Cross, F. R., Archambault, V., Miller, M. & Klovstad, M. Testing a mathematical model of the yeast cell cycle. *Mol. Biol. Cell* **13**, 52-70 (2002).
16. Bishop, A. C. *et al.* A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **407**, 395-401 (2000).
17. Huh, W. K. *et al.* Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686-691 (2003).
18. Deibler, R. W. & Kirschner, M. W. Quantitative reconstitution of mitotic CDK1 activation in somatic cell extracts. *Mol. Cell* **37**, 753-767 (2010).
19. Gavet, O. & Pines, J. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev. Cell.* **18**, 533-543 (2010).
20. Oikonomou, C. & Cross, F. R. Rising cyclin-CDK levels order cell cycle events. *PLoS One* **6**, e20788 (2011).
21. Cross, F. R., Yuste-Rojas, M., Gray, S. & Jacobson, M. D. Specialization and targeting of B-type cyclins. *Mol. Cell* **4**, 11-19 (1999).
22. Cross, F. R. & Jacobson, M. D. Conservation and function of a potential substrate-binding domain in the yeast Clb5 B-type cyclin. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4782-4790 (2000).
23. Loog, M. & Morgan, D. O. Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature* **434**, 104-108 (2005).
24. Bloom, J. & Cross, F. R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 149-160 (2007).
25. Koivomagi, M. *et al.* Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature* **480**, 128-131 (2011).
26. Koivomagi, M. & Loog, M. Cdk1: a kinase with changing substrate specificity. *Cell. Cycle* **10**, 3625-3626 (2011).
27. Mendenhall, M. D. & Hodge, A. E. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1191-1243 (1998).
28. Kim, S. Y. & Ferrell, J. E., Jr. Substrate competition as a source of ultrasensitivity in the inactivation of Wee1. *Cell* **128**, 1133-1145 (2007).
29. Trunnell, N. B., Poon, A. C., Kim, S. Y. & Ferrell, J. E., Jr. Ultrasensitivity in the Regulation of Cdc25C by Cdk1. *Mol. Cell* **41**, 263-274 (2011).
30. Takahashi, S. & Pryciak, P. M. Membrane localization of scaffold proteins promotes graded signaling in the yeast MAP kinase cascade. *Curr. Biol.* **18**, 1184-1191 (2008).
31. Wagner, M. V. *et al.* Whi5 regulation by site specific CDK-phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **4**, e4300 (2009).
32. Burke, J. R., Hura, G. L. & Rubin, S. M. Structures of inactive retinoblastoma protein reveal multiple mechanisms for cell cycle control. *Genes Dev.* **26**, 1156-1166 (2012).
33. Verma, R., Feldman, R. M. & Deshaies, R. J. SIC1 is ubiquitinated in vitro by a pathway that requires CDC4, CDC34, and cyclin/CDK activities. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1427-1437 (1997).
34. Hao, B., Oehlmann, S., Sowa, M. E., Harper, J. W. & Pavletich, N. P. Structure of a Fbw7-Skp1-cyclin E complex: multisite-phosphorylated substrate recognition by SCF ubiquitin ligases. *Mol. Cell* **26**, 131-143 (2007).
35. Hayles, J., Beach, D., Durkacz, B. & Nurse, P. The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol. Gen. Genet.* **202**, 291-293 (1986).
36. Hadwiger, J. A., Wittenberg, C., Richardson, H. E., de Barros Lopes, M. & Reed, S. I. A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6255-6259 (1989).

37. Tang, Y. & Reed, S. I. The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G1 and G2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **7**, 822-832 (1993).
38. Kito, K., Kawaguchi, N., Okada, S. & Ito, T. Discrimination between stable and dynamic components of protein complexes by means of quantitative proteomics. *Proteomics* **8**, 2366-2370 (2008).
39. Patra, D., Wang, S. X., Kumagai, A. & Dunphy, W. G. The xenopus Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators. *J. Biol. Chem.* **274**, 36839-36842 (1999).
40. Patra, D. & Dunphy, W. G. Xe-p9, a Xenopus Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes Dev.* **12**, 2549-2559 (1998).
41. Reynard, G. J., Reynolds, W., Verma, R. & Deshaies, R. J. Cks1 is required for G(1) cyclin-cyclin-dependent kinase activity in budding yeast. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5858-5864 (2000).
42. Bourne, Y. *et al.* Crystal structure and mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle regulatory protein Cks1: implications for domain swapping, anion binding and protein interactions. *Structure* **8**, 841-850 (2000).
43. Nash, P. *et al.* Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* **414**, 514-521 (2001).
44. McGrath, D. *et al.* Cks Confers Specificity to Phosphorylation-Dependent Cdk Signaling Pathways. *Cosubmitted*.
45. Orlicky, S., Tang, X., Willems, A., Tyers, M. & Sicheri, F. Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Cell* **112**, 243-256 (2003).
46. Brocca, S. *et al.* Order propensity of an intrinsically disordered protein, the cyclin-dependent-kinase inhibitor Sic1. *Proteins* **76**, 731-746 (2009).
47. Schulman, B. A., Lindstrom, D. L. & Harlow, E. Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10453-10458 (1998).
48. Brown, N. R., Noble, M. E., Endicott, J. A. & Johnson, L. N. The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.* **1**, 438-443 (1999).
49. Takeda, D. Y., Wohlschlegel, J. A. & Dutta, A. A bipartite substrate recognition motif for cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* **276**, 1993-1997 (2001).
50. Wohlschlegel, J. A., Dwyer, B. T., Takeda, D. Y. & Dutta, A. Mutational analysis of the Cy motif from p21 reveals sequence degeneracy and specificity for different cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4868-4874 (2001).
51. Wilmes, G. M. *et al.* Interaction of the S-phase cyclin Clb5 with an "RXL" docking sequence in the initiator protein Orc6 provides an origin-localized replication control switch. *Genes Dev.* **18**, 981-991 (2004).
52. Lowe, E. D. *et al.* Specificity determinants of recruitment peptides bound to phospho-CDK2/cyclin A. *Biochemistry* **41**, 15625-15634 (2002).
53. Bhaduri, S. & Pryciak, P. M. Cyclin-specific docking motifs promote phosphorylation of yeast signaling proteins by G1/S Cdk complexes. *Curr. Biol.* **21**, 1615-1623 (2011).
54. Bouchoux, C. & Uhlmann, F. A quantitative model for ordered Cdk substrate dephosphorylation during mitotic exit. *Cell* **147**, 803-814 (2011).
55. Hirschi, A. *et al.* An overlapping kinase and phosphatase docking site regulates activity of the retinoblastoma protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1051-1057 (2010).
56. Ikui, A. E., Rossio, V., Schroeder, L. & Yoshida, S. A Yeast GSK-3 Kinase Mck1 Promotes Cdc6 Degradation to Inhibit DNA Re-Replication. *PLoS Genet.* **8**, e1003099 (2012).

57. Lyons, N. A., Fonslow, B. R., Diedrich, J. K., Yates, J. R.,3rd & Morgan, D. O. Sequential primed kinases create a damage-responsive phosphodegron on Eco1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2013).
58. Bourne, Y. *et al.* Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* **84**, 863-874 (1996).

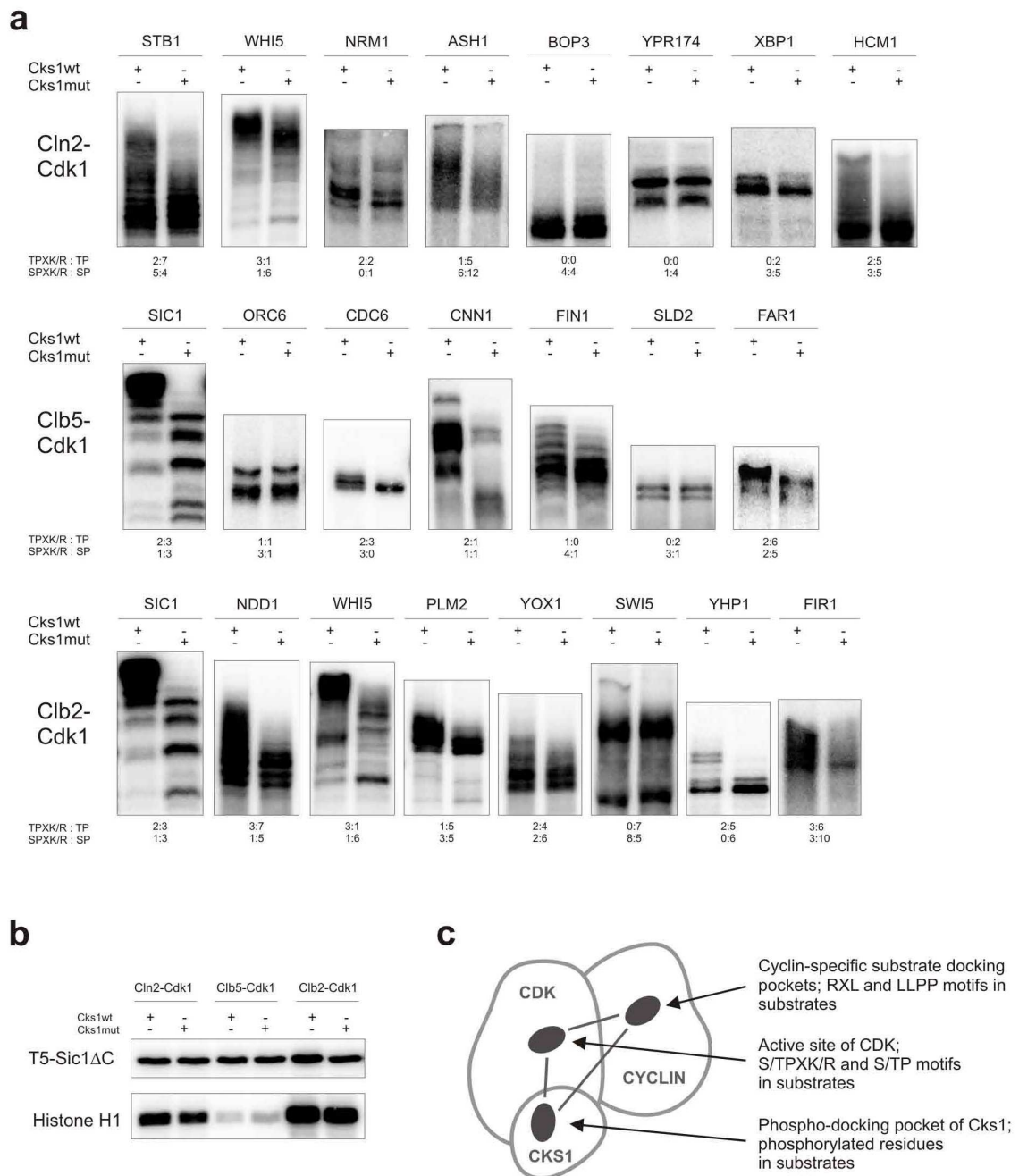


Figure 1. Cks1-dependent multisite phosphorylation of Cdk1 targets. (a) Demonstration of Cks1-dependent accumulation of multi-phosphorylated forms in selected targets of Cdk1. The kinase assays were performed using purified Cln2-, Clb5-, and Clb2-Cdk1 complexes, which were preincubated with either wild-type Cks1 or Cks1mut. The radioactively labeled multi-phosphorylated forms were separated using Phos-Tag SDS PAGE. The number of optimal and suboptimal consensus motifs, together with an indication if the sites have Ser or Thr residue as the phospho-acceptor, are provided below the panels; (b) Phosphorylation of a substrate construct containing a single CDK consensus phosphorylation site (T5-Sic1ΔC) is not influenced by Cks1-dependent phospho-docking. Additionally, the phosphorylation assays using a standard substrate histone H1 are shown; (c) A schematic diagram indicating three pockets in cyclin-Cdk1-Cks1 complex whose local site-specificity and positioning geometry could potentially control the phosphorylation dynamics of multisite targets.

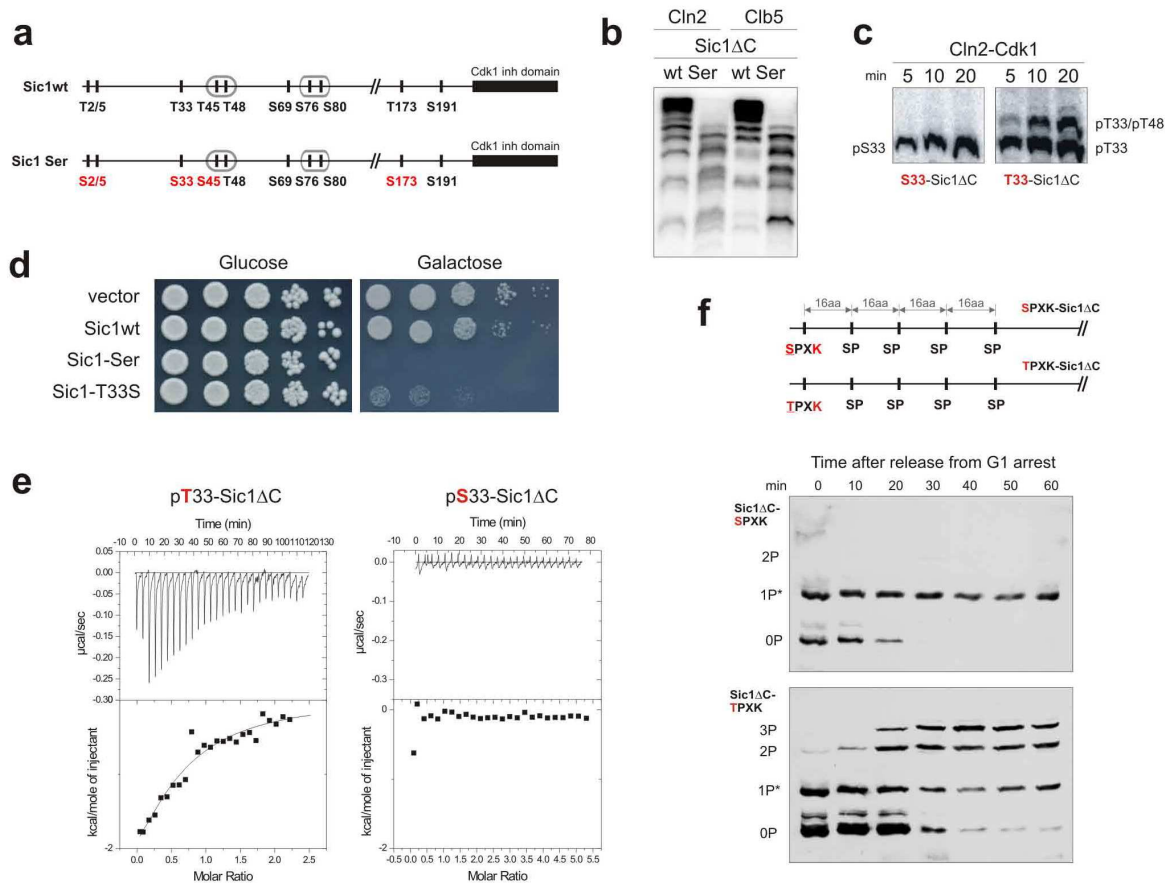


Figure 2. Exclusive preference of threonine over serine residues as the priming sites for Cks1-dependent docking and phosphorylation steps. (a) A diagram indicating the Thr-to-Ser substitutions made in Sic1 for the experiments in panels ‘b’ and ‘d’; (b) The kinase assay demonstrating the loss of abrupt multisite phosphorylation caused by Thr-to-Ser substitution of the Cdk1 phosphorylation sites in Sic1ΔC; (c) The kinase assays demonstrating the Thr-to-Ser substitution effect at position T33 of T33/T48-Sic1ΔC on the accumulation rate of doubly phosphorylated forms; (d) Full-length Sic1 versions were overexpressed under the galactose promoter to assay the ability of cells to degrade Sic1; (e) Representative ITC experiment to analyze the binding of pT33-Sic1ΔC and pS33-Sic1ΔC to Cks1. No binding signal was detected in the case of pS33-Sic1ΔC; (f) The *in vivo* demonstration of the requirement of Thr as a priming site of multiphosphorylation using western blotting of Phos-Tag SDS-PAA gels. Schematic diagrams (above) showing different constitutively expressed and non-destructible Sic1ΔC -derived substrate constructs that were used to follow the dynamics of phosphorylation shifts after the release of cells from α -factor arrest. These constructs contained a single N-terminal threonine-based priming site at position 5 surrounded by an optimal CDK consensus motif (PSTPPR). The serine-based secondary sites were introduced C-terminally from the priming site at 16 aa intervals by replacing the original sequence at these sites with a short sequence fragment containing a suboptimal CDK consensus site (see Supplementary Methods section). Additionally, in these constructs lacked the cyclin specific docking sites. *Partial phosphorylation of sites by an unknown kinase activity in G1.

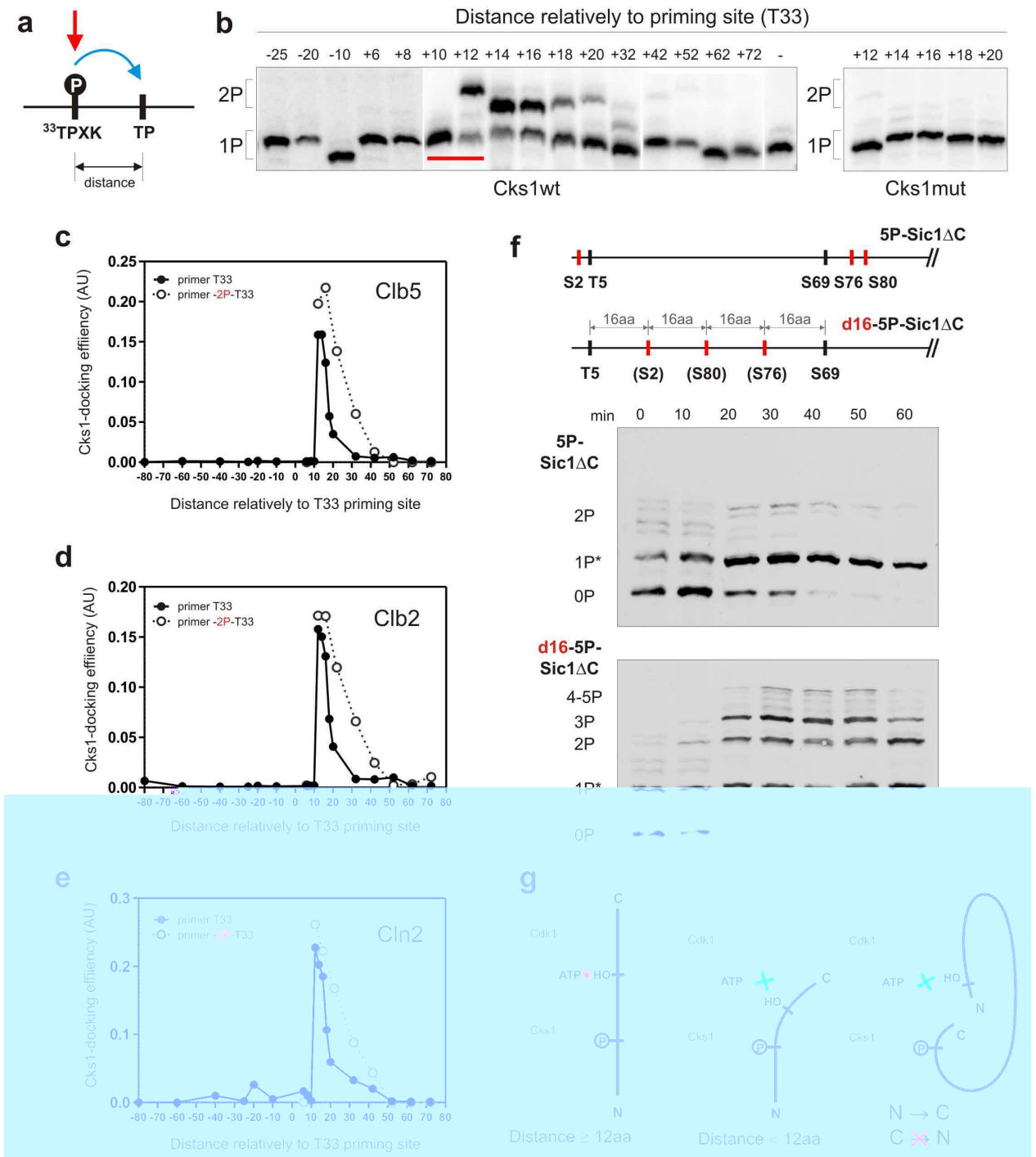


Figure 3. Analysis of the influence of distance between the priming phosphorylation site and the secondary phosphorylation site. (a) A scheme explaining the positional variation of the secondary site along the Sic1 polypeptide chain; (b) The autoradiograph of Phos-Tag gels showing the phosphorylation of constructs with varied distances between the priming site (T33) and the secondary site using Clb5-Cdk1. The Cks1-dependence of the abrupt appearance of doubly phosphorylated forms in these assay conditions was confirmed by assaying the constructs with the most efficient docking distances in the presence of Cks1mut (right panel). Within the whole set of tested constructs some variations in the mobility were detected, which is likely caused by the specific primary structure surroundings of particular phosphorylation sites in these constructs. The red bar indicates where the abrupt increase of the rate of the secondary step was observed. The last lane on the right side of the left panel shows the construct containing only the priming site T33; (c-e) The quantified profiles that show the relative accumulation rate of doubly phosphorylated forms at different distances

between the priming sites and the secondary sites using Clb5-Cdk1 (c), Clb2- Cdk1 (d), and Cln2-Cdk1 (e). For quantification details see the Supplementary Methods section; (f) The demonstration of the requirement of optimal distances between the phosphorylation sites for efficient multi-phosphorylation *in vivo* using western blotting of Phos-Tag SDS-PAA gels. Schematic diagrams above the blots show the Sic1 Δ C-derived substrate constructs used to follow the dynamics of phosphorylation shifts after the release of cells from α -factor arrest. The construct with either too long or too short distances between the sites was comprised of a selection of 5 sites at their original positions in Sic1 (see also the scheme in Fig. 2a). The second construct was designed by removing 3 of the 5 sites as indicated. The only optimal site in this constructs was the T5. The R in the position +3 of S76 consensus motif was changed to A in both constructs; (g) A scheme explaining the optimal distance requirements and the N-to-C-directionality in the Cks1-dependent phosphorylation step.

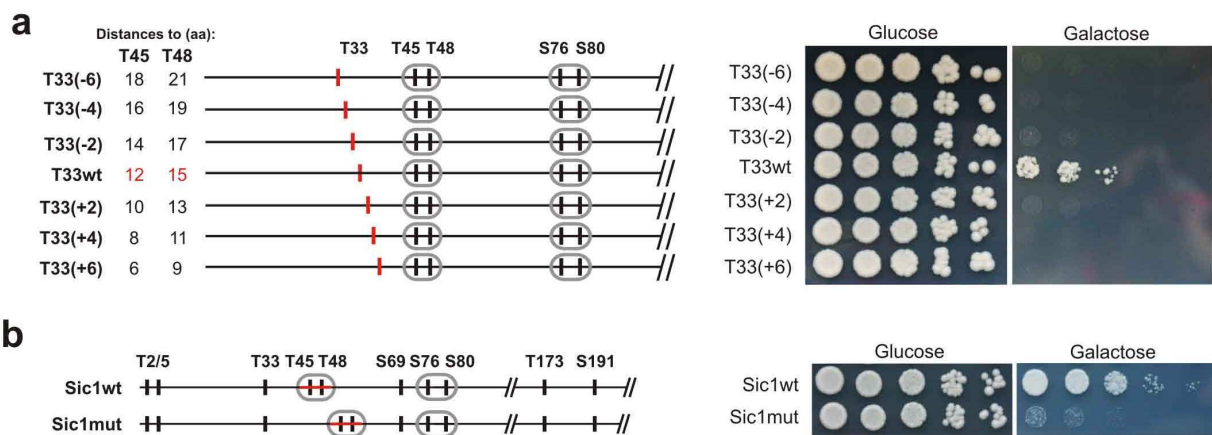


Figure 4. The optimal distances between the sites of Sic1 are critical for its degradation *in vivo*. (a) The viability assay overexpressing Sic1 versions containing a set of phosphorylation sites T33/T45/T48/S76/S80. The position of the priming site T33 was shifted by 2 amino acid steps upstream and downstream of its original position. Because the strain expressing T33/T45/T48/S76/S80-Sic1 grows slightly slower compared with the strain expressing wild type Sic1, the colonies were grown for a longer time compared with the assay presented below in panel ‘b’ involving the wild type version of Sic1; (b) Similar viability assay as in ‘a’ showing the effect of shifting the position of a critical di-phosphodegron T45/T48 in context of wild type Sic1.

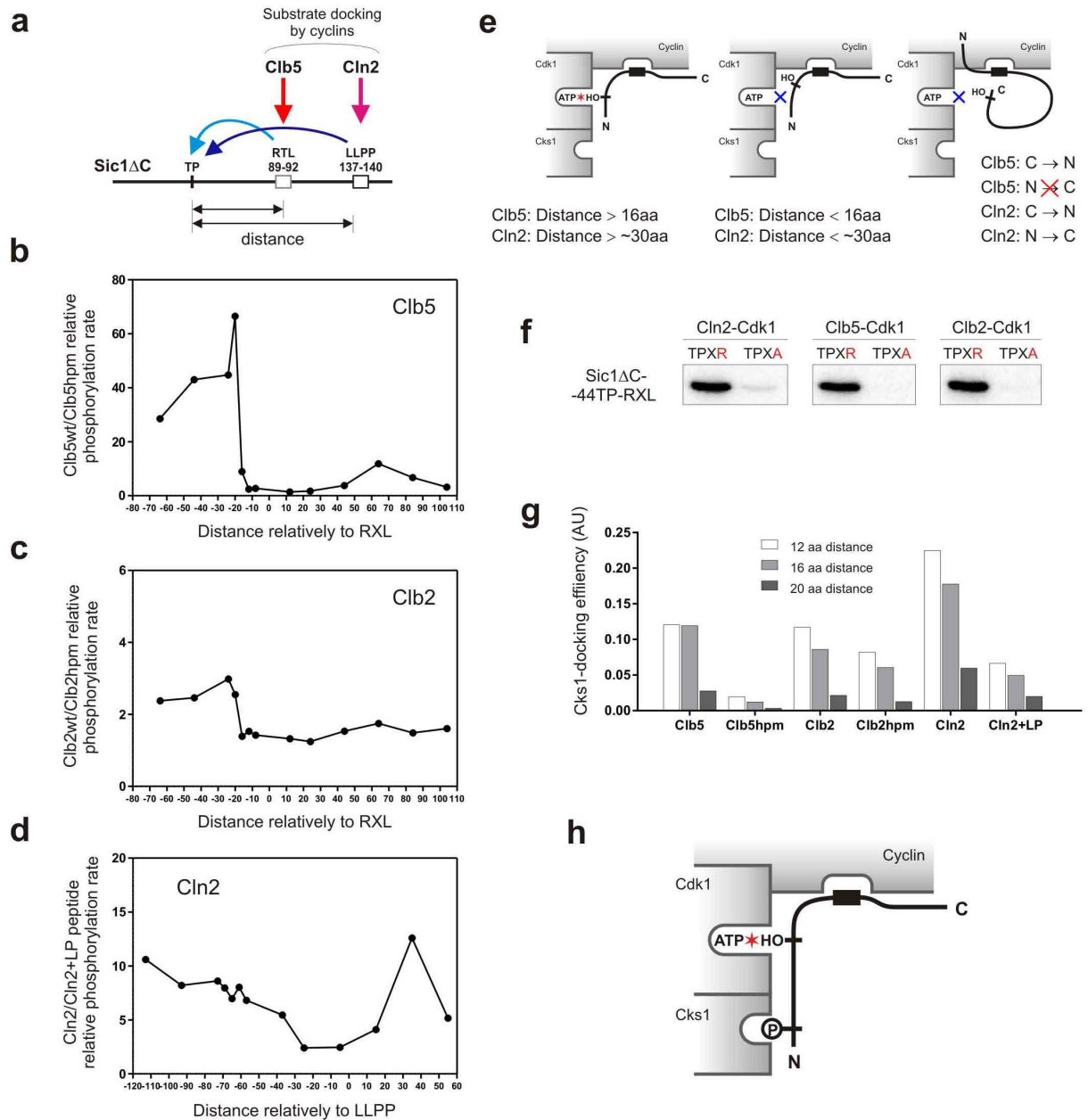


Figure 5. Analysis of the influence of distance between the phosphorylation site and the cyclin-specific docking sites. (a) The scheme of varied phosphorylation site position along the polypeptide chain of constructs based on Sic1 Δ C with all CDK sites mutated to alanines and containing a single RXL motif and a Cln2-specific LLPP motif. In these constructs a single CDK consensus motif based on T5 was placed at various distances from the Clb5 docking site RTL and Cln2 docking site LLPP; (b) The specificity profiles obtained by using substrate constructs with different distances from the RXLF motif are plotted as a ratio of phosphorylation rates of wild type and hpm version of Clb5-Cdk1 complex; (c) Analogous specificity profile as in ‘b’ plotted for Clb2; (d) Analogous specificity profile as in ‘b’ plotted for Cln2-Cdk1 when assayed in the absence and in the presence of the competitor peptide containing the cyclin docking motif ‘LLPP’; (e) Schematic representation of the cyclin-dependent docking modes; (f) The effect of the replacement of optimal CDK consensus motif with a suboptimal motif on the phosphorylation of a construct (constructs of the type described in panel ‘a’), in which there are 44 and 92 residues between the phosphorylation site and the RXL and LLPP motifs, respectively; (g) The same constructs, with three different

distances, as used in experiments presented in Figure 3a-e were used to determine the effect of cyclin docking interactions on Cks1-dependent phosphorylation (as in Fig. 3c-e), using wild-type cyclin complexes or the hpm versions (Cib5, Cib2), or when the competitor peptide (+LP) was included (Cln2); (h) Schematic depiction of the triple docking mechanism used by the cyclin-Cdk1-Cks1 complex.

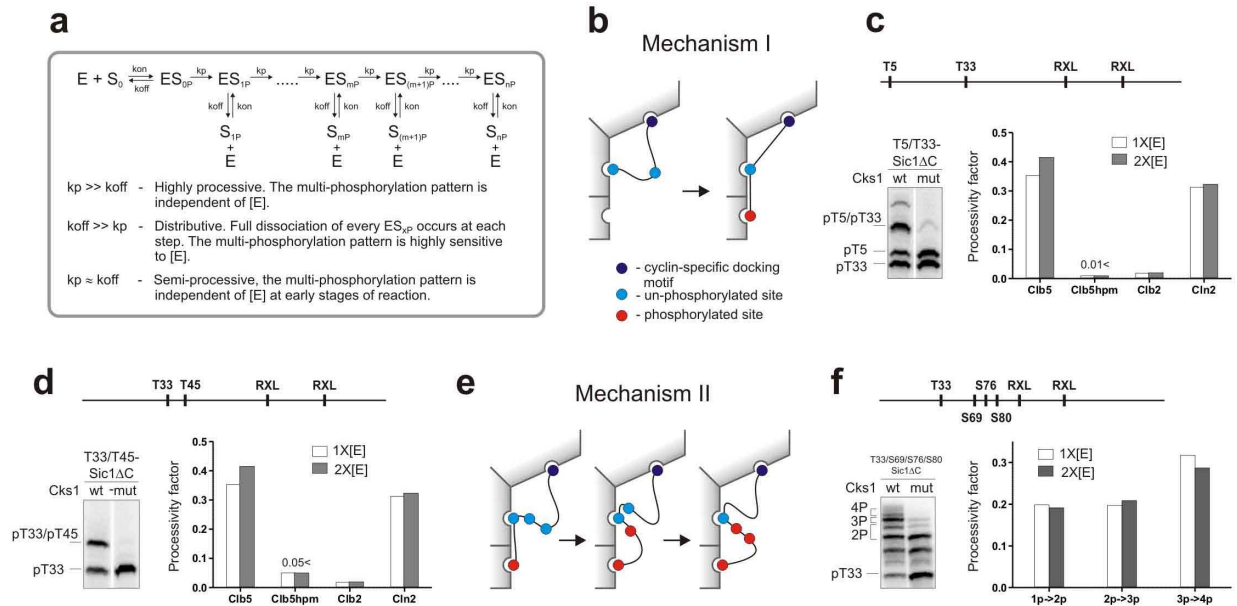


Figure 6. Analysis of the processivity of Cdk1-catalysed multi-phosphorylation. (a) A general kinetic scheme of a sequential multiphosphorylation process. For the sake of clarity, each form of substrate containing a certain number of phosphates is considered as kinetically equal; (b) A depiction of the mechanism of a processive step in which the phosphorylation of a priming site is followed by the phosphorylation of the secondary site directly, without dissociation of the substrate intermediate from the enzyme; (c) Different phosphorylated forms of substrate construct T5/T33-Sic1ΔC were used to test Mechanism I (separated in Phos-Tag SDS-PAGE). The bar graph on the right shows the patterns of processivity for different cyclin-Cdk1 complexes. The y-axis shows the ratio of 2P/(1P+2P), where 2P is the quantified amount of the doubly phosphorylated species, and 1P is the singly phosphorylated form pT5/T33-Sic1ΔC. Because this ratio does not change at early time points upon lowering the enzyme concentration, the observed ratio represents a processivity factor that indicates the probability for the reaction to proceed without dissociation relative to the probability of dissociation of the singly phosphorylated species from the enzyme; (d) An analogous experiment as in ‘b’ for the analysis of Mechanism I using a substrate construct with a different pair of sites, T33/T45; (e) A schematic depiction of a second major processive mechanism. The phosphorylated priming site when docked to the Cks1 pocket can processively phosphorylate several secondary sites without dissociation; (f) Analysis of Mechanism II using a substrate construct T33/S69/S76/S80-Sic1ΔC, in which T33 is a priming site. The bar graph shows the processivity factors at each step.

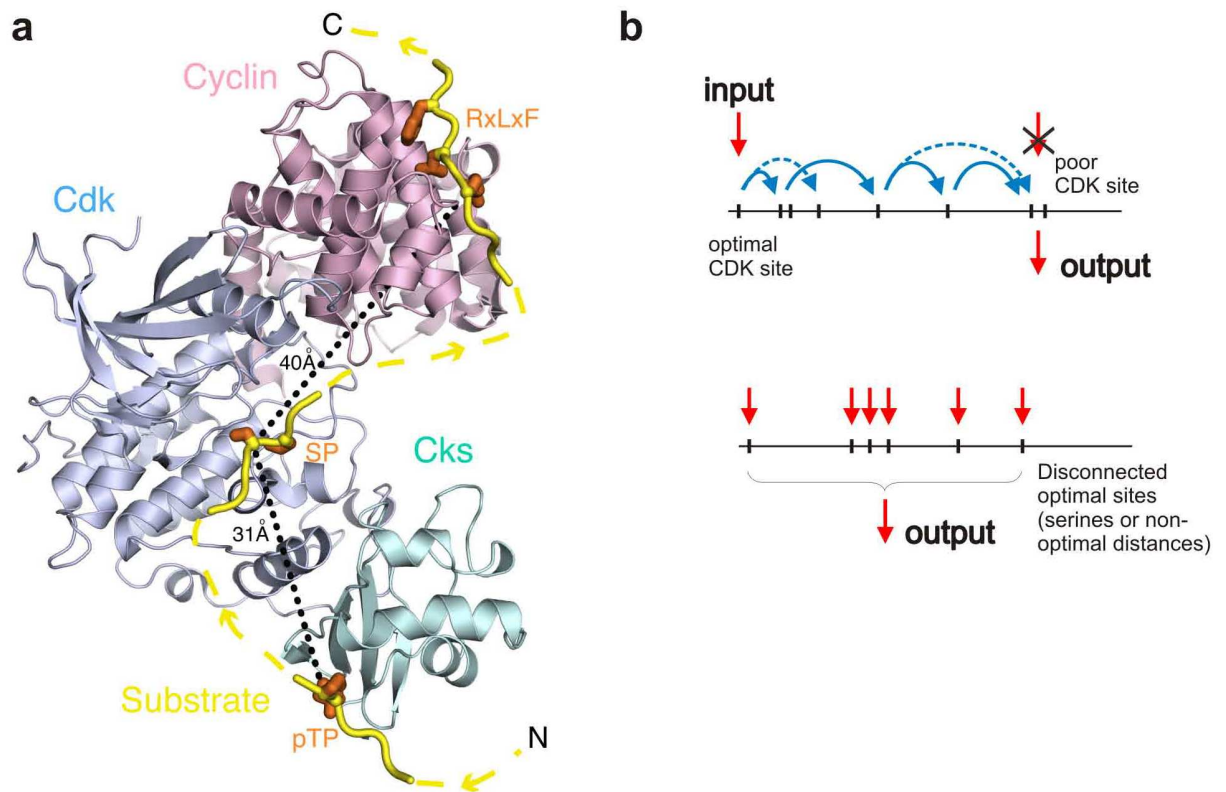


Figure 7. The three interaction sites in the cyclin-Cdk1-Cks1 complex are the key for processing of Cdk1 signal through different multisite phosphorylation networks; (a) A structural model showing the arrangement of the three key pockets in the complex. The model was created by superimposing domains from crystal structures (PDB codes: 1BUH, 2CCI, in submission) each solved in the presence of the relevant substrate peptide bound to the pocket 44, 48, 58; (b) The upper scheme shows an example of a network on a stretch of disordered peptide chain. The cascade starts at specific N-terminal priming site(s) and proceeds, in a Cks1-dependent manner with assistance from cyclin docking sites, towards C-terminal output sites. The lower panel shows a cluster of sites with disconnected sites with either too short or too long distances, or alternatively, with only serines in the phosphorylation sites.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Mihkel Örd

(sünnikuupäev: 09.06.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Fosforüleeritavate aminohapete paiknemise mõju Cdk1 substraatide multifosforüleerimise dünaamikale“,

mille juhendajad on Mardo Kõivomägi ja Mart Loog,

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

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **28.05.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, 28.05.2013