

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

Johanna Luige

**Transkriptsioonifaktorite *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* mutatsioonanalüüsiks
sobivate pärmitüvede konstrueerimine ja *TAF14* deletsioonimutantide uurimine
pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Geenitehnoloogia

Juhendajad prof Arnold Kristjuhan,

MSc Kristina Reinmets

TARTU 2016

Transkriptsioonifaktorite *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* mutatsioonanalüüsiks sobivate pärmitüvede konstrueerimine ja *TAF14* deletsioonimutantide uurimine pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*)

Käesoleva töö käigus valmistati transkriptsioonil olulisi geene *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* ekspresseerivad plasmiidid. Teiseks koostati nende geenide genoomsete deletsioonidega tüved, millesse transformeeriti kirjeldatud plasmiidid metsiktüüpi geenikoopiatega ning mida saab kasutada mutatsioonanalüüsiks. Töö kolmanda osana uuriti Taf14 N- ja C-terminaalsete domeenide individuaalset mõju *taf14Δ* pärmitüves. Lisaks kombineeriti Taf14 mutandid RNA polümeraas II subühiku Rpb9 deletsiooniga tüves, hindamaks mutantide võimalikku komplementeerivat efekti *taf14Δrpb9Δ* rakkude letaalsele fenotüübile. Töö tulemustest selgub, et N-terminaalse valguosa ekspressioon põhjustab sarnast fenotüüpi *taf14Δ* rakkudega ja üksnes N-terminaalne osa pole piisav kompenseerimaks kasvudefekte topeltmutantses pärmitüves. Taf14 C-terminaalse valguosa ekspressioon tagab kasvueelise nullmutandi ees *taf14Δ* rakkudes ning on piisav komplementeerima topeltmutantse tüve kasvu häireid.

Märksõnad: transkriptsioon, kromatiini remodelleerimine, Taf14, RNA polümeraas II

B220 Geneetika, tsütogeneetika

Construction of yeast strains applicable for the mutational analysis of transcription factors *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2*, and *TAF14*. Determining the effects of *TAF14* mutants in budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

In this study, transcriptionally important genes *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2*, and *TAF14* were cloned into plasmid vectors. While expressing the wild-type copies from plasmids, the genomic deletions of these five genes were introduced, resulting in yeast strains applicable for mutational analysis. Then, mutants of Taf14 were constructed and their impact on cell growth was analysed in *taf14Δ* yeast strain and in *taf14Δ* and RNA polymerase II subunit Rpb9-defective double mutant strain, which produces a lethal phenotype. Taf14 is a shared component of many cellular complexes, implying its versatile functions. The results of these experiments state that expressing only the N-terminal region results in a similar phenotype to null mutant in *taf14Δ* strain and is insufficient to complement the lethality of *taf14Δrpb9Δ* cells. Interestingly, expression of the C-terminal region resulted in slight growth advantage in the *taf14Δ* strain, while partially compensating the growth defects of the double mutant strain.

Keywords: transcription, chromatin remodelling, Taf14, RNA polymerase II

B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Kromatiin	7
1.1.1 Nukleosoomid	7
1.1.2 Histonide posttranslatsioonilised modifikatsioonid	8
1.1.3 Kromatiini remodelleerijad	10
1.2 RNA polümeraas II	11
1.2.1 Rpb9 roll transkriptsioonis	13
1.3 Valke kodeerivate geenide transkriptsioon	14
1.3.1 Preinitsiatsioonikompleksi moodustumine	15
1.3.2 Taf14 roll transkriptsioonis	16
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	19
2.1 Töö eesmärgid	19
2.2 Materjalid ja meetodika	19
2.2.1 Kasutatud söötmed	19
2.2.2 Kasutatud pärmitüved	20
2.2.3 Sporulatsioon ja tetraadide analüüs	20
2.2.4 Plasmiidide valmistamine	21
2.2.5 Deletsioonitüvede valmistamine	22
2.2.6 Plasmidi transformeerimine pärmis	24
2.3 Tulemused	25
2.3.1 Geenide <i>RPB1</i> , <i>RPB2</i> , <i>TFG1</i> , <i>TFG2</i> ja <i>TAF14</i> klonimine pRS416 plasmidi	25
2.3.2 Deletsioonitüvede valmistamine	26
2.3.3 Taf14 mutantide konstrueerimine ja kirjeldamine	28
2.4 Arutelu	32
KOKKUVÕTE	34
SUMMARY	35
KIRJANDUSE LOETELU	37
LISAD	43
Lisa 1. Kasutatud pärmitüvede genotüübid ja päritolu	43
Lisa 2. Kasutatud praimerid	44
LIHTLITSENTS	46

KASUTATUD LÜHENDID

5-FOA – 5-fluoro orotic acid (5-fluoro-oroothape)

ap - aluspaari

BRE – TFIIB recognition element (TFIIB äratundmisjärjestus)

CENP-A – centromere protein A (tsentromeerne valk A)

Cse4 – chromosome segregation protein 4 (kromosoomi segregatsiooni valk 4)

CTD – C-terminal domain (C-terminaalne domeen)

DSB – double-strand break (DNA kaheaahelaline katke)

Gcn5 – *general control of amino-acid synthesis protein 5* (üldise aminohapete sünteesi kontrolli valk 5)

GTFs – general transcription factors (põhilised transkriptsioonifaktorid)

H1 – histoon H1

H2A – histoon H2A

H2B – histoon H2B

H3 – histoon 3 H4 – histoon 4

HAT – histone acetyltransferase (histoonide atsetüültransferaas)

HDAC – histone deacetylase (histoonide deatsetülaas)

HMT – histone methyltransferase (histoonide metüültransferaas)

INO80 – inositol requiring (kromatiini remodelleeriv kompleks; deletsioon põhjustab inositooli aukuksotroofiat)

KAT – K (lysine) acetyltransferase (lüsiini atsetüültransferaas)

NuA3 – nucleosomal acetyltransferase of histone H3 (histooni H3 atsetüültransferaas)

PHD – plant homeo domain (taimes avastatud valgumotiiv)

PIC – preinitiation complex (transkriptsiooni preinitsiatsioonikompleks)

PTM – post-translatsiooniline modifikatsioon

RNA Pol II – RNA polümeraas II

RSC – remodels the structure of chromatin (kromatiini struktuuri remodelleeriv kompleks)

SAGA – Spt6-Ada-Gcn5-acetyltransferase (Spt6, Ada ja Gcn5 subühikuid sisaldav atsetüültransferaas)

SUMO – small ubiquitin-like modifier (väike ubikvitiinisarnane modifitseerija)

SWI/SNF – switching defective/sucrose non-fermenting (kromatiini remodelleerimiskompleks)

TATA – TATA-box (AT-rikas konsensusjärjestus promootoril)

TBP – TATA-binding protein (TATA-järjestusega seonduv valk)

TAF – TBP-associated factor (TBP-ga seonduvad faktorid)

TFIIA – transcription factor II A (RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor A)

TFIIB – transcription factor II B (RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor B)

TFIID – transcription factor II D (RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor D)

TFIIF – transcription factor II F (RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor F)

TFIIH – transcription factor II H (RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor H)

TFIIE – transcription factor II E (RNA polümeraas II transkriptsioonifaktor E)

TFIIS – transcription elongation factor II S (RNA polümeraas II elongatsioonifaktor)

TL – tri~~g~~ger-loop („päästik-ling“ struktuurne valgudomeen)

TSS – transcriptional start site (transkriptsiooni algussait)

YEATS – Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5 (Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5 valkudes kirjeldatud valgudomeen)

Zn1, Zn2 – tsinki siduvad valgudomeen 1 ja 2

SISSEJUHATUS

Genoomne stabiilsus ja geneetilise materjali säilimine on oluline iga organismi eluspüsimiseks. Eukarüootide DNA on tuumas seondunud ümber valkude, moodustades kromatiini, mis tagab DNA säilimise ja on oluline regulaator geeniekspressioonil. Kromatiini esimese pakkimistaseme moodustavad nukleosoomid, mis koosnevad histoonide oktameerses südamikust, mille ümber on keerdunud DNA 147 aluspaari ulatuses. Kromatiinse DNA ligipääsetavus erinevatele faktoritele on vajalik kõigis DNA-seoselistes protsessides, kaasa arvatud transkriptsioonil. Kromatiini ümberkorraldused on seotud histoonide ja DNA vahelise interaktsiooni muutmisega läbi histoonide posttranslatsiooniliste modifikatsioonide, teise kategooria moodustavad ATP-sõltuvad multikomponentsed remodelleerimiskompleksid, mis võivad nukleosoomi eemaldada või liigutada.

Transkriptsioon on geenide avaldumise esimene etapp, mille käigus RNA polümeraas sünteesib DNA-ahelale komplementaarse RNA-molekuli. Valke kodeerivate geenide transkribeerimise eest vastutab RNA polümeraas II. Transkriptsioonil osalevad täiendavalt transkriptsioonifaktorid, mis vahendavad regulatoorseid signaale ja tagavad polümeraasi seondumise promootorile. Lisaks võivad neis sisalduda kromatiiniga interakteeruvad domeenid, mis võimaldavad osaleda transkriptsiooniseoselises kromatiini ümberkorraldamises. Pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) transkriptsiooniaparaat sisaldab valku Taf14, mille eripäraks on interakteerumine mitmete valgukompleksidega, näiteks transkriptsioonifaktorite TFIID ja TFIIIF-ga, mitmete kromatiini remodelleerimiskomplekside ja histoonide modifitseerivate ensüümidega. Taf14 funktsioonide määratlemine võimaldab mõista transkriptsiooni regulatsiooni ja leida seoseid rakuliste protsesside vahel.

Käesoleva töö teoreetilises osas antakse ülevaade kromatiini struktuurist ja selle modifitseerimisest. Tutvustatakse valke kodeerivate geenide transkriptsiooni initsiatsiooni ning selles osalevaid faktoreid. Eksperimentaalses osas kirjeldatakse transkriptsioonifaktorite *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* mutatsioonanalüüsiks sobivate pärmitüvede valmistamist. Näidatakse Taf14 N- ja C-terminaalsete osade individuaalset mõju pärmirakkudele ning kombineeritakse need mutandid RNA polümeraas II subühiku Rpb9 deletsiooniga pärmitüves.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Kromatiin

Eukarüootse raku DNA esineb tuumas seondununa valkudega ja moodustab organiseeritud struktuuri, mida nimetatakse kromatiiniks. Kromatiiniks organiseerumine muudab genoomi kompaktsaks ja kokkupakkimine kaitseb DNA-d kahjustuste eest. Kromatiini peamiseks struktuurseks üksuseks on nukleosoom, mis koosneb aluselistest valkudest histoonidest (kahe korduses valgud H2A, H2B, H3 ja H4) ning nende ümber keerdunud 147 aluspaari pikkusest DNA kaksikahelast. Nukleosoomide vahele jääb varieeruva pikkusega *linker*-DNA (Piatti *et al.*, 2011). Nukleosoomid ja *linker*-DNA moodustavad esmase genoomi pakkimistasandi ehk „pärlikee“ struktuuri, mille diameeter on 11 nm. Järgnev pakkimistase on 30 nm fiiber. Kõrgemad pakkimisastmed on tagatud täiendavate mittehistonsete valkude poolt ja viimaseks kondenseerumise tasemeks on 700 nm diameetriga valgusmikroskoobis nähtavad mitootilised kromosoomid (Maeshima ja Eltsov, 2008).

Kromatiin peab olema dünaamiline struktuur, mis võimaldab nii DNA kaitsmist ja organiseerimist rakutuumas, kuid tagab ka ligipääsu geenidele ja reguleerivatele elementidele. Erinevaid genoomi piirkondi iseloomustab varieeruv kokkupakitusaste. Heterokromatiniseerunud ehk suletud kromatiiniga on valdavalt telomeersed ja tsentromeersed alad, ka emasimetajate inaktiveerunud X-kromosoom. Selle vastandiks on avatud seisund ehk eukromatiin, mis on iseloomulik aktiivselt transkribeeritud aladele. Kromatiini lokaalne avamine ja sulgemine võimaldab reguleerida spetsiifiliste geenide ekspressiooni (Lorch ja Kornberg, 2015).

Kromatiini ümberkorraldused on vajalikud kõigi DNA-ga toimuvate protsesside toimumiseks. Kromatiini modelleerimise eest vastutavad valkkompleksid võib jaotada kahte kategooriasse: nukleosoomi ümberpaigutavad või eemaldavad ATP-sõltuvad kompleksid (RSC, SWI/SNF) ja kompleksid, mis muudavad kromatiini konformatsiooni histoonide posttranslatsiooniliste modifikatsioonide kaudu (SAGA, NuA3) (Piatti *et al.*, 2011).

1.1.1 Nukleosoomid

Nukleosoomi südamik moodustab histoonidest oktameer, mis koosneb H3-H4 tetrameerist, millega seonduvad kaks H2A-H2B dimeeri. Kõrgemates eukarüootides leidub veel H1, mis seonduv nukleosoomide vahele jääva *linker*-DNA-ga ja mis võimaldab kõrgemaid

pakkimistasemeid moodustada (Maeshima ja Eltsov, 2008). Histonides sisaldub konserveerunud histooni voldi domeen (*histone fold*), millest moodustub nukleosoomi „keha“, mille ümber keerdub DNA 1,7-kordse pöörde ulatuses (Lee ja Workman, 2007). Südamikust ulatuvad välja histoonide N-terminaalsed piirkonnad ehk „sabad“, mis osalevad nukleosoomidevahelistes interaktsioonides. Histonid interakteeruvad DNA fosfaatselgrooga, mitte lämmastikalustega, mis tagab nukleosoomide moodustumise järjestusest olenemata. Nukleosoomide paiknemine on siiski piiratud näiteks DNA painutamiseks kuluva energiahulga poolt, mis sõltub konkreetsest järjestusest, või on takistatud tulenevalt järjestusspetsiifiliste valkude seondumisest. Seetõttu hõlmavad nukleosoomid promootorite, reguleerivate elementide ja muude oluliste DNA saitide läheduses teatud eelistatud positsioone (Kornberg ja Lorch, 1999).

Lisaks mainitud viiele valgule esineb alternatiivseid histoonivariante, mis moodustavad kindlaid genoomiosi defineerivaid nukleosoomi. Transkriptsiooni regulatsioonil osalevad peamiselt H2A ja H3 teisendid. Näiteks H2A.Z (pärmis Htz1) ja H2A.X on histooni H2A variandid, mis on konserveerunud pärmist kuni inimeseni. H2A.Z-nukleosoomid on iseloomulikud transkribeeritavate geenide promootoritel (Brunelle *et al.*, 2015; Papamichos-Chronakis *et al.*, 2011). On näidatud, et DNA kaheaheelaliste katkete (*double-strand breaks*, DSB) indutseerimisel tõuseb nendes kohtades H2A.X Ser139 fosforüleerimise tase. Fosforüleeritud H2A.X fookused signaaliseerivad reparatsioonisüsteemide kohaletulekut DNA kahjustustele. Kuid H2A.X fookused on iseloomulikud ka rakulistes protsessides, mille toimumise eeltingimusteks on DSB-de sisseviimine, näiteks DNA ümberkorraldustes imetajate immuunrakkude kujunemisel, meiootilises rekombinatsioonis ja apoptoosis (Redon *et al.*, 2002). Tsentromeeride piirkonnas esinevad tsentromeeride-spetsiifilised nukleosoomid, kus H3 on asendatud homoloogiga CENP-A (pärmis Cse4). CENP-A eristab tsentromeeri teistest kromosoomi osadest ja on rakutsükli vajalik kinetohooride moodustumiseks ja kromosoomide segregatsiooniks. Kehtiva arusaama kohaselt määrab tsentromeeri identiteedi epigeneetilise märgisena just CENP-A (Stellfox *et al.*, 2013; Nechemia-Arbely *et al.*, 2012; Bodor *et al.*, 2014).

1.1.2 Histonide posttranslatsioonilised modifikatsioonid

Histonide posttranslatsioonilised modifikatsioonid (PTM) reguleerivad histoonide ja DNA vahelist interaktsiooni ning nukleosoomidevahelisi sidemeid. Histoone modifitseeritakse vastusena rakku jõudnud stiimulitele, see on kiire ja dünaamiline (Kouzarides, 2007). Modifikatsioonidele võivad sõltuvalt histoonist alluda kas N-terminaalne „saba“, „keha“

piirkond või C-terminaalne regioon, mille aminohapete külghelatele lisavad ensüümkompleksid kovalentselt keemilisi gruppe (atsetüül-, metüül-, fosfaatrühmi) või polüpeptiide (ubikvitiin, SUMO-peptiid) (Zhang ja Reinberg, 2001). PTM lisavatest ensüümidest on kirjeldatud histoonide atsetüültransferaase (*histone acetyltransferase*, HAT), metüültransferaase (HMT), kinaase, ubikvitiin-ligaase ja teisi. Modifikatsioonid lisatakse ja eemaldatakse lähtuvalt olemasolevate modifikatsioonide kontekstist ning modifikatsioonimustrist sõltub, millised faktorid kromatiinile seonduvad (Kornberg ja Lorch, 1999).

Kromatiiniga interakteeruvatel faktoritel esineb mitmeid valgudomeene, mis võimaldavad ära tunda ja siduda erinevaid histoonide PTM-e ja millest osa on järgnevalt kirjeldatud. Näiteks bromodomeeni abil toimub seondumine atsetüleeritud lüsiinijääkidega; kromodomeeni sisaldavad mitmed kromatiini-seoselised valgud ning see seob histoonide metüleeritud lüsiine (Ferri *et al.*, 2015). PHD ehk taime homeodomeen (*Plant homeodomain*) esineb eukarüootse transkriptsiooniga seotud valkudes. Tudor domeeni kirjeldati esmakordselt äädikakärbse (*Drosophila melanogaster*) Tudor valgus, kus see on nii RNA-seoseline kui ka metüleeritud arginiinijääke siduv motiiv (Lu ja Wang, 2013). Atsetüleeritud lüsiine siduv YEATS-domeen leidub mitmetes kromatiini modifitseerivates valkudes ning transkriptsioonikompleksides. Pagaripärmis sisaldab YEATS-domeeni näiteks TFIID ja TFIIF koosseisu kuuluv Taf14 (Chatterjee ja Muir, 2010; Lee ja Workman, 2007; Kouzarides, 2007; Zhang *et al.*, 2011).

Histoonide atsetüleerimine on kromatiini avamise ja seetõttu ka transkriptsiooni seisukohalt olulisim PTM. Spetsiaalsed atsetüültransferaasid lisavad atsetüülrühma lüsiinide ϵ -aminorühmale. Atsetüülrühma negatiivne laeng neutraliseerib histoonide positiivset laengut (Allfrey *et al.*, 1964; Kouzarides, 2007). Kuid N-terminaalsete „sabade“ modifitseerimine ei mõjuta peamiselt nukleosoomi südamiku stabiilsust ja selle seotust DNA-ga, vaid eelkõige nukleosoomidevahelisi interaktsioone ja nende organiseerumist kromatiini fiibriteks. Seega on modifikatsioonide mõju koordineeritud ja ulatub üle laiemate regioonide (Grant ja Berger, 1999). Atsetüleerimine on oluline modifikatsioon ka teistes rakulistes protsessides ning selle täpne tähendus sõltub modifikatsiooni asukohast ja selle lisanud HAT-ist. HAT-de tegevust moduleerivad histoonide deatsetülaasid (*histone deacetylase*, HDAC), mis eemaldavad lisatud atsetüülrühma. On näidatud, et HAT-de sihtmärgiks on lisaks histoonidele ka mitmed muud valgud, mistõttu võib neid substraadi järgi nimetades kutsuda ka lüsiinide atsetüültransferaasideks (KAT).

Metüleerimisele alluvad lüsiinid ja arginiinid, kusjuures rühmi võib lisada lüsiinidele kuni kolm (mono-, di-, trimetülatsioon) ning arginiinidele kuni kaks (mono- ja dimetülatsioon). Metüleerimine vahendab väga erinevaid protsesse läbi keerulise modifikatsioonimustri. Näiteks trimetüleeritud H3K4 (H3K4me3) on aktiivsetele promootoritele iseloomulik modifikatsioon, samas H3K4 monometüleerimine on seotud geenide vaigistamisega (Strahl *et al.*, 1999; Mews *et al.*, 2014). Fosforüleerimine on valkude puhul levinud modifikatsioon, kuid histoonidel esineb seda harva. Fosforüleeritavad aminohappejäägid on seriinid ja treoniinid. H3 Ser10 ja Ser28 fosforüleerimine kaasneb kromosoomide kondenseerumisega. H3 Ser10 fosforüleerimine on Gcn5-sõltuvate geenide transkriptsiooni aktivatsiooni eelduseks, sest Gcn5 atsetüleerib H3K14 vaid juhul, kui Ser10 on modifitseeritud (Nowak ja Corces, 2004).

1.1.3 Kromatiini remodelleerijad

Kromatiini remodelleerivad ATP-sõltuvad kompleksid, mis võivad nukleosoomi DNA-l ümber paigutada või eemaldada. Nende töö on koordineeritud ja vahetus seoses kõigi DNA-seoseliste valkudega. Sealhulgas histoone modifitseerivate ensüümide ja transkriptsioonifaktoritega, mis osalevad nukleosoomide destabiliseerimises või interakteeruvad nendega konkureerivalt (Peterson ja Workman, 2000). Histoone modifikatsioonimuster võib soodustada remodelleerijate seondumist kromatiinile, millele järgneb kromatiini edasine ümberkorraldamine, või tõrjuda komplekside interakteerumist kromatiiniga (Kouzarides, 2007; Dutta *et al.*, 2014). Remodelleerijate lokaliseerumine genoomile on vahendatud geenispetsiifiliste aktivaatorite poolt, mille seondumine DNA-le on omakorda sõltuvuses kromatiini remodelleerimisest (Martens ja Winston, 2003). Remodelleerimiskomplekside funktsioonis ja ka subühikulises koosseisus esineb sarnasusi, ent nende ülesandeks on reguleerida eri kromatiinipiirkondi ja täita seal spetsiifilisi ülesandeid.

RSC ja SWI/SNF on mitmekomponentsed remodelleerimiskompleksid, mille katalüütiline aktiivsus väljendub DNA translokeerimises ja nukleosoomide eemaldamises (Martens ja Winston, 2003). RSC lokaliseerub laiemale spektrile geenidele, esinedes intergeensetel aladel ja promootoritel, mitte kodeerivatel regioonidel (Ng *et al.*, 2002; Cairns *et al.*, 1996). SWI/SNF komplekside konserveerunud subühikud moodustavad kompleksi südamiku, millega võib seonduda täiendavaid spetsiifilisi komponente. Tänu sellele komplekteeritakse unikaalseid funktsioone täitvaid SWI/SNF kompleksi variante ja tagatakse geenispetsiifiline aktivatsiooni ja repressiooni muster.

1.2 RNA polümeraas II

RNA polümeraas II (Pol II) on üks kolmest eukarüootsest RNA polümeraasist, mille funktsiooniks on ühe DNA ahelaga komplementaarse RNA-molekuli sünteesimine. Pol II transkribeerib kõigis rakkudes valke kodeerivaid geene. Ensüüm suudab lahti harutada DNA kaksikheeliksi, polümeriseerida RNA-d ja omab korrektsioonilist ehk redigeerimisaktiivsust (*proofreading*). Transkriptsioonil osalevad lisaks valgulised kofaktorid, mis tagavad polümeraasi seondumise promootoriga ja vahendavad regulatoorseid signaale (Kaplan, 2013).

Pagaripärmi RNA polümeraas II on 550 kDa suurune ensüüm ning see koosneb 12 subühikust, mis kannavad alates suurimast nimetusi Rpb1-Rpb12. Polümeraasi pind on negatiivselt laetud ja ensüümi sisemuses on ühtlaselt positiivse laenguga vooderdatud DNA sisenemiseks vajalik lõhe kuni aktiivtsentrini, samuti RNA väljumistunnel. Polümeraasidele iseloomulikuna paiknevad katalüütilise tsentri lähedal kaks metalliooni (Mg^{2+}), mis stabiliseerivad fosfodietersideme loomist, orienteerides transkripti 3'-hüdoksüülrühma ja ahelasse lisanduvate nukleotiidide kolme fosfaatrühma negatiivseid laenguid (Cramer, 2001; Gnatt, 2001; Cramer *et al.*, 2000).

Ühe olulise struktuurina on efektiivse polümerisatsiooni ja korrektsioonilise aktiivsuse vahendajaks Rpb1 *trigger-loop*-domeen (TL), mis on konserveerunud osaks mitmetes prokarüootsetes ja eukarüootsetes RNA polümeraasides. TL-domeenil on mitmeid konformatsioone, avades ja sulgedes ligipääsu polümeraasi aktiivsaidile ja vahendades üleminekuid protsessiivselt sünteesilt seiskumiseni (Kaplan ja Kornberg, 2008; Cramer *et al.*, 2000). Läbi interaktsioonide substraatidega, osaleb TL valepaardumiste äratundmises ja 2'-dNTP-de eristamises NTP-dest. Sünteesivigade või DNA kahjustuste korral peab polümeraas DNA-l translokeeruma, s.t tagurdama. TL-domeenist sõltumatult realiseerub redigeerimisaktiivsus tänu polümeraasiga seondunud elongatsioonifaktorile TFIIS, mis samuti stimuleerib translokatsiooni DNA-l ning sideme katkestamist ahelasse lisatud nukleotiidiga (Čabart *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2006; Kaplan ja Kornberg, 2008; Sydow ja Cramer, 2009).

Subühikud Rpb4 ja Rpb7 moodustavad heterodimeeri, mis on oluline transkriptsiooni initsiatsioonil. Kuna Rpb4-Rpb7 heterodimeer võib pärast initsiatsiooni dissotsieeruda ülejäänud kompleksi küljest, võib seda lugeda põhiliseks transkriptsioonifaktoriks või transkriptsiooniliseks koaktivaatoriks. Elongatsioonifaasis toimivad 10- ja 12-subühikuline polümeraas võrdse edukusega. Rpb4-Rpb7 dimeer liigub tuuma ja tsütoplasma vahel. Tsütoplasmas osaleb dimeer peamiste mRNA-de lagundamisradade koosseisus ja läbi

interaktsiooni translatsiooni initsiatsioonifaktoriga on ühendavaks lüliks transkriptsiooni ja translatsiooni vahel (Bushnell ja Kornberg, 2003; Harel-Sharvit *et al.*, 2010).

Subühikud Rpb1, Rpb5 ja Rpb9 moodustavad polümeraasi lõua (*jaws*), mis on mobiilne ja võimeline DNA-d haarama. Alalõua liikumisvõime on vahendatud Rpb5 poolt. Rpb5 sisaldab konserveerunud DNA-ga interakteeruvaid proliinjääke, mis võivad soodustada DNA roteerumist ja lahtikeerdumist aktiivtsentrisuunalisel liikumisel. Ülalõug (Rpb1 ja Rpb9) haarab DNA-d ja suunab selle Rpb1-Rpb2 poolt vooderdatud lõhesse (Cramer *et al.*, 2000). Mutatsioonid Rpb9 järjestuses toovad kaasa ebaspetsiifika transkriptsiooni algussaidi (TSS) valimisel, mis näitab Rpb9-DNA vahelise interaktsiooni olulisust transkriptsiooni efektiivsel initsiatsioonil (Sun *et al.*, 1996; Nesser *et al.*, 2006).

Oluliseks struktuurseks elemendiks on klamber (*clamp*), mis piirab ühest küljest polümeraasi keskset lõhet ning osaleb aktiivtsentri läheduses interaktsioonides nii DNA kui ka DNA-RNA hübriidahelaga. Klamber esineb kahes konformatsioonis, avades ja sulgedes lõhet. Sulgumine ümber DNA tagab transkriptsioonikompleksi stabiilsuse ja kõrge protsessiivsuse. Transkribeeriva polümeraasi sees toimub DNA ahelate lokaalne lahtisulamine ning 8-9 aluspaari pikkuse DNA-RNA hübriidahela moodustumine. Klamber ääristab sünteesitava RNA väljumistunnelit, mis paikneb siseneva DNA telje suhtes nurga all. Klambri sulgumine ümber DNA laiendab vagu väljuva RNA jaoks, kusjuures RNA seondumine vakku takistab klambri avanemist (Cramer *et al.*, 2000; Kaplan ja Kornberg, 2008).

Transkriptsiooni alguses toimub abortatiivne tsükkel, mille käigus vabaneb mitmeid lühikesi transkripte. Transkriptsiooni jätkumiseks tuleb ületada kümne sünteesitud nukleotiidi piir ning kui transkript on pikenenud 20 nukleotiidini, võib transkriptsioonikompleksi lugeda stabiilseks. Esimese 10 nukleotiidi barjäär vastab hetkele, kui sünteesitava transkripti 5'-ots eemaldub DNA-RNA dupleksist ja jõuab RNA väljumistunnelisse. Täieliku stabiilsuse on saavutanud 20-nukleotiidne transkript, mis sellises pikkuses täidab ensüümi sees paikneva vao täies ulatuses (Cramer *et al.*, 2000).

Pol II transkriptsiooni regulatsioonis on olulise funktsiooniga Rpb1 C-terminaalne domeen (CTD), mis koosneb korduvast aminohappejääkide konsensusmotiivist YSPTSPS, mille kordusi esineb sõltuvalt organismist 26-52 (pärnis 26, inimeses 52). CTD osaleb transkriptsiooni etappide koordineerimises, olles seondumiskohaks näiteks kofaktoritele, reparatsioonivalkudele, RNA protsessimist teostavatele faktoritele ja kromatiini remodelleerijatele. Transkriptsiooni käigus toimub CTD posttranslatsiooniline

fosforüleerimine teatud aminohappejääkidel, mis loob etapispetsiifilise modifikatsioonide kodeeringu ja signaliseerib õigete faktorite seondumist (Hsin ja Manley, 2012). Initsiatsiooniks on vajalik defosforüleeritud CTD, siis toimub seondumine mediaatorkompleksiga ja transkriptsiooni preinitsiatsioonikompleksi moodustumine. Efektive initsiatsiooni järel algab järk-järguline fosforüleerimine seriinidel, türosiinidel ja treoniinidel. Hüperfosforüleeritud CTD-le seonduvad elongatsioonis osalevad faktorid, mille interaktsiooni tagajärjel vabaneb polümeraas promootorilt ja toimub üleminek protsessiivseks elongatsiooniks. Järgmise transkriptsioonitsükli initsieerimiseks toimub CTD defosforüleerimine (Buratowski, 2009; Cho *et al.*, 1997; Stiller *et al.*, 2000).

1.2.1 Rpb9 roll transkriptsioonis

Pagaripärmi Pol II subühik Rpb9 on 122 aminohappejäägist koosnev valk, mille puudumine pole surmav, kuid põhjustab optimaalsetes tingimustes rakkude aeglast kasvu. Rpb9 sisaldab kahte Zn-iooni siduvat domeeni, mida ühendab *linker*-regioon. N-terminaalne domeen (Zn1) moodustab osa tunnelist, mille kaudu siseneb DNA polümeraasi tsentrisse. C-terminaalne Zn-domeen (Zn2) interakteerub aktiivtsentri läheduses paikneva pooriga, kust polümeraasi seiskumisel väljub transkripti 3'-ots. Nende interaktsioonide kaudu võib Rpb9 osaleda Pol II korrektsioonilises aktiivsuses ja RNA polümerisatsiooni efektiivsuses (Nesser *et al.*, 2006; Walmacq *et al.*, 2009). Seega osaleb Rpb9 Pol II funktsionaalsuses nii transkriptsiooni initsiatsiooni kui ka elongatsiooni tasandil.

Pagaripärmis paikneb transkriptsiooni algussait vahemikus 45-120 aluspaari TATA-elementist allavoolu (3'-suunas), erinevalt kõrgematest eukarüootidest, kus initsiatsioon algab diskreetsest TATA-st 25-30 bp kaugusel paiknevast saidist. TSS määratlemisel osalevad mitmed faktorid, millest kriitilise tähtsusega on RNA Pol II ja TFIIB. Kui TFIIF seondub polümeraasiga, katab TFIIF suure osa polümeraasist allavoolu jäävast promootorist. Seega võib tänu TFIIF-le olla tagatud TATA-st kaugele allavoolu jäävate TSS-ide ülesleidmine ja kasutamine pärmis. Rpb9 Zn1-domeeni muteerimisel või kogu valgu deleteerimisel on tulemuseks fenotüüp, milles transkriptsiooniline aktiivsus on võrreldav metsiktüüpi rakkudega, ent iseloomulikuks kõrvalekaldeks on TSS nihkumine ülesvoolu (5'-suunas) normaalsest alguspunktist. Uurides preinitsiatsioonikompleksi moodustumist *in vitro* leiti, et Rpb9 deletsiooniga polümeraas suudab moodustada TBP-TFIIB-PoIII-DNA kompleksi, kuid järgnevas etapis ei suuda tagada kompleksi TBP-TFIIB-TFIIF-PoIII-DNA formeerumist. Rpb9 võib vahendada TFIIF ja polümeraasi interaktsioone, osaledes seeläbi TSS valimisel. Pol II skanneerib promootorit võimalike algussaitide suhtes ja Rpb9-

vahendatud TFIIF signaali puudumisel initsieeritakse transkriptsioon TATA-elementide lähedal paiknevates saitides (Hull *et al.*, 1995; Ziegler *et al.*, 2003; Furter-Graves *et al.*, 1991; Furter-Graves *et al.*, 1994).

Pol II redigeerimismehhanism väljendub 3'-5'-ribonukleaases aktiivsuses, mis suudab katkestada sideme RNA-ahelasse lisatud vale nukleotiidiga. Vale nukleotiidi lülitamine transkripti koosseisu põhjustab polümeraasi seiskumise. Pol II-ga seondunud elongatsioonifaktor TFIIS stimuleerib ensüümi ribonukleaasset aktiivsust ja polümerisatsiooni jätkamist ning on näidatud Rpb9 vajalikkust TFIIS-i optimaalseks funktsioneerimiseks selles protsessis. TFIIS-i interaktsioon sünteesitava RNA-ga toimub läbi sellesama struktuurse poori, millest osa moodustab Rpb9 Zn2-domeen (Malagon *et al.*, 2004; Jeon ja Agarwal, 1996; Nesser *et al.*, 2006). Ka teistes raku RNA polümeraasides esineb Rpb9-le homoloogilisi subühikuid (Pol I C11, Pol III A12.2), mis on hädavajalikud nende polümeraaside nukleaaseks aktiivsuseks, võimaldades oletada Rpb9 samalaadset osalust Pol II transkriptsiooni täpsuses. Kuna Rpb9 Zn2 domeen paikneb *trigger-loop*-domeeni läheduses, võib Rpb9 osaleda ka nukleotiidide ahelasse lülitumises, kuid selleks on vajalikud Rpb9 ulatuslikud konformatsioonilised muutused (Walmacq *et al.*, 2009).

1.3 Valke kodeerivate geenide transkriptsioon

Transkriptsioon on fundamentaalne rakuline protsess, mille käigus DNA-sõltuv RNA polümeraas sünteesib DNA ühele ahelale komplementaarse RNA molekuli. Geenide transkribeerimine on esimene etapp nende avaldumises. Transkriptsiooni võib jagada kolmeks etapiks – initsiatsioon, elongatsioon (ahela pikendamine), terminatsioon. Eukarüootne transkriptsioon vajab toimumiseks transkriptsioonifaktorite osalust. Transkriptsioonifaktorid on valgud, mis seonduvad järjestusspetsiifiliselt DNA-ga ja reguleerivad geenide transkribeerimise määra. Transkriptsioonifaktorid vahendavad rakutüübi- ja arenguetapispetsiifiliste geenide avaldumismustreid. Põhilisteks transkriptsioonifaktoriteks (*general transcription factors*, GTF) loetakse kuut valgukompleksi – TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIF, TFIIE, TFIIH. Nende interakteerumine promotori ja Pol II-ga on minimaalselt vajalik produktiivse transkriptsiooni initsieerimiseks kõigi Pol II poolt transkribeeritavate geenide puhul.

1.3.1 Preinitsiatsioonikompleksi moodustumine

Preinitsiatsioonikompleks (PIC) on transkriptsiooni initsiatsiooni eel promootoralale moodustuv multiproteiinne kompleks, mis koosneb RNA polümeraasist, põhilistest transkriptsioonifaktoritest ja mediaatorist (Grünberg *et al.*, 2012).

TFIID on esimene promootoriga seonduv transkriptsioonifaktor. TFIID on multiproteiinne kompleks, mis sisaldab TATA-seoselist valku ehk TBP-d ja sellega assotsieeruvaid faktoreid ehk Taf-valke (*TBP associated factors*, TAFs). TBP on sadulataolise struktuuriga ja seondumisel TATA-lemendile põhjustab DNA paindumise 90-kraadise nurga all. Promootorid sisaldavad alati mitmeid konsensuslemente ning nende kaudu on vahendatud transkriptsiooni initsiatsiooni efektiivsus. Genoomiülesed uuringud pärmis on näidanud, et TBP seondumine DNA-ga toimub ka TATA-lemendita promootoritel. Seal identifitseeriti TATA-sarnased järjestused, mis on piisavad TBP seondumiseks. Seega on initsiatsioonikompleksi ehitus sarnane kõigil promootoritel olenemata TATA-lemendi olemasolust. Kuid transkriptsiooni täpseks positsioneerimiseks on sellistel promootoritel vaja lisaks täiendavaid DNA-elemente (Rhee ja Pugh, 2012; Chasman *et al.*, 1993).

Taf-valke leidub eukarüootides kuni 15 (inimeses 13, pärmis 14). Taf-valkude rohkus võimaldab luua rakutüübispetsiifilisi alternatiivseid TFIID-komplekse, mis ekspresseerivad kindlaid geenikomplekte. Taf-valgud tunnevad ära mitmeid promootori järjestuselemente ja aitavad määrata transkriptsiooni algussaiti. Mitmete Taf-valkude järjestustes leidub sarnasusi nukleosoomi moodustavate histoonidega, kusjuures on selliseid homoloogiaid kirjeldatud nii pärmis, äädikakärbsel kui ka inimesel. Tänu sellele omavad need Taf-valgud ka kromatiini modifitseerimise funktsiooni (Green, 2000).

TFIIA seondub PIC-ga tänu valk-valk interaktsioonidele TFIIA ja TBP vahel. TFIIA seondumine toimub pärast TBP poolt indutseeritud DNA konformatsioonilisi muutusi. TFIIA kontakteerub DNA-ga TATA-TBP seondumiskohast 5'-suunas ja TFIIA afiinsus TBP-DNA suhtes on kõrgem kui vaba TBP jaoks. Erinevate katsesüsteemide põhjal on leitud, et TFIIA mõjutab nii basaalselt kui aktiveeritud transkriptsiooni, kuid peamiseks konsensuslikuks funktsiooniks võib pidada TBP-seoseliste negatiivsete regulaatorite seondumise repressioonimist (Geiger *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 1995).

TFIID-kompleksile järgnevalt seondub TFIIB, mis interakteerub TATA-järjestusega külgnevate aladega, kui seal leidub TFIIB poolt äratuntav element ehk BRE (*TFIIB recognition element*). TFIIB seondub aminoterminaalise domeeni abil polümeraasiga ning C-

terminaalse domeeni vahendusel DNA ja TBP-ga. See interaktsioon tagab initsiatsioonikompleksi õige orientatsiooni DNA suhtes (Hahn, 2004). TFIIB osaleb TSS valikul ja stabiliseerib avatud kompleksi teket (Kostrewa *et al.*, 2009).

TFIIF moodustab Pol II-ga stabiilse kompleksi, mis seejärel seondub promootorile. TFIIF on heterodimeerne valk (subühikud Tfg1, Tfg2 pärmis; Rap74, Rap30 inimeses), mille seondumine polümeraasiga hõlmab ensüümi 50% ulatuses. Pämirakkudes leidub kompleksil ka kolmas subühik (Tfg3 ehk Taf14), mis ei ole TFIIF funktsioneerimiseks hädavajalik ja mis kuulub lisaks mitmete teiste komplekside koosseisu. TFIIF hoiab ära mittespetsiifilisi interaktsioone polümeraasi ja DNA vahel ning stabiliseerib TFIIB-d (Eichner *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010). TFIIF on oluline transkriptsiooni algussaidi valikul ning PIC avatud konformatsiooni moodustumisel. On leitud, et TFIIF supresseerib abortatiivseid transkriptsioonitsükleid ja seega suurendab Pol II protsessiivsust varases elongatsioonis (Luse, 2013; Yan *et al.*, 1999).

TFIIE on heterodimeerne valk, mis interakteerub Pol II, DNA ja TFIIH-ga. TFIIE loob kontakti RNA polümeraasiga klambri läheduses ning seondub β subühiku abil promootoriga (Grünberg *et al.*, 2012). TFIIE seondumine toimub initsiatsiooni hilises etapis ja vahendab TFIIH-poolset DNA ahelate lahtisulatamist ning avatud kompleksi tekkimist (Tanaka *et al.*, 2009). TFIIE α subühik stimuleerib TFIIH-vahendatud Pol II C-terminaalse domeeni fosforüleerimist, mis on oluline üleminekuks elongatsioonifaasi (Ohkuma *et al.*, 1995).

TFIIH kompleks omab kahte erinevat ensümaatilist aktiivsust, sisaldades nii helikaasset kui kinaasset komponenti. TFIIH paikneb polümeraasist eespool, olles kontaktis nii TFIIE kui ka allavoolu jääva promootor-DNA-ga. TFIIH sisaldab koguni kahte helikaasi, mis pärmis kannavad nimesid Ssl2 ja Rad3 (inimeses vastavalt XPB ja XPD). Lisaks kuulub TFIIH koosseisu tsükliin-sõltuv kinaas CDK7, mis teostab polümeraasi CTD spetsiifilist fosforüleerimist. Ssl2 ja Rad3 on ATP-sõltuvad helikaasid; Ssl2 3'→5'-suunaline ning Rad3 5'→3'-suunaline (Guzmán ja Lis, 1999; Spangler *et al.*, 2001). Ssl2 ülesandeks on avatud kompleksi moodustamine promootoril ning DNA suunamine polümeraasi lõhesse. Rad3 võimaldab aga DNA ahelate lahtisulamist reparatsiooniprotsessides (Grünberg *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2000).

1.3.2 Taf14 roll transkriptsioonis

S.cerevisiae TAF14 on üks väheseid intronit sisaldavaid geene pärmis, mis kodeerib 244 aminohappejäagist koosnevat valku Taf14. Geeni TAF14 deleteerimine ei ole letaalne, kuid

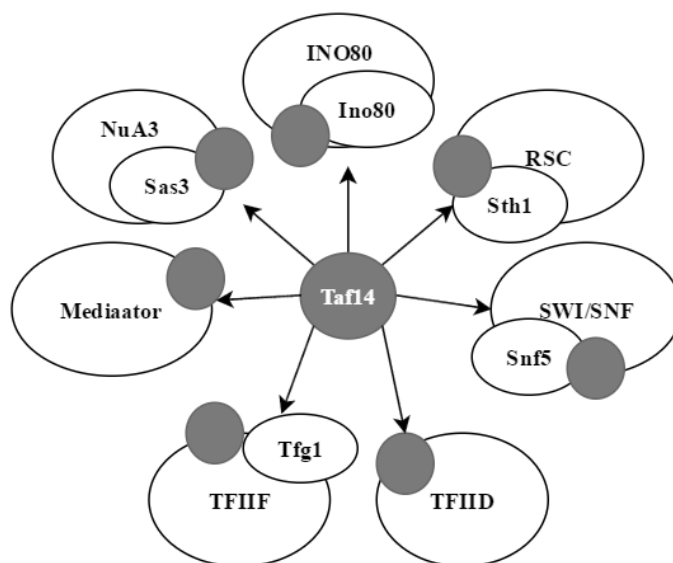
piirab rakkude eluvõimet, põhjustades temperatuuritundlikkust. Taf14 stimuleerib transkriptsiooni nii basaalsel kui aktiveeritud tasemel, olles kontaktis mitmete oluliste faktoritega. Transkriptsiooni initsiatsioon osaleb Taf14 nii TFIID kui ka TFIIF koosseisus (Lynn Henry *et al.*, 1994). Lisaks assotsieerub Taf14 transkriptsioonilise tähtsusega kromatiini remodelleerivate valkkompleksidega, näiteks RSC, INO80, SWI/SNF-ga ning histoonide atsetüültransferaasi NuA3-ga (Joonis 1) (Kabani *et al.*, 2005; Cairns *et al.*, 1996; John *et al.*, 2000).

Taf14 N-terminaalses osas paikneb eukariootides konserveerunud YEATS-domeen (8.-115. aminohappejääk), mille abil toimub seondumine atsetüleeritud lüsiinidega. Täpsemalt on näidatud Taf14 YEATS-domeeni olulist rolli H3K9 atsetüülühema äratundmisel, mis on aktiivsete promootorite märgiseks (Shanle *et al.*, 2015). Funktsionaalne osa domeenist moodustub kaheksast β -lehest ja neid ühendavatest lingudest, mis tagavad valgu paindlikkuse. YEATS-domeeni sisaldavate valkude järjestused on divergentsed, sisaldades konserveerunud regioone peamiselt lingude järjestuses, mida võib seega pidada bioloogilist funktsiooni täitvaks osaks. Domeeni pinnale on koondunud negatiivse laenguga aminohapped, mis võivad elektrostaatilise vastasmõju kaudu osaleda valk-valk interaktsioonide loomisel (Schulze *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Shanle *et al.*, 2015).

C-terminaalse regiooni abil assotsieerub Taf14 kõigi mainitud valkkompleksidega. Taf14 interakteerub RSC, INO80 ja NuA3-ga nende komplekside katalüütiliste subühikute (vastavalt Sth1, Ino80 ja Sas3) kaudu (Kabani *et al.*, 2005). Võrreldes Taf14 seondumist TFIIF ja SWI/SNF-ga, ei leidu märgatavat homoloogiat vastavate interaktsioonis osalevate subühikute Tfg1 ja Snf5 järjestustest, mis viitab konkreetse Taf14 seondumismotiivi puudumisele ja seega Taf14 C-terminaalse järjestuse universaalsusele. Taf14 võib komplekside koosseisus assisteerida seondumist RNA polümeraas II-ga või täiendavate kromatiini komponentidega. Teise võimalusena võib Taf14 interakteerumine blokeerida teiste valkude seondumissaite, osaledes seeläbi kompleksidevahelise koostoime reguleerimises (Cairns *et al.*, 1996).

Taf14 roll transkriptsioonis on mitmekülgne. Taf14 osaleb Pol II preinitsiatsioonikompleksi moodustumises ja selle stabiilsuse tagamises, kuivõrd Taf14 puudumine põhjustab PIC-i ebastabiilsust ja temperatuuritundlikkust. Kontakteerumine remodelleerimiskomplekside katalüütiliste subühikutega võib määrata Taf14 rolli nende komplekside aktiivsuse reguleerijana (Kabani *et al.*, 2005) nii transkriptsioonil kui ka teistes protsessides (nt DNA reparatsioon) (Shanle *et al.*, 2015). Läbi kõigi interaktsioonide toimib Taf14

transkriptsioonilise kofaktorina, mille puudumine ei ole letaalne, ent mille abil on tagatud transkriptsioonimehhanismide terviklikkus.



Joonis 1. Taf14 osalemine erinevates valgukompleksides. Skeemil on kujutatud kromatiini remodelleerimiskompleksid INO80, RSC ja SWI/SNF, transkriptsioonifaktorid TFIIF ja TFIID, mediaatorkompleks ning histooni atsetültransferaas NuA3. Välja on toodud komplekside need subühikud, millega Taf14 interakteerub. Joonis ei väljenda komplekside tegelikku suurust.

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks oli:

1. Valmistada transkriptsiooni initsiatsiooniks olulisi geene *RPB1*, *RBP2*, *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* ekspresseerivad plasmiidid.
2. Koostada katsesüsteem, kus nende geenide genoomsed koopiad on deleteeritud ning metsiktüüpi geenikoopia ekspresseerub plasmiidilt. Katsesüsteemi saab rakendada nendesse geenidesse mutatsioonide sisseviimiseks ja nende mõju uurimiseks.
3. Uurida valgu Taf14 C- ja N-terminaalsete domeenide individuaalset mõju RNA polümeraas II subühiku Rpb9 deletsiooniga pärmitüves.

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Kasutatud söötmed

S.cerevisiae tüved olid kasvatatud YPD (*yeast extract, peptone, dextrose*) tard- ja vedelsöötmes. Tardsöötme koostis: agar 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l, glükoos 20 g/l. Vedelsöötme koostis: pärmiekstrakt 10 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l, glükoos 20 g/l.

Geenide deletsioone kontrolliti G418 (*geneticin*) (200 µg/ml) sisaldaval YPD tardsöötmel. *Taf14* ja *rpb9* kombineeritud deletsiooni kontrolliti antibiootikume G418 (200 µg/ml) ja NAT-i (*nourseothricin*) (100 µg/ml) sisaldaval YPD tardsöötmel.

Sporulatsiooniks kasvatati pärmirakke toitainetevaesel sporulatsioonisöötmel [glükoos 0,5 g/l, pärmiekstrakt 1 g/l, kaaliumatsetaat 10 g/l, agar 20 g/l, lämmastikalused ja aminohapped – adeniin 10 µg/ml, uratsiil 10 µg/ml, histidiin 10 µg/ml, trüptofaan 10 µg/ml, leutsiin 20 µg/ml, lüsiin 20 µg/ml].

URA3 markergeeni puudumise kontrollimiseks kasvatati rakke 5-fluoro-oroothapet (5-FOA) sisaldaval selektiivsöötmel [5-FOA 1 mg/ml, YNB (*Yeast nitrogen base*) 6,7 g/l, agar 2%, glükoos 2%, lämmastikalused ja aminohapped – adeniin 20 µg/ml, uratsiil 20 µg/ml, histidiin 40 µg/ml, trüptofaan 40 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, lüsiin 80 µg/ml].

Modifitseeritud tüvede jaoks valmistati selektiivsöötmel [agar 20 g/l, YNB 6,7 g/l, glükoos 20 g/l, adeniin 20 µg/ml, uratsiil 20 µg/ml, trüptofaan 40 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, lüsiin 80 µg/ml], jättes koostisest välja need aminohapped või lämmastikalused, mille alusel tüvesid selekteeriti.

Valmistatud plasmiidid amplifitseeriti kasutades *E.coli* bakteritüve DH5α, mida kasvatati LB (*lysogeny broth*) vedelsöötmes [trüpton 10 g/l, pärmiekstrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l], kuhu lisati antibiootikumi ampitsilliin (100 µg/ml). Tardsöötme valmistamiseks lisati eelnevale 2 %-line agar.

2.2.2 Kasutatud pärmitüved

Kõigi töös kasutatud ja töö käigus valmistatud pärmitüvede genotüübid ja nende päritolu on täpsustatud Lisas 1.

Selles töös kasutatud pärmitüved on valmistatud tüve W303 baasil (Thomas ja Rothstein, 1989). Kasutati pärmitüve AKY200, mille põhjal valmistati deletsioonitüvede süsteem *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* geenide jaoks, milles vastavad geenikoopiad olid asendatud kanMX geenikassetiga, mis tagab rakkudele antibiootikumi G418 resistentsuse.

Kasutati meie laboris valmistatud pärmitüve AKY718, milles *rpb9* oli deleteeritud, asendades see antibiootikumi NAT resistentsusgeeniga.

Tüve AKY718 ristamisel AKY1352-ga valmistati kombineeritud deletsioonitüvi AKY1406, mida kasutati Taf14 mutantide kirjeldamiseks.

2.2.3 Sporulatsioon ja tetraadide analüüs

Diploidse pärmitüve kasvatamisel toitainetevaesel söötmel toimub rakkude sporulatsioon, mille tulemusel valmivad meiosis teel neli spoori. Spooride nelik ehk tetraad sisaldab geneetiliselt erinevaid haploidseid rakke. Analüüsima spooride genotüüpe, eraldati tetraadid mikroskoobi (*Singer Instruments MSM 400*) all, kandes individuaalsed spoorid laiali YPD söötmel. Pärast 2-3-päevast inkubatsiooni 30 °C juures, külvati rakud templikülvi abil selektiivsöötmetele, et selgitada saadud pärmitüvede genotüüpe.

2.2.4 Plasmiidide valmistamine

Töös kasutatud plasmiidid valmistati pRS413 ja pRS416 seeria plasmiidide põhjal. Neis vektorites on pärmis tsentromeerne järjestus (ARS/CEN), mis võimaldab vektorite replitseerumist pärmirakkudes ja segregatsiooni mitoosis. Lisaks on vektorites *E.coli* replikatsiooni alguspunkt, ampitsilliini resistentsusgeen (Amp^r) ja markergeenid – *URA3* pRS416-s, *HIS3* pRS413-s. Kloneerimine viidi läbi *Overlap extension PCR cloning* meetodil (Bryksin ja Matsumura, 2013). Kloneerimiseks disainiti praimeritepaarid, mis seonduvad geeniga külgnevatele aladele ning sisaldavad 5'-otsas 40-50 nukleotiidi pikkusi üleulatuvaid järjestusi, mis on homoloogilised vektoriga (Lisa 2).

Esimesel PCR reaktsioonil amplifitseeriti spetsiaalsete praimeritega pagaripärmis genoomselt DNA-lt sihtmärkgeenid koos promootor- ja terminaatoraladega. PCR reaktsioonimaht oli 50 µl, selles sisaldus 0,3 µM oligonukleotiide, 200 µM dNTP-d, 1x *Phusion Green GC* puhvrit, 3% DMSO-d, 1,2 ng/µl genoomset DNA-d, 0,6 U *Phusion* DNA polümeraasi ning lõppmahuni vett.

Inserdi amplifikatsiooniks kasutati järgmist programmi:

Eeldenaturatsioon:	98 °C, 5 min	} 30 tsükli
Denaturatsioon:	98 °C, 30 s	
Praimerite seondumine:	58 °C, 30 s	
Süntees:	72 °C	
Järelsüntees:	72 °C, 7 min	

Sünteesiaeg määrati arvestades sünteesitava geeni pikkust. Saadud produktist 5 µl kontrolliti agaros-geelelektroforeesil. Ülejäänud sadestati etanooliga ning lahustati 25 µl-s steriilses vees.

Seejärel pandi kokku teine PCR reaktsioon, milles sünteesi praimeriks on eelnevas etapis sünteesitud insert. Inserdi 5'-üleulatuvad järjestused seonduvad vektorile (pRS413/pRS416) ning praimerivad DNA sünteesi, kusjuures ahelaid pikendatakse kogu vektori ulatuses. PCR viidi läbi mahus 50 µl. Sinna lisati 15 µl inserti, 0,6 ng/µl plasmidi, 3% DMSO-d, 1x *Phusion Green GC* puhvrit, 200 µM dNTP-d, 1 U *Phusion* DNA polümeraasi ja vett kuni lõppmahuni.

Reaktsiooni programm:

Eeldenaturatsioon:	99,9 °C, 1 min	} 30 tsükli
Denaturatsioon:	95 °C, 50 s	
Praimerite seondumine:	60 °C, 50 s	
Sünteesiaeg:	68 °C, 12 min	
Järelsüntees:	68 °C, 12 min	

2.2.4.1 DpnI töötlus

Saadud PCR-i produkti töödeldi 10U DpnI restriктаasiga 1 h temperatuuril 37 °C. DpnI töötlustega likvideeritakse lahusest bakteriaalset päritolu plasmiidimolekulid, sest ensüümi substraadiks on neljanukleotiidiline järjestus, mis sisaldab metüleeritud adeniini. Metülatsioon leiab aset bakteriaalse DNA sünteesi järgselt, kuid PCR-l sünteesitud plasmiidil metüleerimisi ei esine.

2.2.4.2 Plasmiidide amplifikatsioon ja puhastamine

Plasmiidid transformeeriti kompetentse *E.coli* tüve DH5 α rakkudesse. Transformatsioonisegu sisaldas 7 μ l DpnI-ga töödeldud PCR produkti ja 95 μ l DH5 α rakke. Segu hoiti 15 min jääl, pärast mida inkubeeriti segu 2 min 42 °C juures. Seejärel lisati 600 μ l LB vedelsöödet ning asetati loksutisse (550 rpm) 45 minutiks temperatuurile 37 °C. Pärast seda tsentrifuugiti rakud 1 min 3300 g-ga, eemaldati supernatant ning külvati ampitsilliini (100 μ g/ml) sisaldavale LB tardsöötmele.

Üleskasvanud kolooniaid kontrolliti PCR-il praimeritega, millest üks seondus vektorile ja teine vektorisse kloneeritud geeni järjestusele. Õigeks osutunud kolooniaid kasvatati 50 ml-s ampitsilliini (100 μ g/ml) sisaldavas LB vedelsöötmes. Plasmiidid eraldati bakterist kasutades *NucleoBond Xtra Midi* (Macherey-Nagel) plasmiidieralduskomplekti vastavalt tootjapoolsetele juhistele.

2.2.5 Deletsioonitüvede valmistamine

Geenide (*RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14*) deleteerimiseks amplifitseeriti p-myc-kanMX plasmiidilt spetsiaalsete praimeritega *kanMX* resistentsusgeen. Reaktsioonis kasutatud praimerid (Lisa 2) seondusid markergeeni sisaldavale plasmiidile, sisaldades 5'-otstes 50 nukleotiidi pikkusi üleulatuvaid järjestusi, mis on homoloogsed märklaudgeeniga külgnevate aladega.

PCR-i reaktsioonimaht oli 50 µl, 0,6 ng/µl p-myc-kanMX plasmidi, 0,5 µM oligonukleotiide, 1x FIREPol® *MasterMix* ning lõppmahuni vett.

Markergeeni amplifikatsiooniks kasutati programmi:

Eeldenaturatsioon:	95 °C, 5 min	} 30 tsüklit
Denaturatsioon:	95 °C, 30 s	
Praimerite seondumine:	58 °C, 30 s	
Sünteesiaeg:	72 °C, 2 min 15 s	
Järelsüntees:	72 °C, 7 min	

Saadud produktist 5 µl kontrolliti agaros-geelelektroforeesil, ülejäänud sadestati etanooliga ning lahustati 25µl-s vees.

2.2.5.1 Pärmis elektroporatsioon

Genoomseks deletsiooniks viidi elektroporatsiooni teel rakkudesse eelpool kirjeldatud markergeenikonstrukt, mille otstesse olid sünteesitud sihtmärkgeenidega 50 aluspaari ulatuses külgnevad alad. Raku homoloogilise rekombinatsiooni mehhanismid tunnevad sisestatud DNA-molekuli ära kui DNA kaheaheelalise katke. Rekombinatsiooni tulemusel lülitatakse konstrukt genoomi märklaudgeeni asemele. Geenikonstrukt viidi rakkudesse järgnevalt kirjeldatud viisil.

YPD vedelsöötmes kasvatati tüve AKY200 temperatuuril 30 °C tiheduseni 1×10^8 rakku/ml, mida mõõdeti rakuloenduriga (*Z_{TM} COULTER COUNTER® Cell and Particle Counter, Beckman Coulter*). Rakukultuuri tsentrifuugiti 5 min 200 g-ga, eemaldati supernatant. Rakud suspendeeriti 9 ml TE-s, lisati 1 ml 1 M liitiumatsetaati. Rakud jäeti 45 minutiks temperatuurile 30 °C loksuma (100 rpm). Järgnevalt lisati 250 µl 1 M DTT-d (ditiotreitool), loksutati veel 15 min (30 °C) (100 rpm). Seejärel lisati 40 ml vett ja tsentrifuugiti 5 min 200 g-ga. Rakke pesti ja tsentrifuugiti kaks korda 50 ml jääkülma veega, siis suspendeeriti 1 ml-s 1 M jääkülmas sorbitoolis. Edasi tõsteti rakulahus 1,5 ml reaktsioonituubi, tsentrifuugiti 1 min 3300 g-ga. Supernatant eemaldati ja viimast etappi korrati, seejärel lisati 1 M sorbitooli kuni mahuni 200 µl. Elektroporeerimiseks pipeteeriti 35 µl rakke ning 10 µl sadestatud PCR-i produkti 2 mm küveti. Poreerimine teostati elektroporaatoriga (*Bio-Rad Gene Pulser Xcell*), kasutades pärmis elektroporatsiooniks eelseadistatud programmi. Kohe pärast poreerimist lisati rakkudele 1ml 1M sorbitooli ning jäeti 15 minutiks jääle. Rakud tõsteti 1,5 ml reaktsioonituubi, tsentrifuugiti ja eemaldati supernatant kuni mahuni 200 µl ning suspendeeriti. Järgnevalt külvati saadud suspensioon

YPD tardsöötmele. Järgmiseks päevaks tihedaks kasvanud tassidelt tehti templikülv antibiootikumi G418 sisaldavale selektiivsöötmele, inkubeeriti 2 päeva temperatuuril 30 °C.

2.2.5.2 Kolooniade kontrollimine

Antibiootikumiga selektiivtassilt üleskasvanud kolooniatest eraldati DNA ja sihtmärkgeenide deletsioonide olemasolu kontrolliti PCR-ga.

DNA eraldamiseks suspendeeriti kolooniatest võetud rakke 100 µl-s 200 mM liitiumatsetaat + 1% SDS lahuses ning inkubeeriti 15 min 70 °C juures. Suspensioonile lisati 300 µl 96%-list etanooli, segati vorteksil. Järgnevalt tsentrifuugiti saadud suspensioon 3 min 15000 g-ga, eemaldati supernatant. Segu pesti 250 µl 70%-lise etanooliga ja supernatant eemaldati täielikult. Saadud sade lahustati 100 µl-s steriilses vees ning fuugiti 15 s 15000 g-ga (Lööke *et al.*, 2011).

PCR reaktsioonis kasutati markergeeni järjestusele seonduvat oligonukleotiidi FBA1-ctrl-2 ning geenispetsiifilisi praimereid (Lisa 2). PCR reaktsioonimaht oli 10 µl, sisaldades 1 µl rakkudest eraldatud DNA-d, 0,5 µM oligonukleotiide, 1x FIREPol® *MasterMix* ning lõppmahuni vett.

2.2.6 Plasmidi transformeerimine pärmis

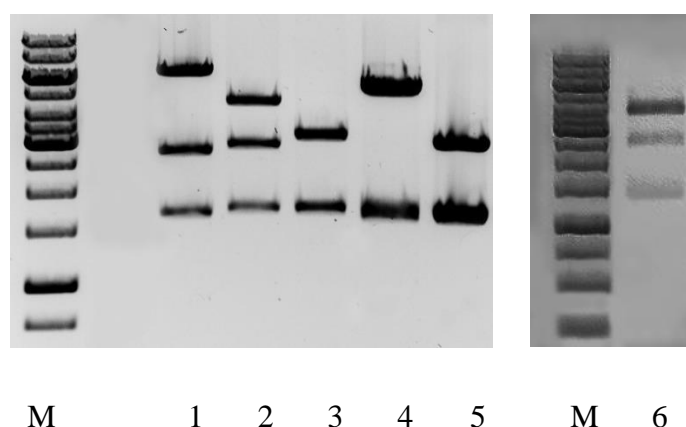
Rakke kasvatati üleöö YPD vedelsöötmes temperatuuril 30 °C tiheduseni 3×10^7 rakku/ml. Kompetentsete rakkude valmistamiseks tsentrifuugiti 2 x 1 ml rakke 3 min 2300 g juures, eemaldati sööde. Rakke pesti 500 µl TE + 0,1 M liitiumatsetaadi lahusega ja tsentrifuugiti 3 min 2300 g-ga. Supernatant eemaldati ja rakud suspendeeriti 40 µl-s TE + 0,1 M liitiumatsetaadi lahuses. Transformatsioonisegu valmistamiseks lisati 50 µl-le kompetentsete rakkude suspensioonile 7 µl eelnevalt denatureeritud (5 min 100 °C) ja jääl jahutatud *carrier-DNA*-d ning 2-3 µg transformeeritavat plasmidi. Segu hoiti 5 min toatemperatuuril. Seejärel lisati 300 µl 0,1 M liitiumatsetaat + TE + 40 % polüetüleenglükooli lahust, segati vorteksil ning hoiti veel 15 min toatemperatuuril. Järgnevalt lisati 30 µl DMSO-d, segati vorteksil ja segu inkubeeriti 10 min 42 °C juures. Rakud tsentrifuugiti 3 min 800 g-ga, eemaldati supernatant ja lahustati 150 µl-s vees. Seejärel plaaditi rakud selektiivsöötmele ja kasvatati 2-4 päeva temperatuuril 30 °C.

2.3 Tulemused

2.3.1 Geenide *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* klonimine pRS416 plasmidi

Töö esimese osana amplifitseeriti PCR-il pagaripärmi genoomselt DNA-lt geenispetsiifiliste praimeritega (Lisa 2) geenid *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* koos promotori- ja terminaatoraladega. Saadud inserdid kontrolliti agarose-gelelektroforeesil ja seejärel klonieeriti need *Overlap Extension PCR Cloning* meetodil *URA3* markergeeniga pRS416 plasmidi. Järgnevalt transformeeriti plasmiidid *E.coli* DH5 α bakteritüvesse, et amplifitseerida plasmiidide koopiaarvu. PCR-il kontrolliti plasmiidide olemasolu bakterikolooniates ja õigeks osutunud kolooniatest eraldati plasmiidid.

Saadud plasmide kontrolliti restriksioonanalüüsil (Joonis 2). Restriktaaside valikul peeti silmas, et vähemalt üks lõikekoht paikneks uuritava geeni järjestuses, kasutades vajadusel mitme ensüümi kombineerimist. pRS416-*RPB1* kontrollimiseks kasutati restriktaasi EcoRV, millega lõikamisel tekkis kolm fragmenti suurustega 6309, 2766 ja 1684 aluspaari. Enüümiga ScaI lõigati pRS416-*RPB2* (produktid: 4467, 2889 ja 1750 ap) ja pRS416-*TAF14* (produktid: 3048, 1750 ja 1675 ap). pRS416-*TFG2* kontrolliti restriktaaside EcoRV ja BglIII-ga, saades fragmendid suurusega 5104 ja 1658 aluspaari. Tühja pRS416 vektorit lõigati ensüümiga ScaI, saades 3148 ja 1750 ap suurused produktid. *TFG1* klonimine õnnestus alles kolmandal katsel, mistõttu on pRS416-*TFG1* restriksioonilist kontrollimist kujutatud erineval gelelektroforeesipildil (Joonis 2). pRS416-*TFG1* lõigati restriktaasidega EagI ja EcoRV, saades 3832, 2552 ja 1400 aluspaari suurused fragmendid.



Joonis 2. Plasmiidide kontrollimine restriksioonanalüüsil. Radadel M on DNA suurusmarker (*GeneRuler 1 kb, Thermo Scientific*). Restriksiooniproduktid: 1. rajal pRS416-*RPB1*/EcoRV; 2. rajal pRS416-*RPB2*/ScaI; 3. rajal vektor pRS416/ScaI; 4. rajal pRS416-*TFG2*/BglIII-EcoRV; 5. rajal pRS416-*TAF14*/ScaI; 6. rajal pRS416-*TFG1*/EagI-EcoRV.

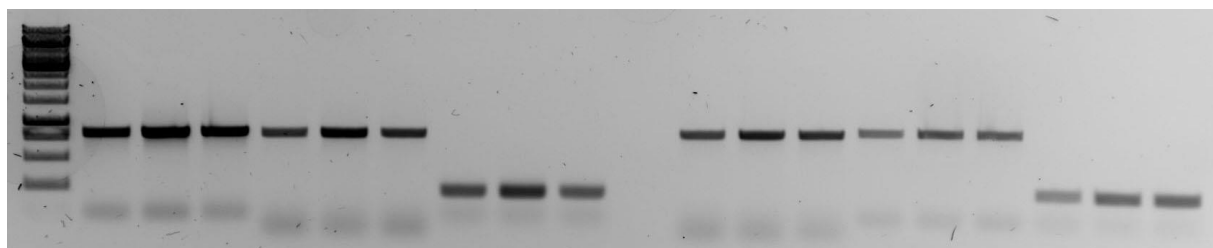
2.3.2 Deletsioonitüvede valmistamine

Järgnevalt on kirjeldatud geenide *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* genoomsete deletsioonide sisseviimine pärmirakkudesse. Kuna *RPB1*, *RPB2*, *TFG1* ja *TFG2* puudumine on letaalne, kasutati deletsioonideks diploidset pärmitüve AKY200 (Lisa 1), mis on pärit meie labori pärmitüvede kollektsioonist. Nendes genoomsetes lookustes asendati märklaudgeeni üks kromosomaalne geenikoopia *kanMX* resistentsuskassetiga, mis annab eukarüootsetele rakkudele resistentsuse kanamütsiini analoogile G418. Pärast markergeenikonstrukti rakkudesse viimist, selekteeriti rakke G418 sisaldaval YPD söötmel. Üleskasvanud kolooniatest valiti 1-3, milles geenide deletsioone kontrolliti PCR-il selliste praimeritega (Lisa 2), millest üks seondub integreerunud markergeenijärjestusele ja teine seondub genoomsele järjestusele.

RPB1 ja *RPB2* deletsioonide kontrollimisel koostati kolm PCR reaktsiooni (Joonis 3). Esimeses reaktsioonis amplifitseeriti kolmest oletatava *RPB2* deletsiooniga kolooniast eraldatud DNA-d *RPB2* kodeerivasse alasse seonduvate praimeritega RPB2-1-F ja RPB2-1-R (Lisa 2), saades produktiks 820 aluspaari pikkuse fragmendi. Kuna deletsioon viidi sisse diploidseesse tüvesse, kinnitavad saadud PCR produktid *RPB2* olemasolu ühel kromosoomil. Teises reaktsioonis kasutati primereid RPB1-1-F ja RPB1-1-R. Kolmas reaktsioon viidi läbi praimeritega FBA1-ctrl-2 ning RPB2-1-F, saadud 220 aluspaari pikkune produkt kinnitab *RPB2* deletsiooni diploidi teisel kromosoomil. *RPB1* deletsiooni kontrollimiseks eraldati DNA kolmest kolooniast ja koostati samalaadsed reaktsioonid. Esimesel reaktsioonil *RPB1* kodeerivale järjestusele seonduvate praimeritega RPB1-1-F ja RPB1-1-R näitab 800 bp pikkune fragment *RPB1* olemasolu ühel kromosoomil. Teine reaktsioon viidi läbi praimeritega RPB2-1-F ja RPB2-1-R. Kolmas reaktsioon viidi läbi praimeritega FBA1-ctrl-2 ja RPB1-1-F ja saadud 220 aluspaari pikkused fragmendid kinnitavad *RPB1* deletsiooni teisel kromosoomil.

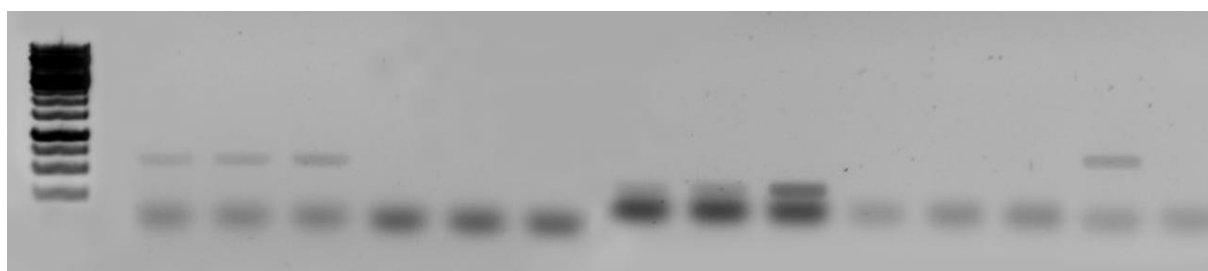
Joonisel 4 on kujutatud *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* deletsioonide kontrollimist. Kolmest kolooniast eraldati DNA ja kontrolliti *TFG1* deletsiooni PCR-il praimeritega TFG1-KO-CTRL ja FBA1-ctrl-2, mis deletsiooni olemasolul kajastub 540 aluspaari suuruse produktina. Negatiivseks kontrolliks amplifitseeriti samade praimeritega selliste kolooniate DNA-d, millesse deletsiooni ei olnud sisse viidud. *TFG2* deletsiooni kontrollimiseks eraldati kolmest kolooniast DNA, mida amplifitseeriti PCR-il praimeritega TFG2-1-F ja FBA1-ctrl-2, seejuures deletsiooni kinnitab 220 aluspaari suurune PCR produkt. Negatiivseks kontrollreaktsiooniks kasutati samu primereid, amplifitseerides sellistest kolooniatest

eraldatud DNA-d, kuhu deletsiooni ei olnud sisse viidud. *TAF14* deletsiooni kontrolliti ühes koloonias PCR-reaktsioonil praimeritega FBA1-ctrl-2 ja TAF14-KO-CTRL ning deletsiooni kinnitab saadud 550 aluspaari suurune fragment. Negatiivse kontrollina amplifitseeriti neid primereid kasutades deletsioonita kolooniast eraldatud DNA-d.



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Joonis 3. *RPB1* ja *RPB2* deletsioonide kontrollimine. Rajal M on DNA suurusmarker (*GeneRuler 1 kb, Thermo Scientific*). Radadel 1-9 kontroll *RPB2* deletsiooniga kolmele kolooniale: rajad 1-3 kujutavad esimest reaktsiooni (*RPB2-1-F* ja *RPB2-1-R*); rajad 4-6 kujutavad teist reaktsiooni (*RPB1-1-F* ja *RPB1-1-R*); kolmas reaktsioon (*FBA1-ctrl-2* ja *RPB2-1-F*) radadel 7-9, kus *RPB2* deletsiooni kinnitavad 220 ap pikkused fragmendid. Radadel 10-18 kontroll *RPB1* deletsiooniga kolmele kolooniale: rajad 10-12 kujutavad esimest reaktsiooni (*RPB1-1-F* ja *RPB1-1-R*); rajad 13-15 kujutavad teist reaktsiooni (*RPB2-1-F* ja *RPB2-1-R*); kolmas reaktsioon (*FBA1-ctrl-2* ja *RPB1-1-F*) radadel 16-18, kus *RPB1* deletsiooni kinnitavad 220 ap pikkused fragmendid.



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Joonis 4. *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* deletsioonide kontrollimine. Rajal M on DNA suurusmarker (*GeneRuler 1 kb, Thermo Scientific*). Radadel 1-3 on näidatud *TFG1* deletsiooni 540 ap pikkuse fragmendi näol kolmes uuritud koloonias, radadel 4-6 on negatiivne kontroll. Radadel 7-9 kinnitab kolmes koloonias *TFG2* deletsiooni 220 ap pikkune PCR-i fragment; rajad 10-12 kujutavad negatiivset kontrolli. Rajal 13 on kujutatud ühe koloonia *TAF14* deletsiooni 550 ap pikkuse fragmendina; rajal 14 on negatiivne kontroll.

Kontrollitud kolooniatest valiti iga geeni jaoks üks, millesse transformeeriti vastavat metsiktüüpi geeni kodeeriv pRS416 seeria plasmid. Seejärel külvati rakud sporulatsioonisöötmele, kuhu ei olnud lisatud uratsiili, tagamaks plasmidide püsimist rakkudes. Sporuleerumisel moodustusid individuaalsetest rakkudest meiotilisel teel neli spoori. Vastavalt pRS416 plasmidide koopiaarvule diploidis, võis plasmidi jaotumine spooride vahel varieeruda. Seejuures *RPB1*, *RPB2*, *TFG1* või *TFG2* genoomse deletsiooniga raku eluvõime tagamiseks on metsiktüüpi geeni ekspresseeriva plasmidi sisaldumine hädavajalik. Rakke selekteeriti uratsiilita söötmel, näitamaks pRS416 plasmidi olemasolu, ning G418 sisaldaval söötmel, kinnitamaks uuritud geenide genoomsete deletsioonide olemasolu.

Tulemusena saadi geenide *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* genoomsete deletsioonidega pärmitüved mõlemast paardumistüübist (kokku 10 pärmitüve), mis sisaldasid metsiktüüpi gene ekspresseerivaid plasmide (Lisa 1). Valmistatud *TAF14* deletsiooniga tüve AKY1352 kasutati Taf14 deletsioonimutantide konstrueerimiseks, et selgitada Taf14 sisalduva YEATS-domeeni rolli *taf14Δ* fenotüübi kujunemisel. Teisi valmistatud pärmitüvesid plaanitakse kasutada edasises uurimistöös.

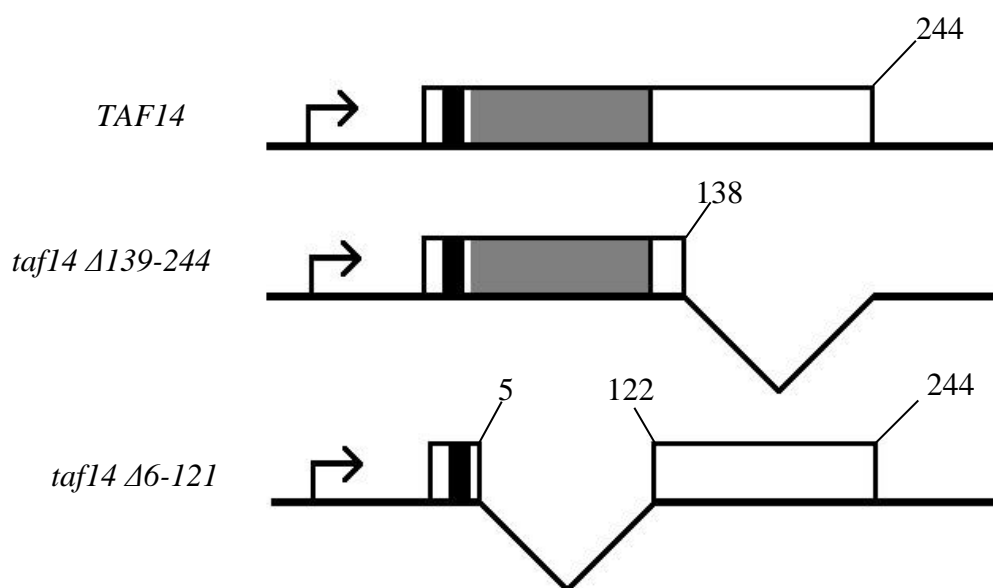
2.3.3 Taf14 mutantide konstrueerimine ja kirjeldamine

Selle töö üheks eesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutab Taf14 N- või C-terminaalse regiooni ekspressioon rakkude kasvu ning kas kumbki mutatsioon suudab kompenseerida *TAF14* deletsioonist tuleneva letaalsuse *rpb9Δ* pärmitüves. Esmalt valmistati PCR-i abil N- ja C-terminaalseid osi kodeerivad geenikonstruktid, mis seejärel kloneeriti *HIS3* markergeeni sisaldavasse pRS413 plasmidi. Et vältida valguosade ekspressioonis kõrvalisi efekte, säilitati *TAF14* geeni promootor- ja terminaatorala ning 3. ja 4. aminohappekoodoni vahel paiknev intron.

N-terminaalse regiooni valmistamiseks konstrueeriti 139. positsiooni stoppkoodon. Inseti saamiseks amplifitseeriti geeni kahes osas. Praimeritepaari TAF14-stop139-F ja pRS-TAF14-SacI-R (Lisa 2) abil sünteesiti geeni terminaatorala, teises reaktsioonis kasutati primereid pRS-TAF14-NotI-F ja TAF14-Stop139-R (Lisa 2), mille abil sünteesiti promootor ja kodeeriv ala kuni 138. koodonini. Järgnevalt võeti reaktsiooni eelmises etapis saadud PCR produktid ning kasutades primereid pRS-TAF14-NotI-F ja pRS-TAF14-SacI-R, sünteesiti täispikk variant Taf14 N-terminaalsest osast. C-terminuse jaoks disainiti primereid TAF14-del-6-121-F ja TAF14-del-6-121-R (Lisa 2). PCR-il sünteesiti TAF14-del-6-121-F ja pRS-TAF14-SacI-

R abil kodeeriv ala 122. koodonist kuni terminaatorala lõpuni. Promootorala ja kodeeriv ala kuni 6. koodonini sünteesiti kasutades pRS-TAF14-NotI-F ja TAF14-del-6-121-R. Siis ühendati need fragmendid PCR-il, kasutades praimereid pRS-TAF14-NotI-F ja pRS-TAF14-SacI-R. Seejärel kloneeriti inserdid *HIS3* markergeeniga plasmiididesse *Overlap Extension PCR Cloning* meetodil. Plasmiidid transformeeriti bakterirakkudesse ja üles kasvanud bakterikolooniates kontrolliti plasmiidide olemasolu PCR-il. Õigeks osutunud kolooniatest eraldati plasmiidid ning neid kontrolliti omakorda restriksioonanalüüsil.

Tulemuseks saadi kaks plasmiidi: N-terminaalset domeeni kodeeriv pRS413-*taf14*Δ139-244 ja C-terminaalset regiooni kodeeriv pRS413-*taf14*Δ6-121. Geen *taf14*Δ6-121 kodeerib Taf14 valku, milles puudub atsetüleeritud histoonidega seonduv YEATS domeen. Geeni *taf14*Δ139-244 kodeeritud valgus on YEATS domeen olemas, kuid puudub teiste valgukompleksidega seonduv Taf14 C-terminaalne osa (Joonis 5).



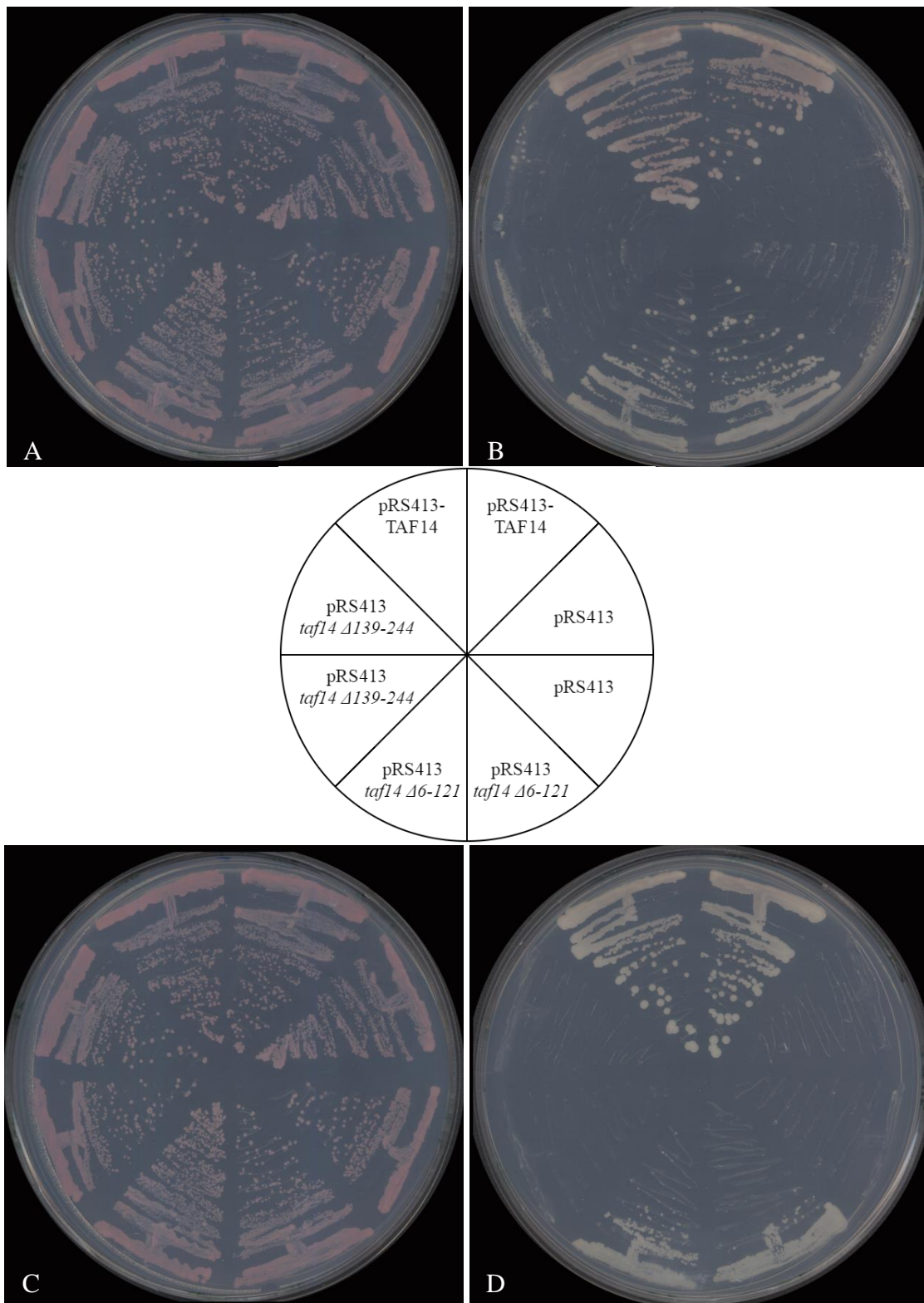
Joonis 5. Taf14 mutantsed geenikonstruktid. Joonisel on toodud 5., 122., 138. ja 244. koodon. YEATS-domeen (8.-115. koodon) on kujutatud halli alana. Mustaga on tähistatud 3. ja 4. koodoni vahel paiknev intron.

2.3.3.1 Taf14 mutatsioonide mõju

Hindamaks Taf14 mutantide mõju pärmirakkudele, transformeeriti valmistatud *HIS3* markergeeniga plasmiidid (pRS413-*taf14*Δ139-244 ja pRS413-*taf14*Δ6-121) tüvesse

AKY1352 (Lisa 1). Positiivse kontrollina transformeeriti rakkudesse pRS413-*TAF14* plasmiid; negatiivse kontrollina aga tühi pRS413 vektor. Pärast transformatsiooni külvati rakud histidiiniga selektiivsöötmele. Et mutantsed geenivariandid rakkudes ekspresseeruksid, tuli rakkudes oleval pRS416 (*URA3*) plasmiidil eemaldada. Katsetes kasutatud pärmitüvede genoomis on rikitud uratsiili biosünteesirada *ura3-1* mutatsiooniga. 5-fluoro-orootape (5-FOA) on substraadiks Ura3 valgule, mis konverteerib 5-FOA toksiliseks 5-fluoro-uratsiiliks. Seega kasvatades rakke 5-FOA söötmele, sunnitakse neid loobuma *URA3* geeni sisaldavast plasmiidist ning rakkudes ekspresseeruvad mutantsed geenivariandid pRS413 plasmiididelt. Transformatsioonijärgselt valiti üleskasvanud kolooniatest kaks, mis külvati 5-FOA söötmele. Seitsmepäevase inkubeerimise järel selgus, et 6.-121. N-terminaalse aminohappejäägi puudumine võimaldab rakkude kasvu paremal tasemel võrrelduna täieliku Taf14 deletsiooniga (Joonis 6). Üksnes Taf14 N-terminaalset valguosa (kuni 139. koodonini) ekspresseerivate rakkude fenotüüp oli aga võrreldav *taf14Δ* rakkudega. Joonisel 6B on *taf14Δ* ja mutandi *taf14Δ139-244* kasv detekteeritav mikrokolooniatena. Kumbki Taf14 mutatsioon ei võimaldanud rakkude kasvu metsiktüüpi tasemel.

Et uurida Taf14 mutatsioone koos Rpb9 deletsiooniga, ristati esmalt pärmitüved AKY718 ja AKY1352, selekteerides diploide antibiootikume NAT ja G418 sisaldaval söötmele. Saadud diploid suunati sporuleeruma ning viidi läbi tetraadanalüüs. Selekteerides saadud haploide NAT ja G418 sisaldaval selektiivsöötmele, kinnitamaks *taf14* ja *rpb9* deletsioonide olemasolu ja histidiiniga söötmele, tagamaks pRS413 plasmiidide sisaldumise rakkudes. Tulemuseks saadi haploidne tüvi AKY1406 (Lisa 1). Järgnevalt transformeeriti AKY1406 rakkudesse pRS413-*taf14Δ139-244* ja pRS413-*taf14Δ6-121*, negatiivseks kontrolliks tühi pRS413 vektor ning positiivse kontrollina metsiktüüpi *TAF14* geeni sisaldav plasmiid. pRS413 plasmiidide olemasolu rakkudes kinnitati kasvatades rakke histidiiniga söötmele. Sealt külvati kõigest kaks kolooniat 5-FOA söötmele ja tase inkubeeriti 7 päeva. Nähtus, et C-terminaalse valguosa ekspressioon on piisav päästmaks rakud *taf14Δrpb9Δ* fenotüübist. Samas ei suutnud ainult N-terminaalne osa tagada rakkude eluvõimet Rpb9 puudumisel (Joonis 6).



Joonis 6. Taf14 mutatsioonide mõju *taf14 Δ* ning *taf14 Δ arpb9 Δ* pärmitüves. Pildid A ja B kujutavad *taf14 Δ* tüve (AKY 1352), millesse on transformeeritud plasmiidid vastavalt joonise keskel paiknevale skeemile. Pildidel C ja D on kujutavad *taf14 Δ arpb9 Δ* tüve (AKY1406), millesse on samuti viidud plasmiidid vastavalt skeemile. Pildidel A ja C kasvavad rakud histidiinita (-HIS) söötmel. Pildid B ja D kujutavad vastavaid kolooniad külvatuna 5-FOA söötmel.

2.4 Arutelu

Transkriptsioon on fundamentaalse tähtsusega rakuline protsess, mille toimumise möödapääsmatuks osaks on kromatiini ümberkorraldamine. Kromatiin on üldine geeniekspressiooni repressor, mille regionaalne modifitseerimine tagab geenide spetsiifilise avaldumismustri. Transkriptsioonil osalevad mitmed kromatiiniga interakteeruvad kompleksid, näiteks kromatiini remodelleerivad kompleksid ja histoonide posttranslatsioonilisi modifikatsioone teostavad ensüümid, aga ka transkriptsioonifaktorid (Kouzarides, 2007). Selle uurimistöö keskseks osaks oli transkriptsioonifaktor Taf14, mis kuulub mitmete transkriptsioonis oluliste komplekside koosseisu. Kombineerituna RNA pol II subühiku Rpb9 deletsiooniga on Taf14 puudumine rakkudele letaalne (Ziegler *et al.*, 2003). Käesoleva töö tulemustest nähtus, et Taf14 piisav funktsionaalsus on tagatud valguga C-terminaalse osa ekspressiooni kaudu, mis kompenseerib kasvudefekte ka *taf14Δrpb9Δ* pärmitüves.

Taf14 esinemine transkriptsioonifaktorite ning kromatiiniseoseliste komplekside koosseisus võimaldab oletada valguga mitmekülgset rolli transkriptsiooni regulatsioonis, ent Taf14 funktsionaalsus ei pruugi piirduda vaid transkriptsioonis osalemisega. N-terminaalne YEATS-domeen seondub atsetüleeritud lüsiinidega ja osaleb transkriptsiooniseoselises kromatiini modifitseerimises. YEATS-motiiv võimaldab Taf14-l „lugeda“ histoonide modifikatsioone ja koordineerida täiendavate komplekside kohaletoomist kogu transkriptsiooni jooksul. C-terminaalne osa on vajalik kompleksidega interakteerumiseks ja seondumine komplekside katalüütiliste subühikutega võib viidata Taf14-poolsele regulatoorsele funktsioonile. Käsitledes Taf14 kaheosalise valguna, selgub kummagi osa eristuv funktsioon. Kui N-terminaalse domeeni kaudu seondub Taf14 atsetüleeritud lüsiinijääkidega, toimub vastava signaali edasiliikumine sellele kompleksile, millega Taf14 parajasti C-terminaalse osa kaudu seondunud on.

Antud töös saadud tulemuste põhjal selgub, et ainult Taf14 N-terminaalset osa ekspresseerivate rakkude fenotüüp on lähedane *taf14Δ* rakkudega. YEATS-domeeni individuaalne funktsioon väljendub rakutsükli reguleerimises ebasoodsates kasvutingimustes. On näidatud, et genotoksilise stressi indutseerimisel ei olnud vaid N-terminaalset osa ekspresseerivad rakud eluvõimelised, seejuures kasvasid ainult C-terminaalset osa kodeerivad rakud paremini kui metsiktüüpi rakud (Zhang *et al.*, 2011; Schulze *et al.*, 2010). Seega võib YEATS-domeeni pidada negatiivseks regulaatoriks, mis inhibeerib rakkude kasvu mitteoptimaalsetes tingimustes. Nagu töö tulemustest nähtub, ei realiseeru N-terminaalse

YEATS-domeeni funktsioon ilma C-terminaalse valguosata. C-terminuse puudumisel võib toimuda küll YEATS-domeeni seondumine atsetüleeritud lüsiinidega, kuid selle tähendus ei kandu ilma C-terminaalsete interaktsioonideta vajalikele kompleksidele edasi. Kromatiini modifikatsioonide interpreteerimisel töötavad paljud kompleksid koordineeritult, mistõttu ei ole määrava tähtsusega N-terminaalse YEATS-domeeni funktsioon, mis on kompenseeritav ülejäänud komplekside poolt, milles samuti leidub kromatiini modifikatsioone seondavaid valgudomeene.

N-terminaalse osa puudumisel ei toimu interakteerumist kromatiiniga, ent rakkude kasv on parem nullmutandi fenotüübist. Et C-terminaalne domeen soodustab rakkude kasvu võrreldes *taf14Δ* rakkudega ning on piisav tagama kasvu ka *taf14Δrpb9Δ* pärmitüves, nähtub C-terminaalsete interaktsioonide olulisus. C-terminaalse regiooni interaktsioonide rohkus ja mitmekülgsus viitab Taf14 rollile komplekside omavahelise sidujana. Seega on Taf14 C-terminuse abil tagatud transkriptsioonifaktorite või remodelleerimisel osalevate komplekside omavaheline koospüsimine ja N-terminaalse YEATS-domeeni kaudu toimub täiendav kooskõlastus kromatiini modifikatsioonidega. Selles töös tehtud katsetest selgub, et Taf14 C-terminaalse domeeni ekspresseerumine on piisav tagamaks rakkude elumust ka *taf14Δrpb9Δ* pärmitüves. Kuna Rpb9 ja TFIIF-i interaktsiooni olulisust on kirjeldatud transkriptsiooni initsiatsioonil (Ziegler *et al.*, 2003), võib Taf14 (Tfg3) puudumine süvendada Pol II ja TFIIF-i interaktsioonide ebastabiilsust, põhjustades seeläbi *taf14Δrpb9Δ* pärmitüve letaalset fenotüüpi. Saadud tulemuste põhjal ei saa väita Taf14 rakuliste funktsioonide sõltumist Rpb9-st. Selgitamiseks nende võimalikku seost, tuleks uurida lähemalt Rpb9 ja Taf14 interaktsioone TFIIF-i subühikutega ning täpsustada Taf14 C-terminaalsete interaktsioonide olemus.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärkideks oli valmistada transkriptsioonil osalevate geenide *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* mutatsioonanalüüsi võimaldavad pärmitüved ning valmistatud tüve baasil uurida transkriptsiooni initsiatsioonil osaleva valgu Taf14 N- ja C-terminaalsete osade individuaalset mõju rakkude kasvule. Lisaks kombineeriti loodud Taf14 mutandid RNA polümeraas II subühiku Rpb9 deletsiooniga, hindamaks kummagi valguosa kompensatoorset efekti letaalse fenotüübiga *taf14Δrpb9Δ* pärmitüves.

C-terminuse kaudu interakteerub Taf14 mitmete transkriptsiooniseoseliste valkkompleksidega ja võib osaleda nende komplekside katalüütilise aktiivsuse regulatsioonis. Töö tulemuste põhjal võib oletada C-terminaalse domeeni olulisust nende komplekside terviklikkuses. Üksnes C-terminaalse osa ekspressioon on piisav tagamaks rakkude kasvueelise võrreldes Taf14 nullmutandiga. Kusjuures on C-terminaalne valguosa piisav komplementeerima kasvudefekte *taf14Δrpb9Δ* rakkudes. N-terminaalse regiooni funktsionaalsus realiseerub tänu seal paiknevale konserveerunud YEATS-domeenile, mis võimaldab interakteeruda histoonide modifikatsioonidega. Ent ainult Taf14 N-terminaalse regiooni ekspressioon põhjustab rakkude aeglast kasvu ning on võrreldav *taf14Δ* fenotüübiga ja N-terminaalne osa ei ole piisav tagama rakkude eluvõimet *taf14Δrpb9Δ* geneetilise taustaga tüves.

Saadud tulemused näitavad Taf14 osalust transkriptsioonifaktorite ja kromatiiniga interakteeruvate komplekside terviklikkuses, seejuures on märkimisväärne, et vaid valgu C-terminaalne regioon suudab osaliselt kompenseerida kasvuhäireid *taf14Δ* ja *taf14Δrpb9Δ* pärmitüvedes. Taf14 C-terminaalsete interaktsioonide ning Taf14 ja Rpb9 funktsionaalsete seoste edasine uurimine võimaldaks hinnata transkriptsiooniseoselise kromatiini remodelleerimise tagamaid ja selgitada RNA polümeraas II jaoks olulisi interaktsioone transkriptsioonifaktoritega.

Töö tulemusena valmisid pärmitüved, mida on kavas rakendada geenide *RPB1*, *RPB2*, *TFG1* ja *TFG2* mutatsioonanalüüsiks tulevases uurimistöös.

Construction of yeast strains applicable for the mutational analysis of transcription factors *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2*, and *TAF14*. Determining the effects of *TAF14* mutants in budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

Johanna Luige

SUMMARY

The eukaryotic genome exists in the nucleus as a nucleoprotein complex called chromatin. The basic structural unit of chromatin is the nucleosome, consisting of 147 base pairs of DNA double helix around a core of histone proteins. Chromatin protects and organises the genome, while serving as a regulator of gene expression by limiting the accessibility of DNA. In order for the transcription machinery to bind to genes and regulatory elements, the state of chromatin must be altered during the process. Therefore, transcription-coupled modifications are introduced to chromatin by ATP-dependant remodelling complexes, histone modifying enzymes, and to an extent by transcription factors.

Taf14 is a small protein in *Saccharomyces cerevisiae* that interacts with multiple nuclear complexes – transcription factors TFIID and TFIIF, chromatin remodelling complexes SWI/SNF, RSC and INO80, histone H3 acetyltransferase NuA3, and also the regulatory Mediator complex. The N-terminal region contains a conserved acetylated lysine-binding YEATS domain, which serves a regulatory function through interactions with chromatin. For interactions with mentioned complexes only the C terminal region of Taf14 is required. Deletion of Rpb9, a non-essential subunit of RNA polymerase II (Pol II), combined with Taf14 deletion results in lethal phenotype. Since Rpb9 has been shown to stimulate transcription fidelity and polymerase processivity, the additional loss of transcriptional integrity from Taf14 deletion might be the reason for severe growth defects, therefore, resulting in lethality for the double mutant strain.

In this study, the individual effects of the N- and C-terminal regions of Taf14 were analysed and these mutants were combined with Rpb9 deletion. Cells expressing only the N-terminus showed similar slow growth phenotype to *taf14Δ* strain. Also, the N-terminal region was insufficient to complement growth defects of the *taf14Δrpb9Δ* double mutant strain. In contrast, the expression of C-terminal domain of Taf14 resulted in a slight growth advantage compared to *taf14Δ* strain. More importantly, the expression of C-terminus was sufficient to allow vitality of *taf14Δrpb9Δ* double mutant strain. The C-terminus is needed for the integrity

of aforementioned complexes and might also play a regulatory role, however, further investigation of C-terminal interactions is needed to specify its exact functional roles in the context of transcription and transcription-coupled chromatin remodelling.

Altogether, these results show the distinct functions of the N- and C-terminal regions of Taf14. While Rpb9 and Taf14 might have related cellular functions, the results of this study imply functional independence. Expression of the C-terminal region rescues *taf14Δrpb9Δ* cells from lethality through stabilizing transcriptionally important complexes, alleviating the over-all growth defects of the cells.

KIRJANDUSE LOETELU

- Allfrey, V., Faulkner, R., Mirsky, A., 1964. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 315(1938), 786–794.
- Bodor, D.L. *et al.*, 2014. The quantitative architecture of centromeric chromatin. *eLife*, 2014(3), 1–26.
- Brunelle, M. *et al.*, 2015. The histone variant H2A.Z is an important regulator of enhancer activity. *Nucleic Acids Research*, 43(20), 9742–9756.
- Bryksin, A. V., Matsumura, I., 2013. Overlap Extension PCR Cloning. In K. M. Polizzi, C. Kontoravdi, eds. *Synthetic Biology. Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 31–43.
- Buratowski, S., 2009. Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Molecular Cell*, 36(4), 541–546.
- Bushnell, D. a, Kornberg, R.D., 2003. Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 6969–6973.
- Čabart, P. *et al.*, 2014. Activation and reactivation of the RNA polymerase II trigger loop for intrinsic RNA cleavage and catalysis. *Transcription*, 5(3), p.28869.
- Cairns, B.R. *et al.*, 1996. RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, 87(7), 1249–1260.
- Cairns, B.R., Henry, N.L., Kornberg, R.D., 1996. TFG/TAF30/ANC1, a component of the yeast SWI/SNF complex that is similar to the leukemogenic proteins ENL and AF-9. *Molecular and cellular biology*, 16(7), 3308–16.
- Chasman, D.I. *et al.*, 1993. Crystal structure of yeast TATA-binding protein and model for interaction with DNA. *Proceedings of the ...*, 90(17), 8174–8.
- Chatterjee, C., Muir, T.W., 2010. Chemical approaches for studying histone modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11045–11050.
- Chen, Z.A. *et al.*, 2010. Architecture of the RNA polymerase II-TFIIF complex revealed by cross-linking and mass spectrometry. *The EMBO journal*, 29(4), 717–726.
- Cho, E.J. *et al.*, 1997. mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by

- phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes and Development*, 11(24), 3319–3326.
- Cramer, P. *et al.*, 2000. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5466), 640–9.
- Cramer, P., 2001. Structural Basis of Transcription: RNA Polymerase II at 2.8 Angstrom Resolution. *Science*, 292(5523), 1863–1876.
- Dutta, A. *et al.*, 2014. Swi/Snf dynamics on stress-responsive genes is governed by competitive bromodomain interactions. *Genes and Development*, 28(20), 2314–2330.
- Eichner, J. *et al.*, 2010. Position of the general transcription factor TFIIF within the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *The EMBO journal*, 29(4), 706–716.
- Ferri, E., Petosa, C., McKenna, C.E., 2015. Bromodomains: Structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochemical Pharmacology*, 106, 1–18.
- Furter-Graves, E.M., Furter, R., Hall, B.D., 1991. SHI, a new yeast gene affecting the spacing between TATA and transcription initiation sites. *Molecular and cellular biology*, 11(8), 4121–7.
- Furter-Graves, E.M., Hall, B.D., Furter, R., 1994. Role of a small RNA pol II subunit in TATA to transcription start site spacing. *Nucleic acids research*, 22(23), 4932–6.
- Geiger, J.H. *et al.*, 1996. Crystal structure of the yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5263), 830–836.
- Gnatt, A.L., 2001. Structural Basis of Transcription: An RNA Polymerase II Elongation Complex at 3.3 Å Resolution. *Science*, 292(5523), 1876–1882.
- Grant, P.A., Berger, S.L., 1999. Histone acetyltransferase complexes. *Seminars in cell & developmental biology*, 10(2), 169–77.
- Green, M.R., 2000. TBP-associated factors (TAF(II)s): Multiple, selective transcriptional mediators in common complexes. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(2), 59–63.
- Grünberg, S., Warfield, L., Hahn, S., 2012. Architecture of the RNA polymerase II preinitiation complex and mechanism of ATP-dependent promoter opening. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(8), 788–796.
- Guzmán, E., Lis, J.T., 1999. Transcription factor TFIIF is required for promoter melting in vivo. *Molecular and cellular biology*, 19(8), 5652–8.
- Hahn, S., 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery.

- Nature structural & molecular biology*, 11(5), 394–403.
- Harel-Sharvit, L. *et al.*, 2010. RNA polymerase II subunits link transcription and mRNA decay to translation. *Cell*, 143(4), 552–563.
- Hsin, J., Manley, J.L., 2012. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes and Development*, 2119–2137.
- Hull, M.W., McKune, K., Woychik, N.A., 1995. RNA polymerase II subunit RPB9 is required for accurate start site selection. *Genes & Development*, 9(4), 481–490.
- Jeon, C., Agarwal, K., 1996. Fidelity of RNA polymerase II transcription controlled by elongation factor TFIIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13677–13682.
- John, S. *et al.*, 2000. The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a γ TAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex. *Genes & development*, 14(10), 1196–1208.
- Kabani, M. *et al.*, 2005. Anc1 interacts with the catalytic subunits of the general transcription factors TFIID and TFIIF, the chromatin remodeling complexes RSC and INO80, and the histone acetyltransferase complex NuA3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(2), 398–403.
- Kang, J.J. *et al.*, 1995. Analysis of the yeast transcription factor TFIIA: distinct functional regions and a polymerase II-specific role in basal and activated transcription. *Mol Cell Biol*, 15(3), 1234–1243.
- Kaplan, C.D., 2013. Basic Mechanisms of RNA Polymerase II Activity and Alteration of Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(1), 39–54.
- Kaplan, C.D., Kornberg, R.D., 2008. A bridge to transcription by RNA polymerase. *Journal of biology*, 7(10), p.39.
- Kim, T.K., Ebright, R.H., Reinberg, D., 2000. Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIIH. *Science*, 288(5470), 1418–1422.
- Kornberg, R.D., Lorch, Y., 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98(3), 285–294.
- Kostrewa, D. *et al.*, 2009. RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature*, 462(7271), 323–330.

- Kouzarides, T., 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693–705.
- Lee, K.K., Workman, J.L., 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(4), 284–295.
- Lo, W., 2001. Snf1 — a Histone Kinase That Works in Concert with the Histone Acetyltransferase Gcn5 to Regulate Transcription. *Science*, 293(5532), 1142–1146.
- Lorch, Y., Kornberg, R.D., 2015. Chromatin-remodeling and the initiation of transcription. *Quarterly Reviews of Biophysics Quart. Rev. Biophys.*, 48(4), 465–470.
- Lu, R., Wang, G.G., 2013. Tudor: A versatile family of histone methylation 'readers'. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(11), 546–555.
- Luse, D.S., 2013. Promoter clearance by RNA polymerase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(1), 63–68.
- Lööke, M., Kristjuhan, K., Kristjuhan, A., 2011. Extraction of Genomic Dna From Yeasts for Pcr- Based Applications. *Biotechniques*, 50(5), 325–328.
- Lynn Henry, N. *et al.*, 1994. TFIIF-TAF-RNA polymerase II connection. *Genes and Development*, 8(23), 2868–2878.
- Maeshima, K., Eltsov, M., 2008. Packaging the genome: The structure of mitotic chromosomes. *Journal of Biochemistry*, 143(2), 145–153.
- Malagon, F. *et al.*, 2004. Genetic Interactions of DST1 in *Saccharomyces cerevisiae* Suggest a Role of TFIIS in the Initiation-Elongation Transition. *Genetics*, 166(3), 1215–1227.
- Martens, J.A., Winston, F., 2003. Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 13(2), 136–142.
- Mews, P. *et al.*, 2014. Histone Methylation Has Dynamics Distinct from Those of Histone Acetylation in Cell Cycle Reentry from Quiescence. *Molecular and Cellular Biology*, 34(21), 3968–3980.
- Nechemia-Arbely, Y., Fachinetti, D., Cleveland, D.W., 2012. Replicating centromeric chromatin: Spatial and temporal control of CENP-A assembly. *Experimental Cell Research*, 318(12), 1353–1360.
- Nesser, N.K., Peterson, D.O., Hawley, D.K., 2006. RNA polymerase II subunit Rpb9 is important for transcriptional fidelity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), 3268–73.
- Ng, H.H. *et al.*, 2002. Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC

- nucleosome-remodeling complex. *Genes and Development*, 16(7), 806–819.
- Nowak, S.J., Corces, V.G., 2004. Phosphorylation of histone H3: A balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in Genetics*, 20(4), 214–220.
- Ohkuma, Y. *et al.*, 1995. Analysis of the role of TFIIE in basal transcription and TFIIF-mediated carboxy-terminal domain phosphorylation through structure-function studies of TFIIE-alpha. *Molecular and cellular biology*, 15(9), 4856–4866.
- Papamichos-Chronakis, M. *et al.*, 2011. Global Regulation of H2A.Z Localization by the INO80 Chromatin-Remodeling Enzyme Is Essential for Genome Integrity. *Cell*, 144(2), 200–213.
- Peterson, C.L., Workman, J.L., 2000. Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Current Opinion in Genetics, Development*, 10(2), 187–192.
- Piatti, P., Zeilner, A., Lusser, A., 2011. ATP-dependent chromatin remodeling factors and their roles in affecting nucleosome fiber composition. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6544–6565.
- Redon, C. *et al.*, 2002. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12(2), 162–169.
- Rhee, H.S., Pugh, B.F., 2012. Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature*, 483(7389), 295–301.
- Schulze, J.M., Kane, C.M., Ruiz-Manzano, A., 2010. The YEATS domain of Taf14 in *Saccharomyces cerevisiae* has a negative impact on cell growth. *Molecular Genetics and Genomics*, 283(4), 365–380.
- Shanle, E.K. *et al.*, 2015. Association of Taf14 with acetylated histone H3 directs gene transcription and the DNA damage response. *Genes and Development*, 29(17), 1795–1800.
- Spangler, L. *et al.*, 2001. TFIIF action in transcription initiation and promoter escape requires distinct regions of downstream promoter DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5544–5549.
- Stellfox, M.E., Bailey, A.O., Foltz, D.R., 2013. Putting CENP-A in its place. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(3), 387–406.
- Stillier, J.W., McConaughy, B.L., Hall, B.D., 2000. Evolutionary complementation for

- polymerase II CTD function. *Yeast*, 16(1), 57–64.
- Strahl, B.D. *et al.*, 1999. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 14967–14972.
- Sun, Z.W., Tessmer, A., Hampsey, M., 1996. Functional interaction between TFIIB and the Rpb9 (Ssu73) subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 24(13), 2560–2566.
- Sydow, J.F., Cramer, P., 2009. RNA polymerase fidelity and transcriptional proofreading. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(6), 732–739.
- Zhang, W. *et al.*, 2011. Solution structure of the Taf14 YEATS domain and its roles in cell growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal*, 436(1), 83–90.
- Zhang, Y., Reinberg, D., 2001. Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes and Development*, 15(18), 2343–2360.
- Ziegler, L.M. *et al.*, 2003. Yeast RNA polymerase II lacking the Rpb9 subunit is impaired for interaction with transcription factor IIF. *The Journal of biological chemistry*, 278(49), 48950–48956.
- Tanaka, A. *et al.*, 2009. Central forkhead domain of human TFIIE β plays a primary role in binding double-stranded DNA at transcription initiation. *Genes to Cells*, 14(3), 395–405.
- Thomas, B.J., Rothstein, R., 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, 56(4), 619–630.
- Walmacq, C. *et al.*, 2009. Rpb9 subunit controls transcription fidelity by delaying NTP sequestration in RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry*, 284(29), 19601–19612.
- Wang, D. *et al.*, 2006. Molecular basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell*, 127(5), 941–954.
- Yan, Q. *et al.*, 1999. Dual Roles for Transcription Factor IIF in Promoter Escape by RNA Polymerase II. *Journal of Biological Chemistry*, 274(50), 35668–35675.

LISAD

Lisa 1. Kasutatud pärmitüvede genotüübid ja päritolu

Tüvi	Genotüüp	Päritolu
W303	<i>S. cerevisiae</i> , MAT A, <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1, can1-100R lys2</i>	(Thomas ja Rothstein, 1989)
AKY200	W303, MAT A/ α	Labori pärmitüvede kolleksioon
AKY718	W303, MAT α , <i>rpb9::natMX6</i>	Labori pärmitüvede kolleksioon
AKY1366	W303, MAT A, <i>rpb1::kanMX6</i> , [pRS416- <i>RPB1(URA3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1367	W303, MAT α , <i>rpb1::kanMX6</i> , [pRS416- <i>RPB1(URA3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1368	W303, MAT A, <i>rpb2::kanMX6</i> , [pRS416- <i>RPB2(URA3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1369	W303, MAT α , <i>rpb2::kanMX6</i> , [pRS416- <i>RPB2(URA3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1347	W303, MAT A, <i>tfg1::kanMX6</i> , [pRS416- <i>TFG1(URA3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1348	W303, MAT α , <i>tfg1::kanMX6</i> , [pRS416- <i>TFG1(URA3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1349	W303, MAT A, <i>tfg2::kanMX6</i> , [pRS416- <i>TFG2(URA3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1350	W303, MAT α , <i>tfg2::kanMX6</i> , [pRS416- <i>TFG2(URA3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1351	W303, MAT A, <i>taf14::kanMX6</i> , [pRS416- <i>TAF14(URA3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1352	W303, MAT α , <i>taf14::kanMX6</i> , [pRS416- <i>TAF14(URA3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1406	W303, MAT α , <i>taf14::kanMX6</i> , <i>rpb9::natMX6</i> , [pRS416- <i>TAF14(URA3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1447	W303, MAT α , <i>taf14::kanMX6</i> , [pRS413- <i>TAF14(HIS3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1448	W303, MAT α , <i>taf14::kanMX6</i> , [pRS413- <i>taf14Δ6-121(HIS3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1449	W303, MAT α , <i>taf14::kanMX6</i> , [pRS413- <i>taf14Δ139-244(HIS3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1450	W303, MAT α , <i>taf14::kanMX6</i> , <i>rpb9::natMX6</i> , [pRS413- <i>TAF14(HIS3)</i>]	Töö tulemusena valminud
AKY1451	W303, MAT α , <i>taf14::kanMX6</i> , <i>rpb9::natMX6</i> , [pRS413- <i>taf14Δ6-121 (HIS3)</i>]	Töö tulemusena valminud

Lisa 2. Kasutatud praimerid

Kloneerimine		
1	pRS-NotI-RPB1-F	5' CAGTGA GCGCGC GTAATA CGACTC ACTATA GGGCGA ATTGGC GGCCGC CCGATT CGTTCA TTA ACT GAA 3'
2	pRS-SacI-RPB1-R	5' CGCAAT TAACCC TCACTA AAGGGA ACAAAA GCTGGA GCTCAG AGTCTA CCACTT GAAGCT TAGA 3'
3	pRS-NotI-RPB2-F	5' CAGTGA GCGCGC GTAATA CGACTC ACTATA GGGCGA ATTGGC GGCCGC TCCTCT CACTTT CGTAGT AGCTT 3'
4	pRS-SacI-RPB2-R	5' CGCAAT TAACCC TCACTA AAGGGA ACAAAA GCTGGA GCTCTC CGCTAA AGTTCA TTAATA TGTC 3'
5	pRS-NotI-TFG1-F	5' CAGTGA GCGCGC GTAATA CGACTC ACTATA GGGCGA ATTGGC GGCCGC AGGCGT GCAAGT CTGCTA A 3'
6	pRS-SacI-TFG1-R	5' CGCAAT TAACCC TCACTA AAGGGA ACAAAA GCTGGA GCTCTG AAATTG TCGAAG TGGCC 3'
7	pRS-NotI-TFG2-F	5' CAGTGA GCGCGC GTAATA CGACTC ACTATA GGGCGA ATTGGC GGCCGC TGTCTT GAGCTA TCGCTT CTTG 3'
8	pRS-SacI-TFG2-R	5' CGCAAT TAACCC TCACTA AAGGGA ACAAAA GCTGGA GCTCGC ACACAG CAATCT CAGAGT TTC 3'
9	pRS-NotI-TAF14-F	5' CAGTGA GCGCGC GTAATA CGACTC ACTATA GGGCGA ATTGGC GGCCGC CCCAGG CTGAAG ATTTGG G 3'
10	pRS-SacI-TAF14-R	5' CGCAAT TAACCC TCACTA AAGGGA ACAAAA GCTGGA GCTCCC TAGGTA TATCTT TTGACG TGG 3'
Deletsioonitüvede valmistamine		
1	RPB1-KO-F	5' ACCAAT CATAAA GATAGC AATAAC ACTTTA CCCAA AATATA AATCAG ACGATA GTCAT TTTGGA GTTCG 3'
2	RPB1-KO-R	5' AAATA TATATA ATGTAA TAACGT CAAATA CGTAAG GATGAT AACTA TACAGG AAACAG CTATGA CCATG 3'
3	RPB2-KO-5'	5' GAAAAA GAACAC AAACAA GTATAG AAAAAT AATTAT AAGGAT GTCAGA CCGATA GTCAT TTTGGA GTTCG 3'
4	RPB2-KO/TAG-3'	5' AATGAA ATGTTT TTTATT ATTTA CTTTCT TAGAGT TACAAC ATTATT TCCAGG AAACAG CTATGA CCATG 3'
5	TFG1-KO-5'	5' TGAAGA ATAGCT AGGGAG GCCTAT TCGAGT AAGCGC AAGGAT GTCCAG ACGATA GTCAT TTTGGA GTTCG 3'
6	TFG1-3xTAG-3'	5' AAAGAA CGAAAA CTAAAT AACCTA TTAAGT ACATAA CATTAT AAATA ACCAGG AAACAG CTATGA CCATG 3'
7	TFG2-KO-5'	5' ACGCAA TATTAA GAGTAA AATAGA AGACCA ACTTAA CACCAT GAGCAG TGGATA GTCAT TTTGGA GTTCG 3'
8	TFG2-KO/TAG-3'	5' CTCAAG AAATCG CGTAAA TATAAA ATTAAT GAAGAA AATCTG ATTGTC AACAGG AAACAG CTATGA CCATG 3'
9	TAF14-KO-5'	5' CTTCGT GACCTC GGAGCT GACTGA TATTAG ATA ACT ATCATG GTAGCT G GATA GTCAT TTTGGA GTTCG 3'
10	TAF14-3xTAG-3'	5' TTTATT TATACA AACATA AAAGCG CGCATT TAACGC CCTTTT ACCTTT TA CAGG AAACAG CTATGA CCATG 3'
Deletsioonide kontrollimine		
1	FBA1-ctrl-2	5' CGAACT CCAAAA TGAGCT ATC 3'
2	RPB1-1-F	5' TTGACT AAGAAA TCAAAC TCTGTT A 3'

3	RPB1-1-R	5' AACTCT TAGTTC TGGTTC ATCCG 3'
4	RPB2-1-F	5' ACTTGG ATATTG CACTCA TTCC 3'
5	RPB2-1-R	5' CCATTA ATGATG AAATAA CCACC 3'
6	TFG1-KO-CTRL	5' TTGTCC AAAAAG GCGTGC AAG 3'
7	TFG2-1-F	5' TCTAGG TCCATT TTATGC ACATAT 3'
8	TAF14-KO-CTRL	5' CTGAAG ATTTGG GTAAGC TTGG 3'
Taf14 mutantide konstrueerimine		
1	TAF14-stop139-F	5' AAGTGG ATCTAC TGAATA ATAAAA GGTAAG AGGGCG TTAAAT GC 3'
2	TAF14-stop139-R	5' TTACCT TTTATT ATTCAG TAGATC CACTTT TCGCAA G 3'
3	TAF14-del-6-121-F	5' TAACCA ACAGAC AGTACT CAATAA ACCACT TTTAAC AGAAGA AC 3'
4	TAF14-del-6-121-R	5' GTTTAT TGAGTA CTGTCT GTTGGT TATTTA ATGATG A 3'

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Johanna Luige (sünnikuupäev 27.10.1994)

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

„Transkriptsioonifaktorite *RPB1*, *RPB2*, *TFG1*, *TFG2* ja *TAF14* mutatsioonanalüüsiks sobivate pärmitüvede konstrueerimine ja *TAF14* deletsioonimutantide uurimine pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*)“, mille juhendajad on Arnold Kristjuhan ja Kristina Reinmets,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **31.05.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

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

Tartus, **24.05.2016**