

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

**Transkriptsiooni regulaator Taf14 funktsioonide uurimine
pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae***

Bakalaureusetöö

12 EAP

Katrin Teder

Juhendajad PhD Signe Värv

Prof. Arnold Kristjuhan

Tartu 2023

INFOLEHT

Transkriptsiooni regulaator Taf14 funktsioonide uurimine pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae*

Pagaripärmis *S.cerevisiae* on transkriptsiooni regulaator Taf14 erinevate kromatiini modelleerimist mõjutavate valgukomplekside alaühik. Taf14 valk sisaldab YEATS ja ET domeene, mille vahele jääb struktureerimata linkerpiirkond. Käesoleva töö eesmärgiks oli teha kindlaks, kas Taf14 erinevatel struktuuriosadel on veel seni kirjeldamata funktsioone. Selleks ekspresseeriti pagaripärmis valgulise järjestuse poolest erinevaid *TAF14* geene, mis isoleeriti eesti loodusest pärit pärmiliikidest. Töös kasutatud pärmid saadi projekti „101 pärmitüve Eesti loodusest“ kogust. Töö tulemusena selgus, et liigist *M. pulcherrima* eraldatud *TAF14* geeni ekspresseerivad pagaripärmi rakud surid kuumašoki (37°) tingimustes. Pagaripärmi ja *M. pulcherrima* Taf14 valkude joondamine näitas, et valkude oluliselt erinev piirkond on struktureerimata linkerpiirkond.

Märksõnad: Taf14, kromatiin, eesti pärmid, *Saccharomyces cerevisiae*

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

Study of the functions of transcription regulator Taf14 in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*

In budding yeast *S. cerevisiae*, the transcriptional regulator Taf14 is a subunit of various protein complexes that influence the remodeling of chromatin. The Taf14 protein contains the YEATS and ET domains with an unstructured linker region between them. The aim of this work was to determine whether the different structural parts of Taf14 have functions that have not yet been described. For this purpose, various *TAF14* genes were expressed in baker's yeast, isolated from yeast species collected all over Estonia. The yeasts used in the work were obtained from the Yeast Reserve formed as a result of the project „101 Yeast Strains from Estonian Nature“. As a result of the work, it was found that baker's yeast cells expressing the *TAF14* gene, isolated from the species *M. pulcherrima*, died under conditions of heat shock (37°). Alignment of baker's yeast and *M. pulcherrima* Taf14 proteins revealed that a significantly different region of the proteins is the unstructured linker region.

Keywords: Taf14, chromatin, estonian yeast, *Saccharomyces cerevisiae*

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Kromatiin.....	8
1.2. RNA Pol II-sõltuv transkriptsioon.....	10
1.3. Taf14.....	10
1.3.1. Taf14 valgu struktuur	11
1.3.2. Taf14 sisaldavad valgukompleksid	14
1.3.2.1. ATP-sõltuvad remodelleermiskompleksid.....	14
1.3.2.2. NuA3	15
1.3.2.3. Mediaator	16
1.3.2.4. Üldised transkriptsioonifaktorid.....	16
1.4. Projekt „101 pärmitüve Eesti loodusest“	17
2. EKSPERIMENTAALOSA	18
2.1. Töö eesmärgid.....	18
2.1. Materjal ja meetodika	18
2.1.1. Kasutatud söötmed	18
2.2.2. Kasutatud pärmitüved, oligonukleotiidid, plasmiidid	19
2.2.3. Plasmiidide konstrueerimine	19
2.2.4. Plasmiidivahetussüsteem	22
2.2.5. Valkude immuunodetektsioon.....	23
2.2.6. 10-kordse lahjendusrea analüüs.....	25
2.3. Tulemused.....	25
2.3.1. Erinevate pärmiliikide Taf14 valkude omavaheline võrdlus.....	25

2.3.2.	Erinevate pärmiliikide <i>TAF14</i> geeni ekspresseerivate vektorite konstrueerimine	27
2.3.2.1.	<i>TAF14</i> geeni amplifitseerimine loodusest isoleeritud pärmidest	27
2.3.2.2.	pRS413-3xFLAG-Taf14 plasmiidide konstrueerimine.....	28
2.3.2.3.	Transformatsioonil saadud bakterikolooniate kontroll	29
2.3.3.	Erinevatest pärmiliikidest pärit <i>TAF14</i> geeni ekspresseerivate pagaripärmi tüvede konstrueerimine kasutades plasmiidivahetussüsteemi	31
2.3.4.	Erinevate liikide Taf14 valkude immuunodetektsioon pagaripärmis.....	32
2.3.5.	Erinevate pärmiliikide <i>TAF14</i> geenide mõju pagaripärmi elulemusele	33
2.3.6.	<i>S. cerevisiae</i> ja <i>M. pulcherrima</i> Taf14 valgujärjestuste joondamine	33
2.4.	Arutelu	34
	KOKKUVÕTE	38
	SUMMARY	39
	TÄNUSÕNAD	41
	KIRJANDUSE LOETELU.....	42
	KASUTATUD VEEBIAADRESSID	49
	LISAD	50
	Lisa 1.....	50
	Lisa 2.....	52
	Lisa 3.....	53
	LIHTLITSENTS.....	55

KASUTATUD LÜHENDID

5-FOA – *5-fluoroorotic acid* (5-fluoto-oroothape)

aa/ap – *aminoacid/aluspaar*

ah – *aminohape*

C-terminaalne – *karboksüül-terminaalne ots*

GTF – *general transcription factors* (üldised transkriptsiooni faktorid)

H2A, H2B, H3, H4 – *histoonid 2A, 2B, 3 ja 4*

HIS – *histidiin*

INO80 – *inositol auxotrophy 80* (kromatiini remodeleeriv kompleks)

kDa – *kilodalton*

N-terminaalne – *amino-terminaalne ots*

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

PIC – *preinitiation complex* (transkriptsiooni preinitsiatsiooni kompleks)

RNA Pol II – *RNA polymerase II* (RNA polümeraas II)

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

SDS – *sodium dodecyl sulfate* (naatriumdodetsüülsulfaat)

SWI/SNF – *switch/sucrose non-fermentable* (kromatiini remodeleerimiskompleks)

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

TATA – *TATA-box* (TATA-kast, TATA- järjestus promootoril)

TBP – *TATA binding proteiin*, (TATA-järjestusele seonduv valk)

TEMED – *tetramethylethylenediamine* (tetrametüületüleendiamiin)

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)

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

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

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

TFIIS – *transcription elongation factor II S* (RNA polümeraas II telongatsioonifaktor S)

TSS – *transcription start site* (transkriptsiooni alguskohad)

UAS - **u**pstream **a**ctivating **s**equence (ülesvoolu aktiveeriv järjestus)

YEATS – *Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5* (valgudomeen, sai oma nime esimeste avastatud seda domeeni sisaldavate valkude järgi Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5)

YPD/ YEPD – *yeast extract peptone dextrose* (pärmiekstrakt, pepton, dekstroos sisaldav rikas sööde)

SISSEJUHATUS

Kromatiini struktuur mängib olulist rolli geeniekspressiooni reguleerimisel ja genoomi stabiilsuse säilitamisel. Kromatiini põhiühik on nukleosoom, mis koosneb DNA-st, mis keerdub kaheksast histoonvalgust koosneva tuuma ümber. Spetsiaalsed valgukompleksid, kromatiini remodelleerijad ja histoonide post translatsioonilised modifitseerijad, aitavad moduleerida kromatiini struktuuri ja kättesaadavust, reguleerides seeläbi geeniekspressiooni.

DNA-s salvestatud geneetilise informatsiooni RNA molekulideks muundamise protsessi nimetatakse transkriptsiooniks. Transkriptsiooni initsiatsioon on selle protsessi esimene samm ja hõlmab suure valgukompleksi kokkupanekut, mida tuntakse pre-initsiatsiooni kompleksina (PIC). PIC koosneb mitmest üldisest transkriptsioonifaktorist ja RNA polümeraasist, s.o ensüümist, mis viib läbi RNA molekulide sünteesi. PIC-kompleks vastutab geeni promootorpiirkonna äratundmise ja sellega seondumise eest.

Pagaripärmis, aga ka paljudes teistes pärmiliikides leidub transkriptsioonifaktor Taf14. Taf14 on erinevate valgukomplekside, sealhulgas üldiste IID- ja IIF-transkriptsioonifaktorite, INO80, SWI/SNF, RSC kromatiini remodelleerijate, NuA3 histoonmodifitseerija ja mediaatori komponent. Taf14 koosneb kahest struktuursest valgudomeenist YEATS ja ET, mille vahel on struktureerimata linkerpiirkond. YEATS on evolutsiooniliselt konserveerunud valgustruktuur, mis aitab Taf14-le seonduda histooni atsüülmodifitseeritud N-terminaalsete sabadega, samas kui ET domeen võimaldab Taf14 interaktsiooni valgukompleksidega.

Üllatuslikult leiti meie töögrupi poolt, et ka Taf14 valgu struktureerimata osal on funktsionaalne roll. Nimelt vahendab linkerpiirkond DNA-ga seondumist ning tagab rakkude kasvu Htz1 histoonivariandi puudumisel (Peil *et al.*, 2022). Sellest lähtuvalt on käesoleva töö eesmärk leida Taf14 erinevate struktuursete osade uusi, seni teadmata funktsioone.

Antud töö meetodiks valiti erinevatest pärmiliikidest pärit *TAF14* geenide ekspresseerimine pagaripärmis *S.cerevisiae* ning viimase elulemuse jälgimine. Valgujärjestuselt erinevad *TAF14* geenid saadi loodusest isoleeritud eri liiki pärmidest, mis olid kogutud projekti „101 pärmitüve Eesti loodusest“ raames. Töö tulemusena leiti, et *Metschnikowia pulcherrima TAF14* geeni ekspresseeriv pagaripärm ei suutnud elada 37 °C juures. *M. pulcherrima* ja pagaripärmi Taf14 valgujärjestuste analüüs näitas, et antud liikide valkude kõige vähem konserveerunud osa oli struktureerimata linkerpiirkond. See lubab oletada, et linkerpiirkonnal on üldine tähtsus rakkude kromatiiniga seotud stressivastuses.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Kromatiin on DNA ja valkude kompleks, mida leidub eukarüootsete rakkude tuumas. See on keerukas ja dünaamiline struktuur, mis muutub vastusena eri signaalidele, võimaldades seeläbi erinevate rakuprotsesside regulatsiooni vastavalt raku kasvukeskonnale. Kromatiini struktuur mõjutab otseselt geeniekspressiooni, DNA replikatsiooni ja parandamist ning rakkude jagunemist (Kornberg ja Lorch, 1999). Näiteks kompaksem kromatiin raskendab valkude juurdepääsu DNA-le, mis võib põhjustada sobimatuid geeniekspressiooni mustreid. Vastupidi, liiga lõtv struktuur võib põhjustada geneetilise materjali suuremat vastuvõtlikkust kahjustustele ja mutatsioonidele (Li *et al.*, 2007; Rando ja Winston, 2012). Kromatiini struktuuri saab modifitseerida erinevate valkude ja valgukompleksitega, nagu näiteks kromatiini remodelleerijad, histoonide modifikaatorid ja transkriptsioonifaktorid (Piatti *et al.*, 2011; Wu ja Grunstein, 2000).

Käesoleva töö uurimisobjekt transkriptsioonifaktor Taf14 osaleb sellistes kompleksides nagu üldised transkriptsioonifaktorid (TFIID, TFIIIF), kromatiini remodelleerivad kompleksid (INO80, SWI/SNF, RSC), histooni modifitseerimisensüümid (NuA3) ja mediaator (Cairns *et al.*, 1996; Henry *et al.*, 1994; John *et al.*, 2000; Kabani *et al.*, 2005). Seeläbi on Taf14 osaline kõigis eelpool mainitud DNA-seoselistes protsessides. Taf14 täpsete funktsioonide määratlemine, aitab paremini mõista rakuprotsesse ja nendevahelisi seoseid.

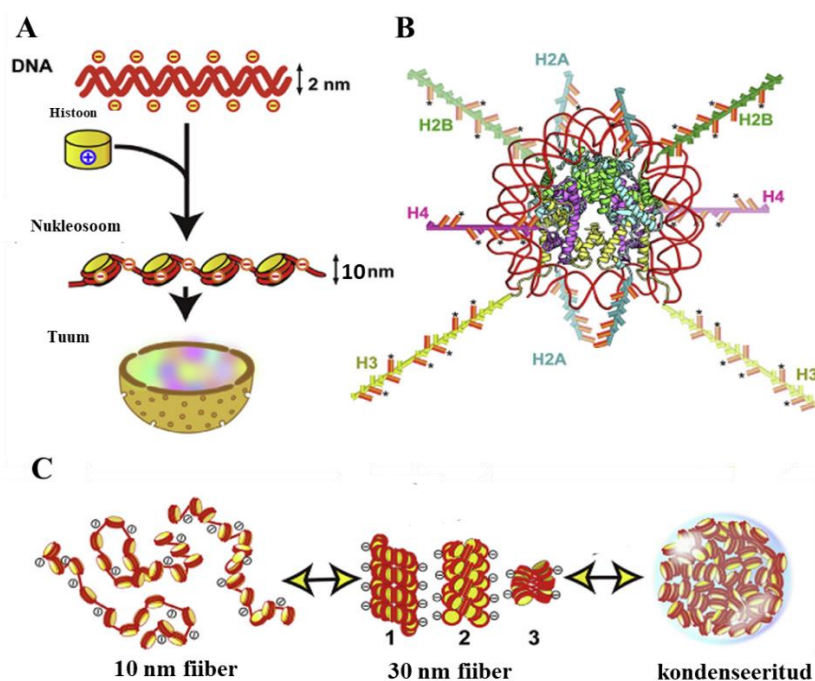
1.1. Kromatiin

Kromatiini väikseim struktuuriüksus on nukleosoom. Nukleosoomi tuum koosneb kaheksast nelja tüüpi histoonist (igat ühte kaks) – H2A, H2B, H3 ja H4 (Joonis 1A, B), mille ümber on põimunud DNA pikkusega 145–147 aluspaari. Üksikute nukleosoomide vahel on eri pikkusega linker-DNA (Luger *et al.*, 1997).

Histoonide struktureerimata N-terminaalsed sabad ulatuvad nukleosoomist välja ja võivad tegutseda koos teiste kromatiini valkudega. Histoonid mitte ainult ei taga DNA ahela kokkupanekut tuumas, vaid osalevad aktiivselt ka transkriptsiooni reguleerimises. See omadus on seotud N-terminaalsete sabadega, mille aminohappejääke modifitseeritakse. Histoonide kovalentseid modifikatsioone on erinevaid, näiteks võivad erinevad aminohappejäägid olla atsetüleeritud, metüleeritud, fosforüleeritud, ADP-ribosüleeritud, ubikvitinüleeritud. Post-translatsioonilised modifikatsioonid muudavad nii DNA ja histoonivalkude omavahelist seondumistugevust kui on ka seondumismärgisteks erinevatele valgukompleksidele (Imhof ja Becker, 2001).

Nukleosoomide ja linker-DNA ühendamise moodustab kiu läbimõõduga u 10 nm (Joonis 1A, C). Sellist tihendamise taset nimetatakse ka nn pärlid ketil struktuuriks (Piatti *et al.*, 2011). Järgmine pakendamise tase on helmeste keerdumine 30 nm läbimõõduga kiusse (Joonis 1C), mida leidub nii interfaasilises kromatiinis kui ka mitootilistes kromosoomides. Kromatiinikiudude kõrgeimaks kondensatsioonistmeks on 700 nm mikroskoopiliselt nähtav kromosoom. Kondenseerumine kõrgematele tasemetele toimub tänu mittehistonsetele valkudele (Maeshima ja Eltsov, 2008).

Morfoloogiliselt eristatakse eukromatiini ja heterokromatiini. Eukromatiin vastab geenirikastele, transkriptsiooniliselt aktiivsetele ning „avatud“ kromosoomipiirkondadele, samas kui heterokromatiin vastab geenivaestele, transkriptsiooniliselt vaigistatud piirkondadele (Tamaru, 2010). Peaaegu kõik *S. cerevisiae* geenid asuvad genoomi eukromatiini osades, välja arvatud HML-i, HMR-i ja rDNA lookused ning telomeersed alad, mis on transkriptsiooniliselt vaigistatud (Bi, 2014).



Joonis 1. Kromatiini struktuur. A. Nukleosoomi moodustumine, kus u. 147 ap DNA on keerdunud ümber histoonidest tuuma. B. Neljast erinevast histoonist (H2A, H2B, H3, H4) moodustuv histoonide südamik, mille ümber on keerdunud DNA kaksikahel. C. DNA pakkimise üldine hierarhia; 10 nm fiiber ehk pärlikee struktuur, 30 nm fiibri struktuur, kondenseeritud kromatiin (Itoh *et al.*, 2021, modifitseeritud).

1.2. RNA Pol II-sõltuv transkriptsioon

Transkriptsioon on DNA-s kodeeritud geneetilise informatsiooni RNA molekuliks teisendamise protsess. Protsess on keeruline ja täpselt reguleeritud, hõlmates transkriptsioonifaktoreid ja muid reguleerivaid valke, mis koos tagavad geneetilise informatsiooni täpse ja tõhusa edastamise (Green, 2005). Valku kodeerivat transkriptsiooni teostab RNA polümeraas II (Pol II). Hoolimata asjaolust, et Pol II on üsna suur ja keeruline kompleks, vajab see transkriptsiooni algatamiseks ja pikendamiseks erinevaid valke. Protsess hõlmab kuut üldist transkriptsioonifaktorit (*general transcription factors*, GTF) – TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF ja TFIIH (Schier ja Taatjes, 2020). Meid huvitav valk, Taf14, on osa transkriptsioonifaktoritest IID ja IIF (Henry *et al.*, 1994).

Eukarüootse transkriptsiooni protsess koosneb mitmest etapist – initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon (Cramer, 2019). Initsiatsioon algab promootoril initsiatsioonieelse kompleksi (*preinitiation complex*, PIC) moodustumisega, mis on vajalik RNA polümeraasi ühendamiseks DNA-ga. Esimesena liitub promootoriga TFIID, mis koosneb TBP-st (TATA-siduv valk) ja TBP-ga seotud faktoritest (*TBP-associated factor*, TAF). See valgukompleks aitab värvata üldiseid transkriptsioonifaktoreid ja RNA polümeraas II transkriptsiooni alguskohtadele (*transcription start site*, TSS). On teada, et TBP võib seonduda promootoritega, millel puudub TATA-järjestus. *S. cerevisiae*'s ligikaudu 90% kõigist geenidest on TATA-vabade promootoritega. Pärast kõigi komplekside ja RNA Pol II seondumist promootoripiirkonnaga algab TFIIH helikaasi aktiivsuse tõttu topeltheeliksi lahtikerimine. RNA polümeraas II hakkab sünteesima komplementaarset mRNA molekuli, kasutades matriitsina ühte DNA ahelat (Rhee ja Pugh, 2012). Elongatsioon hõlmab polümeraasi pidevat liikumist mööda DNA molekuli, sünteesides seeläbi RNA molekuli. Terminatsioon toimub siis, kui polümeraas jõuab DNA järjestuseni, terminaatorini, mis annab märku geeni lõpust ja RNA molekuli vabanemisest (Cramer, 2019).

1.3. Taf14

Taf14 (tuntud ka kui Anc1, Taf30, Tfg3 ja Swp29) on valk, mis on pärmi tõhusaks transkriptsiooniks vajalik (*Saccharomyces Genome Database*, <https://www.yeastgenome.org/>). Taf14 nullmutandid on elujõulised, kuid neil on vähenenud kasvukiirus, suurenenud tundlikkus temperatuuride ja genotoksiliste ainete suhtes, defektid aktiini organisatsioonis ja vähenenud transkriptsiooniline aktiivsus (Henry *et al.*, 1994; Welch ja Drubin, 1994; Zhang *et al.*, 2004). Taf14 on mitmete erinevate suurte valgukomplekside allüksus. Nendeks kompleksideks on

üldised transkriptsioonifaktorid (TFIID, TFIIIF), kromatiini remodelleerivad kompleksid (INO80, SWI/SNF, RSC), histooni modifitseerimisensüümid (NuA3) ja mediaator (Joonis 3). Taf14 eemaldamine nendest kompleksidest ei takista viimaste töötamist, kuid põhjustab muutusi globaalses transkriptsioonimustris (Cairns *et al.*, 1996; Henry *et al.*, 1994; John *et al.*, 2000; Kabani *et al.*, 2005). Taf14 on seotud ka tsütoskeleti organisatsiooni, rakutsükli progresseerumise ja pärimi morfogeneesiga (Welch ja Drubin, 1994).

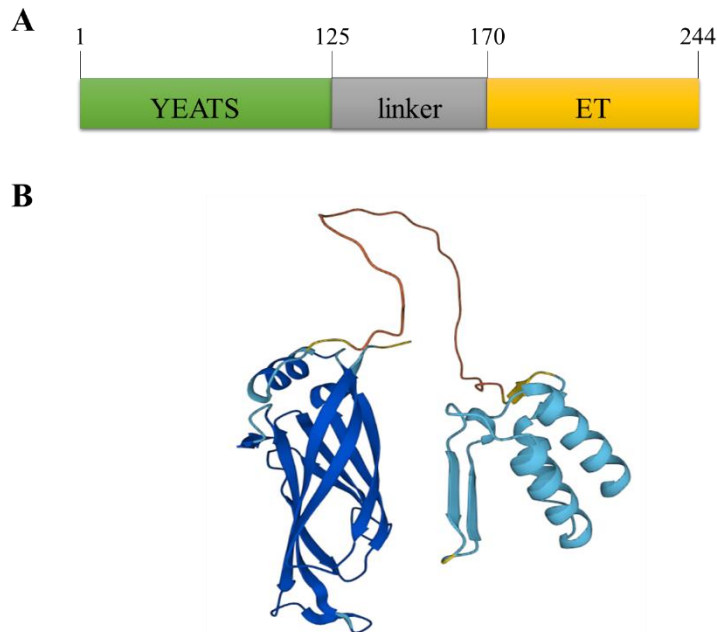
Esimest korda tuvastati *TAF14* skriiningul, kus leiti, et see on üks geenidest, mis võivad kodeerida aktiini siduvat valku või aktiini funktsiooni jaoks olulist valku (Vinh *et al.*, 1993).

taf14Δ mutandid on suurenenud tundlikkusega genotoksiliste ainete suhtes, nagu kofeiin (5 mM), hüdroksüurea (50 mM), UV (80 J/m²) ja metüülmetaansulfaat (0,03%) (Zhang *et al.*, 2004). Samuti sellised rakud veetavad G1 faasis palju rohkem aega (Erlich *et al.*, 2008).

S-faasis toimuvad transkriptsiooni- ja replikatsiooniprotsessid samal ajal, mis põhjustab sageli transkriptsioonisüsteemi ja peatunud replikatsioonikahvlite kokkupõrke. Sellega seoses täheldati, et Taf14 võiks olla ühenduslülilik transkriptsiooni ja replikatsiooni vahel (Erlich *et al.*, 2008).

1.3.1. Taf14 valgu struktuur

Taf14 on 244 aminohappest koosnev valk, mis sisaldab kaht struktuurset domeeni: **YEATS** ja **ET** (Joonis 2A, B), (*Saccharomyces Genome Database*, <https://www.yeastgenome.org/>; Schulze *et al.*, 2010). Domeenid täidavad eraldiseisvaid funktsioone (Schulze *et al.*, 2010). YEATS- ja ET-domeenid asuvad vastavalt valgu N- ja C-terminaalsetes otstes, olles omavahel ühendatud struktureerimata linkerpiirkonnaga (Joonis 2A, B), (Faure ja Callebaut, 2013; Zhang *et al.*, 2011).



Joonis 2. Taf14 valgu ehitus. A. Taf14 valgu skeem. On näidatud YEATS (roheline) ja ET domeenide (kollane) ning linkerpiirkonna (hall) asukohad. Numbrid tähistavad aminohappejääke. B. Taf14 valgu struktuur. YEATS domeen (tumesinine), linkerpiirkond (oranž), ET domeen (helesinine) (*AlphaFold Protein Structure Database*, <https://alphafold.ebi.ac.uk/>; Jumper *et al.*, 2021)

YEATS-domeen on evolutsiooniliselt konserveerunud valgustruktuur, mis sai oma nime esimeste avastatud seda domeeni sisaldavate valkude järgi (Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5) (Schulze *et al.*, 2009).

Taf14-s omab YEATS-domeen β -sandwich-struktuuri, mis koosneb kahest paralleelsest β -lehest, millest igaühel on neli β -ahelat ja neid ühendavad silmused. Struktuur on kompaktne ja stabiliseeritud külgnevate β -ahelate vaheliste vesiniksidemetega. YEATS-domeenil on spetsiifiline järjestus (Gly-Trp-Gly), mis on konserveerunud erinevates seda domeeni sisaldavates valkudes. β -ahelate vahelised silmused on suhteliselt paindlikud ja hõlbustavad Taf14 YEATS-domeeni suhtlemist oma partneritega. Taf14 YEATS-i domeen on negatiivse laenguga, mõjutades seeläbi interaktsioone teiste valkudega (Zhang *et al.*, 2011).

Pagaripärmis on lisaks Taf14 valgule veel kaks YEATS-domeeni sisaldavat valku, need on Yaf9 ja Sas5. Tüved, millel puudub kolmest valgust kaks, on vähenenud kasvuvõimega. Nende kolmekordne nullmutant ei ole elujõuline, mis viitab sellele, et YEATS-domeeni perekonna valgud on olulised (Zhang *et al.*, 2004).

On näidatud, et YEATS domeen interakteerub atsüülmodifitseeritud N-terminaalsete histooni sabadega (Shanle *et al.*, 2015). Taf14 valgus tunneb YEATS-domeen ära histooni H3 atsetüülitud ja krotonüülitud lüsiini 9 (H3K9), sealjuures tunneb suurema afiinsusega ära

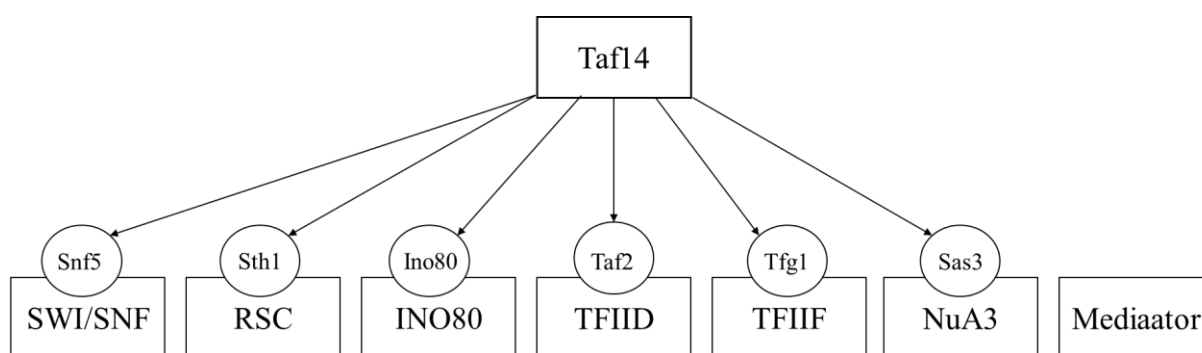
H3K9cr (Andrews *et al.*, 2016; Shanle *et al.*, 2015). Peil *et al.* (2020) näitasid, et kui pole võimalik modifitseerida H3K9, täidab YEATS domeen funktsioone alternatiivsete interaktsioonikohtade kaudu.

Kasvukiiruse analüüs genotoksiliste stressorite (hüdrosüüurea ja formamiid) juuresolekul näitas, et Taf14_{YEATSΔ} kasvab sarnaselt metsiktüüpi rakkudele, formamiidi puhul oli kiirus isegi suurenenud. C-terminaalse otsa deletsiooni korral rakud aga surid. Need tähelepanekud näitavad, et YEATS-i domeenil ja Taf14 C-terminaalsel alal võivad rakkudes olla erinevad funktsioonid ja et YEATS-domeen võib mängida stressitingimustes rakkude kasvus negatiivset rolli (Zhang *et al.*, 2011).

Võib öelda, et YEATS-i domeen on valgu jaoks üsna ebaoluline, kuna domeenivabad mutandid on minimaalse kasvupuudusega (Schulze *et al.*, 2010). Samas on tõenäoline, et Taf14 sisaldavatel kompleksitel on YEATS-domeeni tõttu täiendav aktiivsus, mis aitab kaasa nende lokaliseerimisele konkreetsetes kromatiini piirkondades rakustressi korral (Peil *et al.*, 2020).

ET-domeen on tuvastatud paljudes YEATS-i sisaldavates valkudes, sealhulgas pärmivalkudes Taf14 ja Sas5. Taf14 seondub kõigisse kompleksidesse, kuhu ta kuulub, just läbi ET-domeeni (Joonis 3), (Chen *et al.*, 2020).

Katsed näitavad, et ET-domeeni ekspresseerimine *taf14Δ* rakkudes võib täielikult kõrvaldada kasvupuuduse. See viitab sellele, et ET-domeenil on olulisem roll kui YEATS domeenil, ja kinnitab ka tõsiasja, et Taf14 seondub kompleksidega tänu ET-domeenile (Schulze *et al.*, 2010).



Joonis 3. Taf14 valgu seos erinevate valgukompleksidega. Kromatiini remodelleerimiskompleksid: SWI/SNF, RSC, INO80; transkriptsioonifaktorid IID ja IIF; histooni modifitseerimisensüüm NuA3; mediaator. Välja on toodud komplekside subühikud, millega Taf14 seondub.

Taf14 linkerosa on rikas positiivselt laetud aminohappejääkide poolest, mis võivad elektrostaatiliselt suhelda negatiivselt laetud DNA-ga. Taf14 linkerpiirkond interakteerub DNA-ga, pakkudes seeläbi täiendavat moodulit DNA sidumiseks Taf14 sisaldavate kompleksidega (Peil *et al.*, 2022).

Linkerpiirkond muutub rakkude elujõulisuse jaoks oluliseks Htz1 (histooni H2A.Z homoloog pärmil) valgu deleteerimisel. Htz1 sisaldavatel promootoraladel on kromatiini struktuur lahtisem ning selle valgu puudumisel on TFIID ligipääs DNA-le raskendatud. Ligandide puudumisel on Taf14 linkerpiirkond kaetud ümbritsevate YEATS- ja ET-domeenidega, mistõttu on Taf14 DNA sidumisfunktsioon autoinhibeeritud. Seondumine TFIID teiste subühikutega soodustab Taf14 konformatsioonilist ümberkorraldust, vabastades linkeri interaktsiooniks DNA ja nukleosoomidega (Peil *et al.*, 2022).

1.3.2. Taf14 sisaldavad valgukompleksid

1.3.2.1. ATP-sõltuvad remodelleermiskompleksid

ATP-sõltuvad remodelleerijad on kromatiini remodelleerivate faktorite klass, mis kasutavad ATP hüdroolüüsi energiat nukleosoomide struktuuri ja positsiooni muutmiseks. See protsess võib soodustada või pärssida geeniekspressiooni olenevalt konkreetsest remodelleerimisfaktorist ja selle sihtgeenidest. Kromatiini remodelleerijaid on neli perekonda, mis on süstematiseeritud ATPaasi subühikute sarnasuse ja erinevuse alusel (Clapier ja Cairns, 2009).

SWI/SNF kompleks

SWI/SNF on paljude eukariootide jaoks kõrgelt konserveerunud kompleks. Pärmil SWI/SNF mutandid on aeglasema kasvuga, võimetud kasutama mõningaid süsinikuallikaid ja spooride moodustumise defektidega (Sudarsanam *et al.*, 2000). *Saccharomyces cerevisiae*'s kompleks koosneb 12 allüksusest, millest üks on valk Taf14 (Rando ja Winston, 2012). Taf14 suhtleb kompleksiga Snf5 kaudu (Joonis 3), (Cairns *et al.*, 1996).

Olles kromatiini ümberkujundaja, aitab SWI/SNF-i kompleks transkriptsioonifaktoritel jõuda oma seondumiskohtade lähedale, mobiliseerib ja kannab üle histooni oktameere, tekitab DNA-s superspiraali keerdumist (Dechassa *et al.*, 2008). Terve genoomi analüüs näitab, et SWI/SNF on vajalik umbes 6% kogu pärmil genoomist transkriptsiooni reguleerimiseks (Sudarsanam ja Winston, 2000).

RSC kompleks

SWI/SNF perekonna teine liige on RSC kompleks, mis koosneb 17 allüksustest, sealhulgas Sth1-st, ATPaasi komponendist. Hoolimata asjaolust, et RSC ja SWI/SNF-i kompleksid on tihedalt seotud, reguleerivad nad kromatiini erinevaid piirkondi, kusjuures esimese kompleksi osalus on kriitilisem (Tang *et al.*, 2010). RSC nii eemaldab promootorilt nukleosoomi kui ka paigutab neid ümber. Kompleks osaleb kaudselt mitoosis, ja selle komponentide mutatsioonid viivad rakutsükli seiskumiseni G2/M staadiumis (Du *et al.*, 1998). Kromatiini immuunosadestamine on näidanud, et RSC on vajalik umbes 10% pärmi promootorite, sealhulgas nii tRNA promootorite kui ka Pol II poolt transkribeeritud promootorite transkriptsiooni reguleerimiseks (Lorch ja Kornberg, 2017).

Taf14 suhtleb RCS-ga katalüütilise allüksuse Sth1 kaudu (Joonis 3), (Kabani *et al.*, 2005). Allüksus Sth1 mängib otsest rolli rakutsükli progresseerumise reguleerimisel; selle allüksuse lagunemine viib kõigi kolme RNA polümeraasi töö lakkamiseni (Du *et al.*, 1998; Lorch ja Kornberg, 2017).

INO80 kompleks

Kolmas, ATP-st sõltuv kompleks INO80 on seotud nii transkriptsiooni, DNA parandamise kui ka replikatsiooniga (Conaway ja Conaway, 2009). *S. cerevisiae* puhul koosneb kompleks 15 allüksustest, sealhulgas ATPaasidest Ino80, Rvb1 ja Rvb2 (erineva rakulise aktiivsusega seotud ATPaasid) ning ka Taf14 valgust (Conaway ja Conaway, 2009; Morrison, 2017).

INO80 osaleb enam kui 20% pärmi geenide transkriptsioonilises aktiveerimises või represserimises (Conaway ja Conaway, 2009). INO80 korrastab promootori nukleosoomide arhitektuuri, samuti liigutab nukleosoomi pärast nende mobiliseerimist/destabiliseerimist, kasutades elongatsiooni protsessi, samuti on tal võimekus DNA kahjustuse korral eemaldada RNA polümeraas II (Poli *et al.*, 2017). Taf14 suhtleb INO80-ga Ino80 helikaasi allüksuse kaudu (Joonis 3), (Kabani *et al.*, 2005). Ino80 on oluline nukleosoomide äratundmiseks, ATP hüdrolüüsiks ja nukleosoomide libisemiseks (Conaway ja Conaway, 2009; Morrison, 2017).

1.3.2.2. NuA3

Nukleosoomseid histoone saab modifitseerida histooni atsetüültransferaaside (HATs) abil. Histooni atsetüültransferaase on kahte klassi, klass A on seotud kromosoomi histoonide transkriptsioonilise atsetüüleerimisega, klass B atsetüüleerib vabu histoone kromatiiniks kogumiseks (Grant *et al.*, 1997).

S.cerevisiae on neli HAT kompleksi: ADA, NuA4, NuA3, SAGA (John *et al.*, 2000). Histonide atsetüleerimise tulemusel on DNA-s I võimeline DNA-d lagundama, mis suurendab juurdepääsu transkriptsioonifaktoritele. NuA3 atsetüleerib histooni H3 (John *et al.*, 2000). See kompleks sisaldab kolme domeeni, mis seonduvad metüleeritud H3K4 ja H3K36-ga, samuti atsetüleeritud ja krotonüleeritud H3K9-ga. Taf14 on oluline just H3K9-ga seandumiseks (Martin *et al.*, 2017). NuA3 katalüütiliseks subühikuks on Sas3, mille kaudu seondub kompleksiga ka Taf14 (Joonis 3), (John *et al.*, 2000; Kabani *et al.*, 2005). Taf14 eemaldamine kompleksist põhjustab NuA3 HAT aktiivsuse mõõdukat vähenemist. Tõenäoliselt on Taf14 roll kompleksis tagada kompleksi seundumine kromatiiniga (John *et al.*, 2000).

1.3.2.3. Mediaator

Mediaatori ülesanne on edastada positiivset ja negatiivset regulatiivset informatsiooni transkriptsioonifaktorite vahel. Mediaator moduleerib RNA polümeraasi II-e aktiivsust promootorist sõltuvas transkriptsioonis. Kompleks koosneb 20 allüksusest (Myers ja Kornberg, 2000). Koostisesse kuulub ka Taf14, hetkel pole veel kirjeldatud Taf14 täpset funktsiooni kompleksis ja ka seda, mille kaudu Taf14 allüksus kompleksi integreerub (Henry *et al.*, 1994).

1.3.2.4. Üldised transkriptsioonifaktorid

TFIID

S. cerevisiae puhul koosneb kogu TFIID 15 TBP ja 14 TAF allüksusest, kusjuures Taf14 on neist ainsana asendatav (Sanders *et al.*, 2002). Stõhhiomeetriline analüüs näitas TFIID-s kuni kolme Taf14 valgu koopiat, mis on spetsiifiline ainult TIID-le (Feigerle ja Weil, 2016). Taf14 ühendub kompleksiga Taf2 valgu C-terminaalse osa kaudu (Joonis 3), (Feigerle ja Weil, 2016). Taf14 muutub TFIID jaoks oluliseks *htz1Δ* taustal. *Htz1Δ* rakkude ellujäämiseks on vajalikud, linkerpiirkond ja ET-domeen (Peil *et al.*, 2022). Taf14 võib mängida rolli TFIID promootori tuvastamisel (Peil *et al.*, 2022).

TFIIF

Saccharomyces cerevisiae TFIIF koosneb kahest alaühikust, Tfg1 ja Tfg2, mis on olulised pärmirakkude elujõulisuse jaoks, ja nõrgemini seotud Taf14 (Tfg3) (Henry *et al.*, 1994). Taf14 on kompleksiga seotud Tfg1-osa kaudu (Joonis 3), (Kabani *et al.*, 2005). Täheldatud on geneetilist koostoimet Taf14 ja transkriptsiooni elongatsioonifaktori TFIIIS vahel. Kumbki valkudest ei ole essentsiaalne, kuid topeltmutant põhjustab pärmiraku surma. Sellise mutandi letaalsust tõenäoliselt vahendab TFIIF (Fish *et al.*, 2006). Uuringud näitavad, et TFIIIS-i

sünteesilise letaalsuse päästmiseks on vajalik ja piisav ainult Taf14 C-terminaalne domeen (Schulze *et al.*, 2010).

1.4. Projekt „101 pärmitüve Eesti loodusest“

Käesolevas töös kasutati pärme pärmitüvede kollektsioonist „Pärmivaramu“, mis on kogutud teadusprojekti „101 pärmitüve Eesti loodusest“ raames aastatel 2018-2019. Projekti eesmärgiks oli Eesti loodusest eraldatud mitte-*Saccharomyces cerevisiae* pärmide tehnoloogiliselt oluliste omaduste analüüsimine ning saadud teadmiste kasutamine toidutööstuses. Projekt võimaldas ka üldhariduskoolides teadust populariseerida, kuna keskkooliõpilased olid projektiga otseselt seotud.

Üle kogu Eesti kogutud pärmiliikidest eraldati genoomne DNA ning sekveneeriti rDNA järjestuste vahel paiknevad piirkonnad ITS1 ja ITS2. Määratud järjestuste põhjal tehti kindlaks pärmi liigiline kuuluvus. Kolleksioonis on kokku 1757 tüve, millest liigiline kuuluvus on määratud 659 tüvele. Kolleksioon sisaldab vähemalt 79 erinevat pärmseene liiki ning enamus neist on esindatud mitmete erineva päritoluga isolaatidena. On teada ka vastava tüve kasvukoht (taime erinevad osad: leht, vili, õienektar jne) ning isoleerimise aeg. Kogutud pärme hoitakse 50% glütserooli ja pärmisöötme lahuses -80 °C juures. Kõikide tüvede puhul oli määratud nende optimaalne kasvutemperatuur ning etanooli ja glükoosi taluvus (vastavalt 0–20% ja 0–60%). Taf14 valgu geen on leitud 16-l erineval liigil.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Meie töörühma varasemalt avaldatud uuringutest selgus, et üllatuslikult on Taf14 valgu struktureerimata linkerpiirkond oluline pagaripärmi ellu jäämisel juhul, kui rakkudest on deleteeritud hitoonivariant Htz1 (Peil *et al.*, 2022). Samas konserveerunud YEATS domeeni eemaldamine pärmi elulemusele mõju ei avaldanud (Peil *et al.*, 2020).

Et teada saada, kas Taf14 valgul on veel piirkondi, millel on spetsiifilisi funktsioone, otsustati läbi viia Taf14 valgu erinevate variantide analüüs pagaripärmis. Selleks kasutati eesti loodusest isoleeritud, pagaripärmi endogeenselt valgust veidi erinevate, Taf14 valkude ekspresseerimist *S. cerevisiae*'s. Otsiti Taf14 varianti, millel oleks mõju pagaripärmi elulemusele, et seejärel valkude järjestusi võrreldes leida piirkond, mis pagaripärmis ja loodusest isoleeritud pärmi Taf14 valgus on oluliselt erinev ning võib põhjustada leitud fenotüübilise erisuse.

Eesmärgi saavutamiseks seati mitu ülesannet:

1. *TAF14* geenide amplifitseerimine loodusest isoleeritud pärmidest ja klonimine.
2. Uute pagaripärmi tüvede, mis sisaldavad eri liikide *TAF14* geeni, konstrueerimine kasutades plasmidivahetussüsteemi.
3. Eri liikidest pärit *TAF14* geenide ekspressiooni tuvastamine pagaripärmis.
4. Fenotüübiliste andmete hindamine, lähtudes pagaripärmi kasvust eri temperatuuridel.

2.1. Materjal ja meetodika

2.1.1. Kasutatud söötmed

Pärmitüvede kasvatamiseks kasutati **pärmiekstrakt-peptoon-dekstroos** (YPD, *yeast extract, peptone, dextrose*) tard- ja vedelsöötmeid. Söötme komponendid: 20 g/l agar (tardsöötmes); 10 g/l pärmiekstrakt; 20 g/l mükoloogiline peptoon; 20 g/l glükoos; deioniseeritud vesi.

Transformeeritud pärmitüvede selekteerimiseks kasvatati rakke **selektiivsöötme**l, kust oli välja jäetud aminohape histidiin. Söötme tegemiseks kasutati 6,7 g/l pärmi lämmastikaluseid (YNB, *yeast nitrogen base*); 20 g/l glükoosi; 20 g/l agarit; aminohapete ja nukleotiidide segu- 80 µg/ml leutsiin, 80 µg/ml lüsiin, 40 µg/ml trüptofaan, 20 µg/ml adeniin, 20 µg/ml uratsiil.

URA3 markergeeni puudumise kontrollimiseks kasutati **5-FOA selektiivsöödet**, mis sisaldas lisaks 1 mg/ml 5-FOA.

Lahjendusrea analüüsi läbiviimiseks kasutati **süntetilist täissöödet** (SC, *synthetic complete medium*), millele lisati kõiki eelpool mainitud aminohappeid ja nukleotiide.

Pärmirakke kasvatati 30 °C juures, vedelkultuure aereeriti loksutil 200 pööret/min.

Töös kasutatud *E.coli* (DH5 α) kasvatamiseks kasutati **LB** (*lysogeny broth*) **tard-ja vedelsöödet**, kuhu oli lisatud ampitsilliini (100 μ g/ml). Vedelsööde sisaldas 10 g/l trüptooni; 5 g/l pärmiekstrakti; 10 g/l NaCl ja 100 μ g/ml ampitsilliini. Tardsöötmel valmistamiseks lisati eelpool kirjeldatud komponentidele 20 g/l agarit. Rakke kasvatati 37 °C juures, vedelkultuuri aereeriti loksutil 180 pööret/min.

2.2.2. Kasutatud pärmitüved, oligonukleotiidid, plasmiidid

Käeolevas töös kasutatud pärmitüvede genotüübid ning nende päritolu on kirjeldatud Lisas 1, Tabelis 1. Töös kasutatud pagaripärmitüvi põhineb tüvel W303, mida kasutati AKY1351 tüve loomiseks. AKY1351 tüvest on deleteeritud *TAF14* geen kasutades KanMX markerit ning tüvi ekspresseerib pRS416 plasmiidilt *ScTAF14* valku. Töö raames konstrueeriti uut pärmitüve, mis saadi AKY1351 transformeerimisel pRS413-Xx*TAF14* plasmiididega (Lisa 2, Tabel 2).

Töös kasutatud oligonukleotiidide järjestused ja kasutus on täpsustatud Lisas 3, Tabelis 3.

Töös kasutatud plasmiidid on konstrueeritud pRS413 plasmidi baasil. Kõik kasutatud plasmiidid on ära toodud Lisas 2, Tabelis 2.

2.2.3. Plasmiidide konstrueerimine

Töö esimeseks etapiks oli pagaripärmis eri liikide *TAF14* geeni ekspresserivate vektorite konstrueerimine. Loodusest isoleeritud pärmitüvedest eraldati genoomne DNA ning amplifitseeriti uuritav *TAF14* geen. *TAF14* geeni fragment sisestati restriктаasidega avatud pRS413-3xFLAG plasmidi. Saadud rekombinantset vektorid viidi kompetentsetesse *E.coli* rakudesse. Transformante kontrolliti PCR-i abil ning õigeks osutunud kolooniast eraldati plasmiidne DNA.

Genoomse DNA eraldamine loodusest isoleeritud pärmiliikidest

3–4 pärmikolooniat suspendeeriti 100 μ l-s lüüsilahuses (200 mM LiOAc, 1% SDS). Rakususpensiooni inkubeeriti 15 minutit 70 °C juures. DNA sadestati 300 μ l 96% etanooliga. Proovi tseentrifuugiti 3 minutit 15 000 rcf-ga. Eemaldati supernatant, sade lahustati 100 μ l-s TE

(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-NaOH) puhvis ning tsentrifuugiti 15 sekundit 15 000 rcf juures (Lööke *et al.*, 2011).

TAF14 geeni amplifitseermine PCR-i abil

Eri pärmiliikidest eraldatud genoomset DNA-d kasutati, et amplifitseerida *TAF14* geen koos järgnevat kloneerimist võimaldavate restriктаaside ärrandmiskohtadega geeni 5' ja 3' otstes. Reaktsioonisegu kogumaht oli 25 µl. Kasutatud komponendid: 5 µl 5x PCR puhver (*5x Phusion Green HF Buffer, Thermo Scientific*); 1 µl 5 mM nukleotiidide segu; 3,5 µl 10 µM praimerite segu (erinevate pärmiliikide praimerite järjestused on ära toodud Lisas 1, Tabelis 1); 1 µl eraldatud genoomne DNA; 0,4 µl DNA polümeraas (2 U/µl; *Phusion DNA Polymerase, Thermo Scientific*); 14,1 µl deioniseeritud vesi. *TAF14* geeni amplifitseerimiseks kasutati järgmist programmi:

Algne denaturatsioon:	98 °C, 2 minutit	
Denaturatsioon:	98 °C, 15 sekundit	} 33 tsüklit
Praimerite seondumine:	60 °C, 20 sekundit	
Ekstensioon:	72 °C, 45 sekundit	
Lõplik ekstensioon:	72 °C, 5 minutit	

PCR produktide visualiseerimiseks kasutati TAE (40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA) puhvis 1% agaros-geeli etiidium-bromiidiga (EtBr, 0,5 µl/ml). Geelile pipeteeriti 3 µl igast PCR proovist ning 5 µl DNA suurusmarkerit (0,5 µg/µl; *GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific*). Elektroforees kestis 15–20 minutit pingel 100–120 V.

Kontrollitud PCR proovidele lisati 75 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-NaOH) puhvrit, 40 µl 3M NaAc ja 300 µl 96% etanooli. DNA sadestati -20 °C juures minimaalselt 20 minutit. Proove tsentrifuugiti 15 minutit 15 000 rcf-ga. Eemaldati supernatant ning sadet pesti 500 µl 70% etanooliga. Saadud suspensiooni tsentrifuugiti 5 minutit 15 000 rcf juures. Sade võeti üles 20 µl-s deioniseeritud vees. DNA kontsentratsioon määrati kasutades spektrofotomeetrit (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific*). Saadud DNA kontsentratsioonid olid vahemikus 100–200 ng/µl.

TAF14 geeni ja pRS413 plasmidi restriksioon

Plasmiidid konstrueeriti pRS413 seeria plasmidi baasil. Töögrupis eelnevalt valmistatud algplasmiid (pRS413-3xFLAG-ScTAF14) sisaldab ScTAF14 geeni, pärmispetsiifilise markergeeni (*HIS3*); 3xFLAG epitoop-järjestust.

PCR produkti restriksioonisegu kogumaht oli 20 µl. Segu sisaldas 15 µl PCR produkti; 2 µl puhvrit (*10x Buffer Tango, Thermo Scientific*); 2 µl 10 U/µl restriктаaside segu (XbaI TCTAGA ja BamHI GGATCC – *C. railenensis, H. opuntiae* ja *C. parapsilosis*; XbaI TCTAGA ja BglII AGATCT – *M. pulcherrima*); 1 µl deioniseeritud vett. **Plasmiidi** restriksioonisegu kogumaht oli 40 µl. Segu sisaldas 2000 ng pRS413-3xFLAG-ScTAF14 plasmidi; 2 µl 10 U/µl restriктаaside segu (XbaI TCTAGA ja BamHI GGATCC); 4 µl puhvrit (*10x Buffer Tango, Thermo Scientific*); lõppmahuni deioniseeritud vett. Restriksioon kestis minimaalselt 1,5 tundi 18 °C juures.

Restrikteeritud vektor ja TAF14 geen eraldati 1% agarosgeelil. Plasmiidi eraldamiseks geelist kasutati *Favor Prep Gel purification Mini Kit*-i. Kõik etapid tehti vastavalt tootja (*Favorgen*) poolt antud juhiste. Restrikteeritud plasmidi sadestati nagu eelnevalt kirjeldatud.

TAF14 geeni ligeerimine restrikteeritud plasmidi

Reaktsioonisegu kogumaht oli 20 µl. Segu sisaldas 1 µl T4 DNA ligaasi (1 U/µl; *T4 DNA Ligase, Thermo Scientific*); 2 µl ligaasi puhvrit (*T4 ligase 10x Buffer, Thermo Scientific*); 70 ng restrikteeritud PCR produkti; 150 ng restrikteeritud plasmidi; lõppmahuni deioniseeritud vett. Vektori ja inserdi molaarne suhe oli vastavalt 1:3. Ligeerimisprotsess kestis minimaalselt 2 tundi toatemperatuuril.

Transformatsioon

Kompetentsetele *E.coli* (DH5α) rakkudele lisati 4,5 µl ligeeritud plasmidi. Suspensiooni hoiti 10 minutit jääl. Rakkudele tehti kuumašokk, 45 sekundit 42 °C juures. Rakususpensioonile lisati 700 µl LB söödet ning asetati loksutama (800 rpm) 40 minutiks 37 °C juures. Rakud tsentrifugeeriti tuubi põhja, eemaldati 600 µl supernatanti ning külvati ampitsilliini (100 µg/µl) sisaldavale LB tassile.

Transformatsioonil saadud bakterikolooniate kontroll PCR-ga

Reaktsioonisegu kogumaht oli 10 µl. Segu sisaldas: 2 µl PCR Mix (*5x FirePol Master Mix, 12,5 mM MgCl₂, SolisBiodyne*); 0,5 µl 10 µM praimerite segu (erinevate pärmiliikide ja

kontrollpraimerite järjestused on ära toodud Lisas 3, Tabelis 3); 1 bakterikoloonia; 7,2 µl deioniseeritud vett. PCR masinas käivitati järgmine programm:

Algne denaturatsioon:	95 °C, 5 minutit	
Denaturatsioon:	95 °C, 25 sekundit	} 30 tsüklit
Praimerite seondumine:	56 °C, 30 sekundit	
Ekstensioon:	72 °C, 40 sekundit	
Lõplik ekstensioon:	72 °C, 5 minutit	

PCR produktide visualiseerimiseks kasutati 1% agaros-geeli TAE (40 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA) puhvrts ja etiidium-bromiidiga (EtBr, 0,5 µl/ml). Geelile pipeteeriti 10 µl PCR proovi ning PCR-i produkti pikkuse kindlaks tegemiseks 5 µl DNA suurusmarkerit (0,5 µg/µl; *Genekuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific*). Geel jooksis 15–20 minutit pingel 100–120 V. Õige osutunud kolooniaid kasvatati 2 ml-s ampitsiliini (100 µg/ml) sisaldavas LB vedelsöötmes.

Plasmiidid eraldati kasutades *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit* vastavalt tootjapoolsetele (*Favorgen*) juhistele. Plasmiidi kontsentratsioonid mõõdeti spektrofotomeetriga (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific*). Kontsentratsioonid olid vahemikus 50–350 ng/µl. Eraldatud proviidest saadud plasmiidid saadeti sekveneerimisele Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse.

2.2.4. Plasmiidivahetussüsteem

Käesolevas töös kasutatud pärmitüves (AKY1351) on eemaldatud genoomne *TAF14* geen ning elujõulisuse tagamiseks viidud rakkudesse *TAF14* geeni ekspresseriv plasmiid, mis sisaldab selekteerivat *URA3* markergeeni. *URA3* marker võimaldab negatiivset selektsiooni kui rakke kasvatatakse 5-FOA söötmel. *URA3* kodeerib orotidiin-5'-fosfaat dekarboksülaasi, ensüümi, mis muudab 5-FOA rakule mürgiseks aineks, seetõttu rakud on sunnitud *URA3* markergeeniga plasmiidi elimineerima. Töös konstrueeritud vektorid sisaldavad eesti loodusest isoleeritud pärmiliikide *TAF14* geeni ning selektsioonimarkerina *HIS3* geeni. Etapi eesmärgiks oli vahetada ScTaf14 valku ekspresseeriv plasmiid pRS416-Sc*TAF14* loodusest isoleeritud *TAF14* geeni ekspresseerivate pRS413-*TAF14* vektori vastu. Konstrueeritud vektor transformeeriti vastuvõtvasse tüvesse, selekteerimiseks kasvatati -HIS selektiivsöötmele. Saadud kolooniad külvati 5-FOA-d sisaldavale söötmele. Tulemuseks on saadud uued tüved, kus rakud kaotasid

URA3 markergeeniga plasmidi ning alles jäi *HIS3* markergeeniga plasmid koos loodusest isoleeritud pärmiliigi *TAF14* geeniga.

Plasmidi transformatsioon pagaripärmi

Plasmidi transformeerimiseks pagaripärmi kasutati LiOAc meetodit. *Saccharomyces cerevisiae* (AKY1351) rakke kasvatati üleöö 30 °C juures, kus nad saavutasid oma eksponentsiaalse kasvufaasi ning rakkude tihedus oli ligikaudu 1×10^7 rakku/ml. 1,5 ml pärmikultuuri tsentrifugiti 3 minutit 5 000 rcf juures, sade suspendeeriti 500 µl LiOAc + TE (0,1 M LiOAc + TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-NaOH)) lahuses. Rakususpensiooni tsentrifugiti 3 minutit 5 000 rcf juures. Eemaldati supernatant, sade suspendeeriti 40 µl LiOAc+ TE (0,1 M LiOAc + TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-NaOH)) lahuses ning lisati 4 µl *carrier*-DNA-d (10 mg/ml), mis oli eelnevalt denatureeritud 6 minutit 95 °C juures ja jääl jahutatud.

Transformatsioonisegu komponendid: 50 µl kompetentseid rakke ja 500 ng plasmiidset DNA-d. Segu hoiti 5 minutit toatemperatuuril. Suspensioonile lisati 300 µl LiOAc + PEG4000 (0,1 M LiOAc + TE + 40% PEG4000), inkubeeriti toatemperatuuril 15 minutit ning lisati 30 µl DMSO-t (*Methyl sulfoxide 99,7% pure, Acros organics*). Rakkudele tehti kuumašokk, 10 minutit 42 °C juures ja 1 minut jääl. Proovi tsentrifugiti 3 minutit 3 000 rcf-ga. Eemaldati supernatant, rakusade suspendeeriti 150 µl deioniseeritud vees ning külvati histidiiniga selektiivtassile. Rakud kasvasid 2–3 päeva 30 °C juures.

Histidiiniga selektiivsöötmele kasvanud rakud külvati 5-FOA-d sisaldavatele söötmetassidele. Rakke kasvatati 3–4 päeva, et toimuks plasmidvahetus. 5-FOA tassil kasvatatud rakud on sunnitud elimineerima *URA3* geeni sisaldava plasmidi. Saadud pärmikolooniat kontrolliti, kasvatades üht ja sama koloonia nii -HIS kui ka -URA selektiivsöötmele. Nendest kolooniatest, mis kasvasid -HIS ning ei kasvanud -URA söötmele valiti välja üks ning külvati YPD tardsöötmele. Kasvanud pärmirakud koguti ning külmutati 50%-lises glütseroolilahuses ning säilitati -80 °C juures.

2.2.5. Valkude immuunodetektsioon

Pärmitüvesid kasvatati 16–17 tundi 2 ml YPD vedelsöötmes 30 °C loksutis (200 rpm). Rakke tsentrifugiti 1 minut 5 000 rcf-ga 4 °C juures, eemaldati sööde. Rakusade pesti 1 ml jääkülma deioniseeritud veega ja 1 ml jääkülma 2M LiAc, segu hoiti 5 minutit jääl. Suspensiooni tsentrifugiti 1 minut 5 000 rcf-ga 4 °C juures ning eemaldati supernatant. Sade pesti 1 ml jääkülma 0,4M NaOH lahusega, segu hoiti 5 minutit jääl. Suspensiooni tsentrifugiti 1 minut

5 000 rcf-ga 4 °C juures, eemaldati supernatant. Sade võeti üles 100 µl 2xSDS (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS) puhvris. Lüsaati sonikeeriti (*Diagenode Bioruptor, sonikeerimistugevus H (kõrge)*) 30 sekundit. Pärast sonikeerimist inkubeeriti rakulüsaati 5 minutit 95 °C juures, segati segajal 10 sekundit maksimumtugevusel ning tsentrifuugiti 5 minutit 15 000 rcf-ga. Supernatant koguti uude tuubi.

Valkude suuruse järgi lahutamiseks kasutati 12% SDS-polüakrüülamiid geeli. **15% SDS-polüakrüülamiidgeeli lahutava osa komponendid:** 2 ml 30% akrüülamiid (*acrylamide-solution (30%) mix 37,5:1, PanReac AppliChem*); 1,3 ml 5M Tris-HCl (pH 8.8); 50 µl 10% SDS; 50 µl 10% ammonium persulfaat; 2 µl TEMED (*TEMED, PanReac AppliChem*); 1,6 ml deioniseeritud vesi. **5% SDS-polüakrüülamiidi kontsentreeriv geeliosa komponendid:** 170 µl 30% akrüülamiid (*acrylamide-solution (30%) mix 37,5:1, PanReac AppliChem*); 130 µl 1M Tris-HCl (pH 6.8); 10 µl 10% SDS, 10 µl 10% ammonium persulfaat; 1 µl TEMED (*TEMED, PanReac AppliChem*); 680 µl deioniseeritud vesi.

Geelile kanti 15 µl rakulüsaati, ning 3 µl valgumarkerit (*Precision Plus Protein WesternC, Bio-Rad*). Esmalt (15–20 minutit) foreesi viidi läbi 110 V juures. Kui valgud jõudsid lahutava geeliosani, lisati pinget kuni 150 V. Geel jooksis 90-100 minutit.

Valkude ülekandmiseks polüakrüülamiidgeelilt PVDF membraanile (*PVDF transfer membrane 0,2 µm, 26,5 cm x 3,75 m, Thermo Scientific*) kasutati poolkuiva ülekande meetodit. Polüakrüülamiidgeeli inkubeeriti ülekandepuhvris (25 mM Tris; 192 mM glütsiin, pH 8,3; 20% metanool). Enne *sandwich* kokkupanekut PVDF membraan aktiveeriti metanoolis. Ülekande protsessi läbiviimiseks kasutati transblotteri masinat (*Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad*). Ülekanne viidi läbi minimaalselt 45 minut 15 V pingel.

Peale ülekande lõppu blokeeriti PVDF membraani 25 ml blokeerimilahusega (5% lõssipulber, *Powdered milk, Roth*), 1xPBS (*Phosphate buffered saline*) Tween-20 (0,05%)) ning inkubeeriti 1 tund kalluti loksutades. Seejärel lisati membraanile primaarne antikeha (1 mg/ml; *anti-FLAG M2, Sigma-Aldrich; F3165*) lahus (5% lõssilahus, 1/10 000 lahjendus), ning inkubeeriti üleöö 4 °C juures.

PVDF membraan pesti 30 minuti jooksul pesulahusega (1xPBS, 0,05% Tween-20) kallutil, lisati sekundaarse antikeha (1 mg/ml; *Goat anti-Mouse-HRP, Invitrogen*) lahus (5% lõssilahus 1/15 000 ning inkubeeriti 1 tund kallutil loksutades. Membraan pesti 30 minuti jooksul pesulahusega kallutil. PVDF membraani inkubeeriti 5 min 2 ml substraadilahusega (1:1, luminool ja peroksiidi lahus (*Immobilon Chemiluminiscent HRP Substrate, Millipore*)) ning

signaali detekteerimiseks kasutati Bio-Rad ChemiDoc XRS + System aparati and Image Lab 6.0 programmi.

2.2.6. 10-kordse lahjendusrea analüüs

S.cerevisiae Taf14 ja teiste pärmiliikide Taf14 valke ekspresseerivate rakkude kasvu võrdlemiseks kasutati lahjendusrea analüüsi. Pärmikolooniat suspendeeriti 400 µl deioniseeritud vees. Rakukultuuri tihedus mõõdeti spektrofotomeetriga (NanoDrop 1000). Tihedus peaks olema u. 3×10^7 rakku/ml. Valmistati 10-kordne rakkude lahjendus vees, kus kõige kontsentreeritum suspensioon sisaldab 10 000 rakku/µl ning kõige lahjem suspensioon sisaldab 1 rakku/µl. 5 µl lahjendust tilgati SC+AA agarile ning inkubeeriti erinevatel temperatuuridel (25°, 30°, 37°) juures 3 päeva. Tulemused fikseeriti pildistamisega (*EPSON Perfection 1200, Seiko Epson Corporation*).

2.3. Tulemused

Saccharomyces cerevisiae Taf14 valgu seni defineerimata või ka juba teadaoleva funktsiooniga struktuurelementide detailsemaks uurimiseks otsustati kasutada valgu mutatsioonanalüüsi. Laboris loodud mutantide asemel kasutati aga looduses esinevaid eri pärmiliikide *TAF14* geeni variante (Joonis 4).

2.3.1. Erinevate pärmiliikide Taf14 valkude omavaheline võrdlus

„101 pärmitüve Eesti loodusest“ projekti raames kogutud pärmiliikide hulgast tehti kindlaks, millistel liikidel esineb potentsiaalseid Taf14 valgu homolooge. Erinevate pärmiliikide genoomide analüüsil leiti, et Taf14 valgu geeni leidus 16-l erineval liigil. Edasisteks katseteks valiti neist välja neli: *Metschnikowia pulcherrima* (MpTaf14), *Hanseniaspora opuntiae* (HoTaf14), *Candida parapsilosis* (CpTaf14), *Candida railenensis* (CrTaf14). Välja valitud liikide Taf14 valgujärjestuste joondamisel (Joonis 4A) leiti, et ka vaadeldavatel liikidel on YEATS domeen (ah 1-125) kõrgelt konserveerunud. Kõikides liikides esineb GWG järjestus (ah 80-82 ScTaf14 puhul), mis on YEATS domeenide tunnuseks. Selle järjestuse muteerimisel ei seonu YEATS domeen enam H3 atsetüleeritud variandiga (Shanle *et al.*, 2015). Järgmine blokk (oriendruvalt ah 125-170) on mittestruktuurne linkerpiirkond, kus esinevad kõige suuremad erinevused Taf14 valkudes. Viimane blokk (ah 170-244) on ET domeen, mis samuti sisaldab palju konserveerunud positsioone. Järjestuste võrdlus näitas, et kõige suurem erinevus eri liikide Taf14 valkude vahel jääb vahemikku 137-170, ehk linkerpiirkonda.

ScTaf14 ja HoTaf14 on YEATS domeeni osas üksteisega sarnasemad kui teised liigid. HoTaf14 on konkurentsilt pikim valk. Domeenis ET just vatupidi ScTaf14 ja HoTaf14 on kõige erinevad. Linkerpiirkonnas on kõige suurem erinevus ScTaf14-st HoTaf14 ning kõige sarnasem selles alas ScTaf14-ga on CrTaf14. ET domeeni piirkonnas üksteisega kõige sarnasemad on ScTaf14 ja MpTaf14.

Taf14 valgularjenduste alusel loodud fülogeneetiline puu (Joonis 4B), näitab, et *S. cerevisiae* on evolutsiooniliselt kaugem *C. parapsilosis*-ist ja *C. railenensis*-ist. *S. cerevisiae* Taf14 järjestus on evolutsiooniliselt kõige lähem *H. opuntiae* Taf14 valgule.



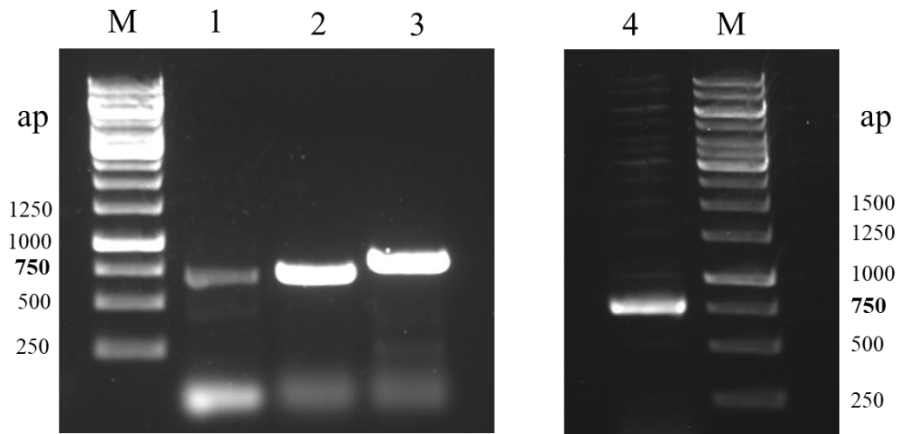
Joonis 4. Erinevate pärmiliikide Taf14 valgularjenduste joondamine ja fülogeneetiline puu. Pärimitted: *Saccharomyces cerevisiae* (ScTaf14), *Metschnikowia pulcherrima* (MpTaf14), *Candida parapsilosis* (CpTaf14), *Hanseniaspora opuntiae* (HoTaf14), *Candida railenensis* (CrTaf14). A. Värvid tähistavad aminohapete füüsikalise-keemilisi omadusi. Väikesed ja hüdrofoobsed aminohapped (punane); happelised aminohapped (sinine); aluselised aminohapped (magenta); hüdroksüül-, sulfhüdrüül- ja amiini jääkidega aminohapped (roheline). Legend: * konserveerunud järjestus; : konservatiivne mutatsioon; . poolkonservatiivne mutatsioon; - lünk. Värvitud jooned tähistavad Taf14 erinevaid struktuure: YEATS domeen (roheline); linker piirkond (hall); ET domeen (kollane). B. Fülogeneetiline puu. Joondamiseks ja fülogeneetilise puu konstrueerimiseks kasutati Clustal Omega programmi (McWilliam *et al.*, 2013).

2.3.2. Erinevate pärmiliikide *TAF14* geeni ekspresseerivate vektorite konstrueerimine

Taf14 valkude joondamise ja fülogeneetilise puu analüüs näitas, et „Pärmivaramust“ välja valitud pärmiliikide *TAF14* geenid on sobilikud kandidaadid Taf14 valgu funktsioonide uurimiseks, kuna sisaldavad nii konserveerunud alasid kui ka üksteisest oluliselt erinevaid järjestuselemente. Võrdlemaks, kuivõrd aminohappejääkide järjestusest tulenevad erinevused mõjutavad pagaripärmi elulemust, konstrueeriti pagaripärmi tüved, milles endogeenne *TAF14* oli deleteeritud ning tüved ekspresseerisid erinevate liikide Taf14 valke. Esmalt isoleeriti loodusest kogutud pärmidest *TAF14* geen, kloneeriti see 3-kordset FLAG epitoomärgist (3xFLAG) kandvasse ekspressioonivektorisse ning transformeeriti töögrupis varasemalt valmistatud pärmitüvesse (*S. cerevisiae* AKY 1351). Taf14 valkude ekspressiooni kontrolliti immunodetektsiooniga.

2.3.2.1. *TAF14* geeni amplifitseerimine loodusest isoleeritud pärmidest

TAF14 geeni amplifitseerimiseks nelja erineva loodusest isoleeritud pärmiliigi (vastavalt *Metschnikowia pulcherrima* (MpTaf14), *Hanseniaspora opuntiae* (HoTaf14), *Candida parapsilosis* (CpTaf14), *Candida railenensis* (CrTaf14) genoomidest kasutati liigispetsiifilisi primereid (Lisa 3, Tabel 3), mille otstesse disainiti erinevate restriiktaaside äratundmiskohad. *TAF14* geeni eeldatavad pikkused on järgmised: *M. pulcherrima* 727 ap; *H.opuntiae* 880 ap; *C. parapsilosis* 784 ap; *C. railenensis* 769 ap. Agaros-geelektroforeesil (Joonis 5) on visualiseeritud geeniamplifikatsiooni tulemused. Rajal M on näha DNA molekulmassi marker vahemikus 250 kuni 10 000 aluspaari. Radadel 1–4 on näha kõigi amplifitseeritud *TAF14* geenide signaale, mis vastavad nende eeldatavatele suurustele. Kuna geelile kanti vaid 12% kogu PCR-i reaktsioonist, leiti, et kõigi *TAF14* geenide amplifikatsiooni saagikus oli piisavalt hea, et jätkata katse järgmiste etappidega.

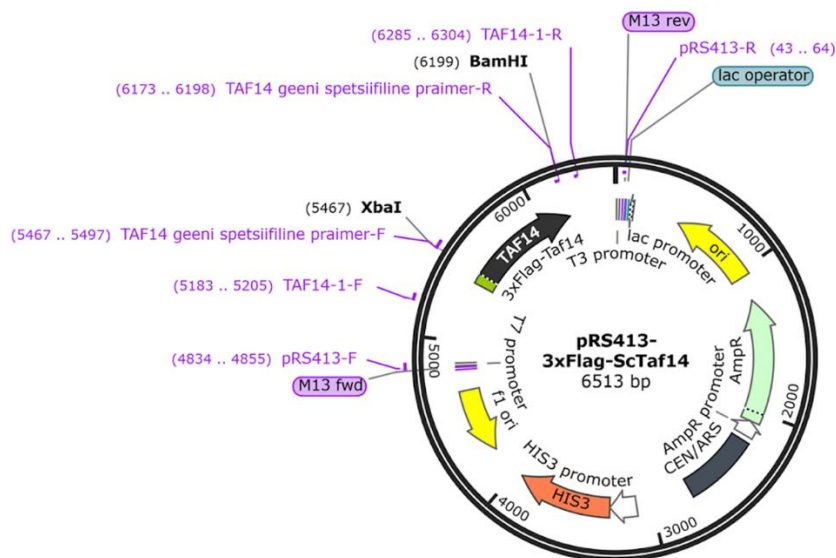


Joonis 5. Taf14 geenide amplifikatsiooni kontroll agarosgeelelektroforeesil. 1. *M. pulcherrima* TAF14 727 ap; 2. *C. railenensis* TAF14 769 ap; 3. *H. opuntiae* TAF14 880 ap; 4. *C. parapsilosis* TAF14 784 ap. M tähistab DNA pikkusmakerit (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*); ap - aluspaar. 1% agarosgeelelektroforees, DNA on visualiseeritud UV-valguses kasutades etiidiumbromiidi.

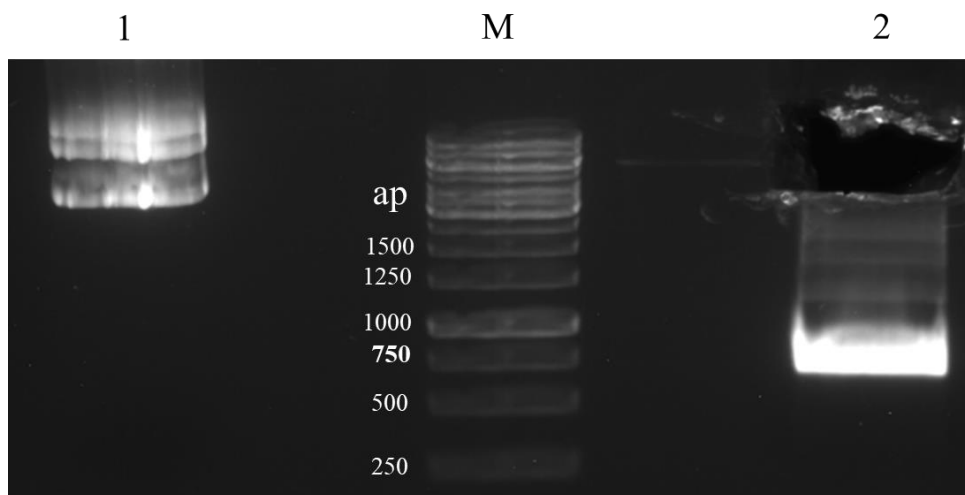
2.3.2.2. pRS413-3xFLAG-Taf14 plasmiidide konstrueerimine

Amplifitseeritud *TAF14* geenid kloneeriti varasemalt töögrupi poolt konstrueeritud pRS413-3xFLAG-Sc*TAF14* plasmidi (Joonis 6), milles ekspresseerub ka N-terminaalne 3xFLAG-epitoojärjestus. Kuna algne pRS413 plasmid ekspresseerib *S. cerevisiae* *TAF14* geeni, siis lõigati see plasmidi lineariseerimisel kasutatud vektorist välja. Plasmidi restriksioon viidi läbi, kasutades restriksiooniensüüme XbaI ja BamHI (XbaI-TCTAGA; BamHI-GGATCC). Saadud fragmendid eraldati elektroforeesi abil agarosgeelis (Joonis 7). Esimesel rajal oli jälgitav lõikamata plasmid, mis toimis kontrollina ja oli kogusuurusega 6513 ap, kaasa arvatud 3xFLAG-Sc*TAF14* geen pikkusega 801 ap. Rajal nr. 2 detekteeriti kahte signaali, mille oodatavad DNA molekulide suurused olid 5782 ap ja 731 ap, vastavalt pRS413 vektori tüvi ja plasmidist eraldatud *S. cerevisiae* *TAF14* geen. Kuna agarosgeeli elektroforeesi tulemused näitasid DNA edukat lõikamist restriksiooniensüümi poolt, eraldati geelist vektor-DNA ja jätkati katse järgmiste etappidega.

Eri liikide amplifitseeritud *TAF14* geene lõigati restriksiooniensüümidega XbaI ja BamHI (*C. railenensis*, *H. opuntiae* ja *C. parapsilosis*) või XbaI ja BglII (*M. pulcherrima*). Viidi läbi ligatsioonireaktsioon koos geelist eraldatud vektoriga ning transformeeriti saadud vektorid kompetentsetesse *E. coli* (DH5 α) rakkudesse.



Joonis 6. pRS413-3xFlag-ScTAF14 plasmidi skeeme. Joonisel on ära toodud praimerite seondumiskohad (lilla); restriktasid XbaI ja BamHI lõikekohad (must); 3x FLAG-epitoojärjestus (tumedam roheline); TAF14 geen (tumehall); markergeen HIS3 (oranž). Plasmid on tehtud programmis Addgene (Addgene, <https://www.addgene.org/>).



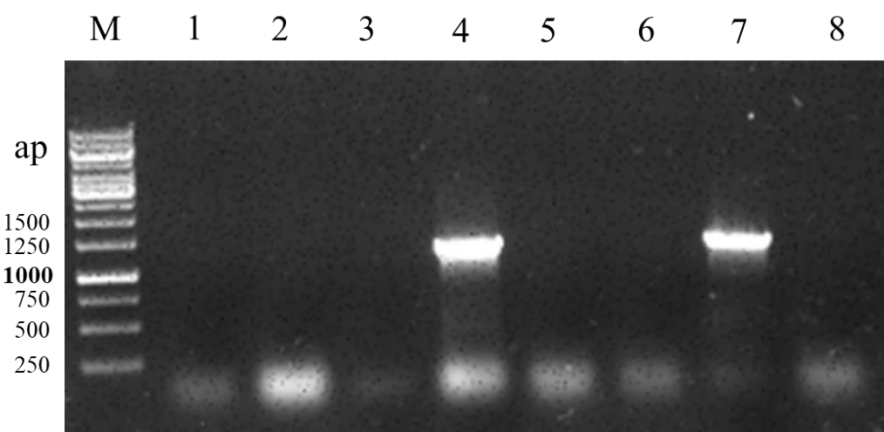
Joonis 7. pRS413-3xFLAG-ScTAF14 plasmidi restriksioon BamHI ja XbaI restriktasididega. 1. restrikteerimata plasmid pRS413-3xFLAG-ScTAF14 (6513 ap); 2. 5782 ap restrikteeritud vektori geelist eraldamise jälg ja ScTAF14 pikkusega 731 ap. 1% agarose-geelelektroforees, DNA on visualiseeritud UV-valguses kasutades etiidumbromiidi. M tähistab DNA pikkusmakerit (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*); ap - aluspaar.

2.3.2.3. Transformatsioonil saadud bakterikolooniate kontroll

Järgmiseks etapiks oli bakterikolooniate kontroll-PCR läbiviimine, et kontrollida kloneerimise edukust. Selleks kasutati praimerite paare (Joonis 6, Lisa 3, Tabel 3), mis olid spetsiifilised retsipientvektorile – TAF14-1-F ja TAF14-1-R. Kontroll-PCR viidi läbi mitu korda, kuna

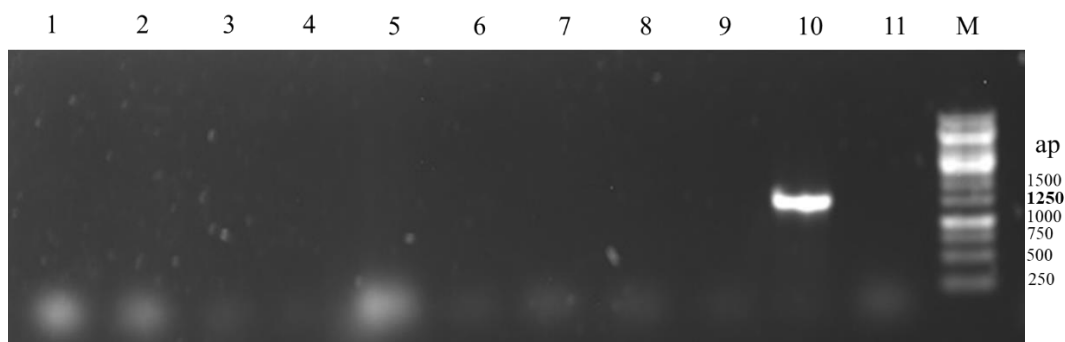
oodatud plasmidi sisaldavaid kolooniaid esimesel korral ei tuvastatud. Töös on esitatud ainult pildid, millel on toodud positiivsed tulemused. Kokku kontrolliti üle 100 koloonia.

Joonisel 8 on kujutatud *Metschnikowia pulcherrima* *TAF14* inserdiga vektorit sisaldavate bakterikolooniate otsingut. Kontrollitud kaheksast kolooniast andsid kaks oodatava suurusega 1107 ap PCR-produkti (Joonisel 8, rada 4 ja 7). Ülejäänud kolooniate puhul PCR-i signaali ei detekteeritud.



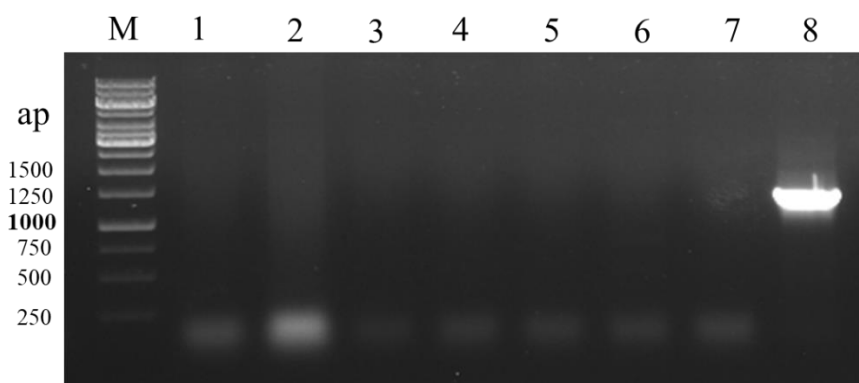
Joonis 8. Koloonia-PCR pRS413-3xFLAG-MpTAF14 vektorit sisaldavate bakterikolooniate leidmiseks. Radade numeratsioon vastab analüüsitud bakterikolooniate numbritele. PCR-i produkti oodatav suurus on 1107 ap. 1% agaros-geelektroforees, DNA on visualiseeritud UV-valguses kasutades etiidumbromiidi. M - DNA pikkusmaker (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*); ap - aluspaar.

Joonisel 9 on kujutatud *Hanseniaspora opuntiae* *TAF14* inserdiga plasmidi sisaldavate bakterikolooniate kontrolli. Antud katsetes kontrolliti ühteist kolooniat, millest üks (Joonis 9, rada 10) andis oodatud suurusega produkti, 1260 aluspaari.



Joonis 9. Koloonia-PCR pRS413-3xFLAG-HoTAF14 vektorit sisaldavate bakterikolooniate leidmiseks. Radade numeratsioon vastab analüüsitud bakterikolooniate numbritele. PCR-i produkti oodatav suurus on 1260 ap. 1% agaros-geelektroforees, DNA on visualiseeritud UV-valguses kasutades etiidumbromiidi. M tähistab DNA pikkusmakerit (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*); ap - aluspaar.

Joonisel 10 on kujutatud eeldatavalt *Candida parapsilosis* *TAF14* inserdiga plasmidi sisaldavate bakterikolooniate kontrolli. Kontrolliti kaheksat kolooniat, millest üks (Joonis 10, rada 8) andis oodatava suurusega produkti 1164 ap.



Joonis 10. Koloonia-PCR pRS413-3xFLAG-Cp*TAF14* vektorit sisaldavate bakterikolooniate leidmiseks. Radade numeratsioon vastab analüüsitud bakterikolooniate numbritele. PCR-i produkti oodatav suurus on 1164 ap. 1% agaros-geelelektroforees, DNA on visualiseeritud UV-valguses kasutades etiidumbromiidi. M tähistab DNA pikkusmakerit (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*); ap - aluspaar.

Candida railenensis *TAF14* geeniga plasmidi sisaldavaid bakterikolooniaid ei õnnestunud leidaka mitmetes korduskatsetes ning seepärast jäi selle liigi *TAF14* edasistest katsetest kõrvale.

Positiivse signaali andnud bakterikolooniatest eraldati eri liikide *TAF14* sisaldavad plasmiidid ning sekveneeriti. Kõik sekveneeritud plasmiidid sisaldasid oodatud *TAF14* gene.

2.3.3. Erinevatest pärmiliikidest pärit *TAF14* geeni ekspresseerivate pagaripärmi tüvede konstrueerimine kasutades plasmiidivahetusüsteemi

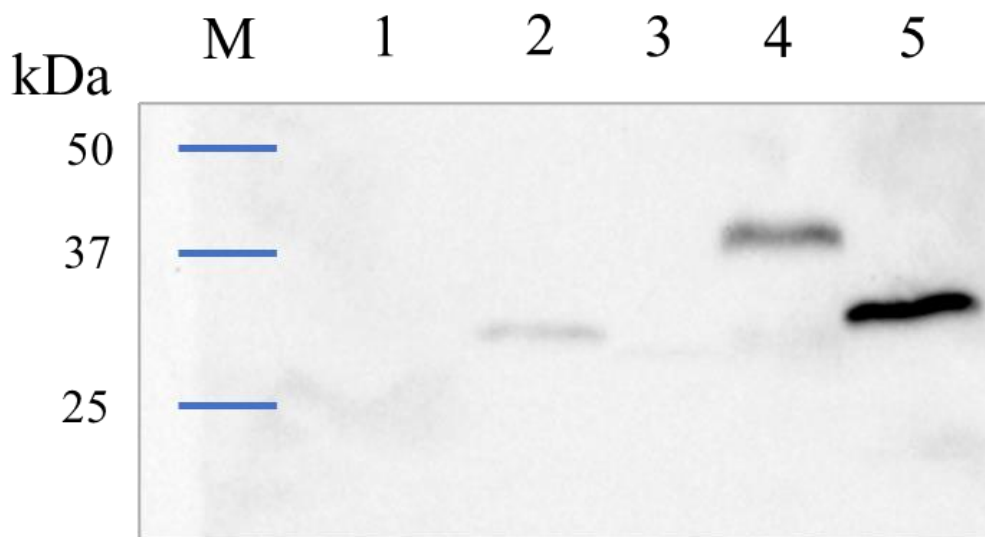
Konstrueeritud *HIS3* markergeeniga plasmide transformeeriti AKY1351 tüvesse. AKY1351 tüve genoomist on deleteeritud endogeenne *TAF14* geen ja eksogeenne *TAF14* tuleb plasmiidilt, mis sisaldab selekteerivat *URA3* markergeeni. Varasemalt oli konstrueeritud vektor pRS413-3xFLAG-Sc*TAF14*, mida kasutati positiivse kontrolltüve tegemiseks. Negatiivse kontrolltüve loomiseks kasutati *TAF14* geeni mitte ekspresseerivat pRS413 vektorit. Saadud transformandid külvati histidiinita selektiivsöötmele. Seega anti rakkudele põhjuse transformeeritud plasmiid alles jätta. Selleks, et rakud ekspresseeriks ainult võõrliigi *TAF14* geeni varianti, oli vaja rakkudest eemaldada *URA3* markergeeniga plasmiid. Selleks kasvatati rakke 5-FOA-d sisaldaval selektiivsöötmel. Kuna Ura3 valk muudab pärmis 5-FOA mürgiseks

5-fluorooroothappeks, jääb rakkudel ellujäämiseks üle vaid vabaneda *URA3* markergeeni kandvast plasmiidist. Selle tulemusena isoleeriti AKY1351 tüve baasil loodud pärmirakud, mis sisaldasid eri pärmiliikidest eraldatud *TAF14* geeniga plasmidi.

2.3.4. Erinevate liikide Taf14 valkude immuunodetektsioon pagaripärmis

Kinnitamaks, et eri liikide Taf14 valgud ekspresseeruvad pagaripärmis, viidi läbi valkude immuunodetektsiooni analüüs ehk *western*-analüüs. Valkude detekteerimiseks kasutati FLAG-epitoomärgist, mis ekspresseerub kõigi kloneeritud *TAF14* geenide N-terminaalses osas.

Valgud eraldati suuruse järgi 15% SDS-polüakrüülamiidgeelis. Joonisel 11 on näha immuunodetektsiooni tulemused. Rajal M on näha valgu molekulmassi marker vahemikus 10 kuni 250 kDa. Esimesel rajal on kontrolltüvi, mis sisaldas tühja ehk *TAF14* geenita ekspressiooniplasmidi. Ootuspäraselt signaali ei detekteeritud. Teisel rajal on positiivne kontroll, mis sisaldab ScTaf14, mille eeldatav suurus on 30,22 kDa. Kolmandal rajal on tüvi, mis sisaldab *Metschnikowia pulcherrima* Taf14 suurusega 29,63 kDa. Signaal on nõrgem kui teistel radadel. Neljandal rajal on ekspresseeritud *Hanseniaspora opuntiae* Taf14 suurusega 34,42 kDa. Viiendal rajal tüvi, mis sisaldab *Candida parapsilosis*-ist eraldatud Taf14 suurusega 31,72 kDa. Kõigi ekspresseeritud valkude puhul on nende suurused lähedased arvutuslike valgu suurustega.



Joonis 11. Erinevate pärmiliikide Taf14 ekspressioon *S. cerevisiae* rakkudes. 1. negatiivne kontroll, *taf14Δ*; 2. positiivne kontroll, S.cTaf14, 30,22 kDa; 3. *M. pulcherrima* Taf14, 29,63 kDa; 4. *H. opuntiae* Taf14, 34,42 kDa; 5. *C. parapsilosis* Taf14, 31,72 kDa. 15% SDS-polüakrüülamiidgeel. Primaarne antikeha: hiire valmistatud anti-FLAG M2, sekundaarne antikeha: kitse rakkudest eraldatud hiirevastane HRP konjugaadiga. M tähistab valgu suurusmarkerit; kDa – kilodalton Kemoluminesstentsi signaal pildistati BioRadi masinaga.

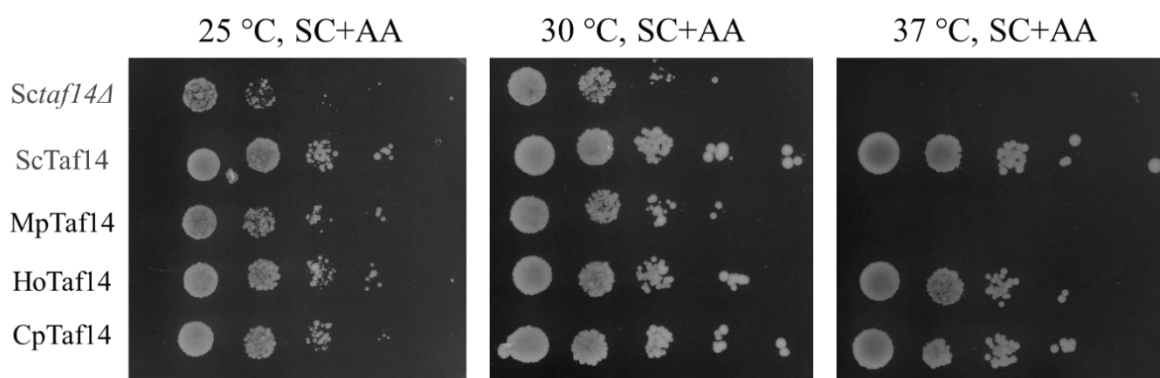
2.3.5. Erinevate pärmiliikide *TAF14* geenide mõju pagaripärmi elulemusele

Kuna kõik kloneeritud *TAF14* geenid ekspresseerisid pagaripärmi rakkudes, testiti nende mõju pagaripärmi elulemusele erinevate kasvutemperatuuride juures. Selleks kasutati lahjenduskülvi meetodit. Pärmirakkudest tehti 10-kordsed lahjendused, mis pipeteeriti SC + AA söötmetassile. Rakke kasvatati kolmel eri temperatuuril: 25, 30 ja 37 °C ja pärmitüvede kasvu jälgiti nelja päeva vältel. Saadud tulemused pildistati (Joonis 12).

Sc*TAF14* geeni ekspresseeriva tüve kasv oli kõigil temperatuuridel sarnane. *taf14Δ* tüvi kasvas 30 °C juures aeglasemalt kui Sc*TAF14*, kasv oli pidurdunud ka 25 °C juures ning 37 °C juures olid *taf14Δ* rakud surnud. Kontrolltüvede kasv või selle puudumine erinevatel temperatuuridel vastas oodatule, viidates katse õnnestumisele.

HoTaf14 ja CpTaf14 ekspresseerivad pärmitüved käitusid erinevate temperatuuride juures sarnaselt pagaripärmi enda Taf14 valgu ekspresseeriva tüvega.

MpTaf14 valgu ekspresseeriv pärmitüvi näitas aga võrreldes ScTaf14 valguga aeglasemat kasvu 30 °C juures, kus MpTaf14 kasv sarnanes *taf14Δ* tüvega. Sama tendents oli näha ka 25°C juures. 37 °C juures MpTaf14 ekspresseeriv tüvi ei kasvanud.



Joonis 12. Erinevate *TAF14* geenide mõju pagaripärmi kasvule. 10-kordne lahjenduste rea analüüs. Võrdlustüvedeks on *Sctaf14Δ* (negatiivne kontroll) ja ScTaf14 (positiivne kontroll). Tulemused on pildistatud neljandal päeval pärast lahjenduskülvi.

2.3.6. *S. cerevisiae* ja *M. pulcherrima* Taf14 valgujärjestuste joondamine

Kuna 10-kordses lahjenduste rea analüüsist selgus, et MpTaf14 ekspresseeriv tüvi erines kõige rohkem. ScTaf14-ga tüvest, otsustati eraldi joondada ScTaf14 ja MpTaf14 valgud, et otsida spetsiifilisi kohti, kus MpTaf14 erineb ScTaf14 valgust (Joonis 13).

ScTaf14	MVATVKRTIRIKTQQHILPEVPPVENFPVRQWSIEIVLLDDEGKEIPATIFDKVIYHLHP	60
MpTaf14	--MSVKRTIRITTNQHILADVPAVENYPMRQWLIEITMLNDVGAVVPANILDKVYTLHP	58
	:*****.******:*** ***:**:* ***:**:* ***:**:* ***:**:* ***	
ScTaf14	TFANPNRTFTDPPFRIEEQGWWGFPDLSVFL---EKAGERKIPHDNLFLQESYEVEHV	117
MpTaf14	TFANPIRALKQPPFKVEEQGWGEFDIPIAVHLVGIPKLGKRFNHDLNLFQETYVDHE	118
	***** *:::***:***** * :*:**:* * *****:*****:* **:*	
ScTaf14	IQIPLNKPLLTEELAKSGSTEETTANTGTIGKRRTTNTTAEPAKAKRAKTGSASTVKGSV	177
MpTaf14	ITIPLKNAQLNKLLAETGSVPTEGD-----AKRKNDESEVQAKL-KKLSAASATKGSV	170
	* ***: : * : * **:* ** * : : : : : * : : : **:* ***	
ScTaf14	DLEKLAFLGTLKLNEDDLVGVVQMVTDNKTPEMNVTMNVEEGEFIIDLYSLPEGLLKSLWD	237
MpTaf14	DLEKLAKGLTLLSEDDLITIVQMVTDNRTSDMNIKNDFEHGFTMDLYTLPELLLKSLWD	230
	***** ** * * *****:*****:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* ***	
ScTaf14	YVKKNTE-	244
MpTaf14	YVQRHTAA	238
	**:::*	

Joonis 13. *S. cerevisiae* ja *M.pulcherrima* Taf14 valgujärjestuste joondamine. Pärimised: *Saccharomyces cerevisiae* (ScTaf14), *Metschnikowia pulcherrima* (MpTaf14). Värvid tähistavad aminohapete füüsikalisi- keemilisi omadusi. Väikesed ja hüdrofoobsed aminohapped (punane); happelised aminohapped (sinine); aluselised aminohapped (magenta); hüdroksüül-, sulfhüdrüül- ja amiinijääkidega aminohapped (roheline). Legend: * konserveerunud järjestus; : konservatiivne mutatsioon; . poolkonservatiivne mutatsioon; - lünk. Värvilised jooned tähistavad Taf14 erinevaid alasid: YEATS domeen (roheline); linkerpiirkond (hall); ET domeen (kollane). Joondamiseks kasutati Clustal Omega programmi (McWilliam *et al.*, 2013).

2.4. Arutelu

Osana erinevatest kromatiini ligipäasetavust reguleerivatest kompleksidest, on transkriptsioonifaktor Taf14 tihedalt seotud geeniekspressiooni kontrolliga. Taf14 kahest konserveerunud domeenist on C-terminaalne ET-domeen vajalik, et Taf14 saaks seonduda sihtmärkkompleksidega, N-terminaalne YEATS-domeen tagab aga transkriptsiooni preinitsiatsioonikompleksi stabiilsuse (Peil *et al.*, 2022). Meie töögrupi eelnevatest katsetest selgus, et spetsiifiline funktsioon on ka Taf14 struktureerimata linkerpiirkonnal, mis jääb YEATS- ja ET-domeenide vahele. Nimelt on selle piirkonna eemaldamine letaalne juhul, kui pagaripärmis on deleteeritud promootoraladele kergemat ligipääsu tagav histoonivariant Htz1 (Peil *et al.*, 2022). Varasematest avastustest lähtuvalt oli selle töö eesmärk leida valgu Taf14 piirkondi, mis võiks erinevates kasvutingimustes samuti drastiliselt mõjutada valgu funktsioneerimist ja seega pärmirakkude elulemust.

Eesmärgi saavutamiseks kasutati uutset lähenemist valkude mutatsioonanalüüsile. Selle asemel, et erinevate võtetega konstrueerida *S. cerevisiae TAF14* geeni erinevaid laboratoorseid mutante, kasutati ära *TAF14* geeni looduslikku varieeruvust. Nimelt kloneeriti eesti loodusest isoleeritud pärmiliikide *TAF14* geenid ning ekspresseeriti neid pagaripärmis. Töös kasutatud pärmiliigid olid kogutud projekti „101 pärmituve Eesti loodusest“ raames.

Kõigist projekti raames isoleeritud pärmidest leiti olemasolevate genoomide analüüsimisel oletatav *TAF14* geen vaid 16-l liigil. Antud töö jaoks valiti nendest neli liiki, mille *TAF14* geenid kloneerida: *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Candida parapsilosis*, *Candida railenensis*. Nende liikide Taf14 valkude joondamisel leiti suurimad erinevused struktureerimata linkerpiirkonnas. Fülogeneetilise puu konstrueerimine lubas püstitada hüpoteesi, et eelkõige võiks pagaripärmi elulemust mõjutada *S.cerevisiae* Taf14 valgust evolutsiooniliselt kõige kaugemad, *Candida railenensis* ja *Candida parapsilosis* liikidest kloneeritud *TAF14* geenid. Samas näitas valkude joondamine, et *Hanseniaspora opuntiae* Taf14 linkerpiirkond oli oluliselt pikem (41 ah) kui *S. cerevisiae* oma ning *M. pulcherrima* samas veidi lühem (7 ah). Linkerpiirkond on aga just see ala, millele varasemates katsetes oli leitud uus, DNA-d siduv ja kromatiini modifitseerivat kompleksi toetav funktsioon.

Töö käigus õnnestus kloneerida kolme liigi *TAF14* geenid neljast (*Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Candida parapsilosis*). Nende kolme liigi *TAF14*-ga konstrueeriti ka pagaripärmi tüved, mis ekspresseerisid võõra liigi Taf14 valku. Kahjuks ei õnnestunud kloneerida *Candida railenensis* Taf14 geeni ja edasistes uuringutes seda ei kasutatud. Kloneerimise ebaõnnestumise põhjus pole selge. Algselt eeldati, et kuna vähem uuritud pärmide genoomide järjestustes leidub ebatäpsusi, võis geenijärjestuses esineda kloneerimiseks kasutatud restriktasid äratundmiskoht(i). Seda hüpoteesi kontrolliti agarosgeelelektroforeesil pärast amplifitseeritud *TAF14* geeni restriktiooni, kuid analüüs näitas (katse tulemust pole näidatud), et *TAF14* geen oli intaktne, seega võis probleem kloneerimisel olla tehnilist laadi.

Konstrueeritud pagaripärmi tüvede Taf14 valguekspressiooni analüüs näitas, et kõik kloneeritud *TAF14* geenid ekspresseerusid (Joonis 11). *M. pulcherrima TAF14* ekspressioonisignaali oli aga oluliselt nõrgem kui teiste liikide Taf14 valkudel. Läbi viidud katse põhjal pole võimalik kindlaks teha, mis on selle põhjus. On võimalik, et MpTaf14 ekspresseerubki madalamal tasemel, samas võis geelile kantud proovis üldine valgukontsentratsioon olla teiste radadega võrreldes madalam. Edasistes uuringutes oleks väga oluline teha kindlaks, kas võõrliigi Taf14 ekspresseerub pagaripärmis madalamal tasemel ning kui see leiab kinnitust, siis mis võiks olla selle põhjuseks. Näiteks võib madalam

ekspressioonitase olla põhjustatud võõrvalgu kiiremast degradatsioonist suunamisest ning see annaks vihjeid ka ScTaf14 metabolismi kohta.

Rakkude elulemuse analüüsimiseks kasvatati võõrliigi Taf14 valku ekspresseerivaid pagaripärmi tüvesid eri temperatuuridel (25°, 30°, 37°). Kuna pärmiliigid, millest *TAF14* geen eraldati, kasvavad looduslikes, pigem jahedamates, tingimustes, võis eeldada, et ka nendes ekspresseeruvad valgud on kohanenud eluks pigem madalamatel temperatuuridel. Pagaripärmi laboritüve optimaalseks kasvutemperatuuriks on 30 °C ning 37 °C on rakkudele stressitingimus. Kui *H. opuntiae* ja *C. parapsilosis* Taf14 valku ekspresseerivad tüved kasvasid kõigil temperatuuridel sarnaselt *S. cerevisiae*-ga, siis *M. pulcherrima*-st eraldatud *TAF14* geeniga tüvi ei kasvanud temperatuuril 37 °C ja temperatuuril 30 °C oli kasv võrreldav *taf14Δ* tüvega. Seega ei leidnud kinnitust osa hüpoteesist, et üks potentsiaalset pagaripärmi elulemuse mõjutavatest *TAF14* variantidest võib olla *C. parapsilosis*-ist või *C. railenensis*-ist isoleeritu.

Kahe valgu (*M. pulcherrima* ja *S. cerevisiae* Taf14) järjestuste joondamine näitas, et eri liikide YEATS- ja ET-domeenid on konserveerunud ja järjestustes esinevad erinevused langevad väikesele vahemikule (ah 138-149) linkerpiirkonnas. Oleks huvitav teada saada, kas need kaks Taf14 varianti seonduvad erinevate valgukompleksidega või omavad erinevaid interaktsioonipartnereid, mis mõjutab nende funktsioneerimist rakulise stressi (antud juhul kuumašoki) korral. Selle teada saamiseks võiks läbi viia valkude immuunopretsipitatsioonikatse, millele järgneb massspektromeetriline analüüs valkudest, mis sadestusid koos meid huvitava Taf14 valguga.

Varasemast on teada, et stressivabades tingimustes lokaliseerub Taf14 valk põhiliselt transkriptsiooni alguskohtadele ja toimib seal transkriptsiooni repressorina. Kuumašoki puhul relokaliseerub Taf14 aga geeni kodeerivast alast ülesvoolu asuvatele aktiveerivatele järjestustele (*upstream activating sequence*, UAS) ning see võib olla oluline stressitingimustes geeniekspressiooni aktivatsioonil (Nemet *et al.*, 2017). Meie töö kontekstis võib välja pakkuda, et MpTaf14 puhul sellist relokalisatsiooni ei toimu ning seega on mõjutatud ka transkriptsiooniline vastus kuumašokile. Kasutades kromatiini immuunopretsipitatsiooni saaks kindlaks teha MpTaf14 lokaliseerumise meie poolt kasutatud tüvedes nii stressivabades kui ka kuumašoki tingimustes. Arvestades, et Taf14 linkerpiirkond on vajalik valgu DNA-ga seondumiseks ning asjaolu, et MpTaf14 linkerpiirkond on lühem kui ScTaf14 oma, võib linkerpiirkonna ja DNA-vaheline kontakt olla tähtis ka erinevates rakulist stressi põhjustavates tingimustes, mitte ainult histoonivariant Htz1 puudumisel.

Samas ei saa kõrvale jätta võimalust, et rakkude surma 37 °C juures põhjustab *M. pulcherrima* Taf14 valgu oluliselt madalam ekspressioonitase, mis mimikeerib *taf14Δ* fenotüüpi ning ei ole põhjustatud analüüsitud valkude järjestuste erinevustest.

Kui antud töö raames analüüsiti eri pärmiliikide Taf14 valkuseid ekspresseerivate pagaripärmi tüvede elulemust erinevatel temperatuuridel, siis edaspidi oleks äärmiselt huvitav uurida ka teiste rakulist stressi põhjustavate tegurite mõju *S. cerevisiae* fenotüübile. Näiteks võiks muuta süsinikuallikat (glükoos vs galaktoos), samuti jälgida erinevate genotoksiliste ainete mõju rakkude kasvule ning rakkude elulemust osmootilise stressi korral. Kõigis neis olukordades toimetulekuks võib olla vaja spetsiifilist Taf14 valgu piirkonda.

KOKKUVÕTE

Eukarüootse raku tuumas on DNA pakitud kõrgematesse struktuuridesse, mis on takistuseks DNA-i toimivatele protsessidele. Rakkudel on evolutsiooniliselt välja kujunenud erinevad mehhanismid DNA-le ligipääsu tagamiseks. Nende hulka kuuluvad näiteks kromatiini remodelleerimine (SWI/SNF, RSC, INO80), histoonide post-translatsiooniline modifitseerimine (NuA3) ja üldiste transkriptsioonifaktorite komplekside kasutamine (TFIID, TFIIF). Kõik välja toodud kompleksid on mitmete subühikutega valgulised masinavärgid, mille koosseisu kuulub ka Taf14 valk, mis seeläbi osaleb geeniekspressiooni regulatsioonis.

Taf14 valgul on kaks selge struktuuriga osa: N-terminaalne YEATS domeen (tunneb ära atsüleeritud histoonivalke ning stabiliseerib transkriptsiooni initsiatsioonikompleksi) ja C-terminaalne ET-domeen (tagab Taf14 valguga seondumise erinevate kompleksidega). Kahe defineeritud domeeni vahele jääb struktureerimata osa, mis seondub DNA-ga ning on oluline rakkude ellujäämisel kui neis puudub histoonivariant Htz1 (Peil *et al.*, 2022). Käesoleva töö eesmärgiks oli leida seni teadmata Taf14 valguga lisafunktsioone. Selleks kasutati erinevate *TAF14* geenivariantide ekspresseerimist pagaripärmis ja jälgiti võõrvalgu ekspresserivate pärmitüve elulemust stressitingimustes ning võrreldi seda pagaripärmi enda Taf14 valgu ekspresseeriva tüvega.

Töö tulemusena konstrueeriti kolm uut *S.cerevisiae* pärmitüve, mis ekspresseerivad *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida parapsilosis*, *Hanseniaspora opuntiae* Taf14 valkusi. Kõigil neil valkudel on konserveerunud YEATS- ja ET-domeenid, kuid üksteisest erinevad linkerpiirkonnad. Fülogeneetiliselt on pagaripärmi Taf14 lähim *H. opuntiae* ja kaugeim *C. parapsilosis*.

Konstrueeritud pagaripärmi tüvesid kasvatati erinevatel temperatuuridel (25°, 30°, 37°). Olulist kasvuerinevust kontrolltüvest nähti *M. pulcherrima* Taf14 valgu ekspresseeriva pärmitüve puhul. Selle pärmitüve fenotüüp oli väga sarnane *taf14Δ* tüvele - aeglasem kasv 25 ja 30 °C juures ning rakud surid kuumašoki (37°) tingimustes. ScTaf14 ja MpTaf14 valkude joondamine näitas, et antud valgud erinevad üksteisest eelkõige linkerpiirkonnas, mis võib seega olla tähtis ala ka pärmirakkude korrektse vastuses kuumašokile.

Antud töö raames polnud küll võimalik välja selgitada avastatud fenomeni molekulaarseid mehhanisme, kuid loodi katsesüsteem, mis võimaldab minna edasi uuringutega Taf14 valguga erinevate struktuursete osade rolli selgitamisega pagaripärmi stressivastuses.

Study of the functions of transcription regulator Taf14 in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Katrin Teder

SUMMARY

In an eukaryotic cell, DNA is packaged into a tight protein-DNA complex called the chromatin. The structure and organization of chromatin play an important role in gene expression regulation and in genome stability. The basic structural unit of chromatin is the nucleosome, which consists of a DNA segment wrapped around the core of four pairs of histone proteins (a histone octamer). Special proteins facilitate modulation of chromatin structure and accessibility, thereby regulating gene expression.

In *S. cerevisiae*, the transcription factor Taf14 is part of various protein complexes, including the general transcription factors TFIID and TFIIF; ATP-dependent chromatin remodellers SWI/SNF, RSC and INO80; histone H3 modifying enzyme NuA3 and Mediator. Taf14 protein consists of two domains: N-terminal conserved YEATS domain which ensures the stability of the transcription pre-initiation complex and C-terminal ET domain that is responsible for the association of Taf14 with protein complexes. Between the two defined domains is an unstructured part that binds to DNA and is important for the survival of cells lacking the histone variant Htz1.

Based on previous discoveries, the aim of this work was to find additional regions of Taf14, which could drastically affect the functioning of the protein and thus the survival of yeast cells under different conditions. A novel approach to protein mutation analysis was used to achieve the goal. Instead of using different techniques to construct laboratory mutants of the *S. cerevisiae* *TAF14* gene, the natural variability of the *TAF14* gene was exploited. Namely, *TAF14* genes of yeast species isolated from Estonian nature were cloned and expressed in baker's yeast. The species were taken from the „Pärmivaramu“ set, which was collected in the course of the project „101 yeasts from Estonian nature,.. Note, that Taf14 gene was found in 16 species. Four of them were selected for this work: *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Candida parapsilosis*, *Candida railenensis*.

During this study, three *TAF14* genes (*M. pulcherrima*, *H. opuntiae*, *C. parapsilosis*) out of 4 were successfully cloned. Budding yeast strains expressing *TAF14* from the aforementioned species were constructed. Analysis of Taf14 protein expression in engineered baker's yeast strains showed that all cloned *TAF14* genes were expressed (Figure 11). However, the

expression signal of *M. pulcherrima TAF14* was significantly weaker than that of Taf14 proteins from other species.

To analyze cell survival, baker's yeast strains expressing the foreign Taf14 protein were grown at different temperatures (25°, 30°, 37°). Strains expressing the Taf14 protein from *H. opuntiae* and *C. parapsilosis* grew similarly to *S. cerevisiae* at all temperatures, the strain with the *TAF14* gene isolated from *M. pulcherrima* did not grow at 37 °C, and at 30 °C the growth was comparable to the *taf14Δ* strain. Alignment of the sequences of two proteins (*M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* Taf14) showed that the YEATS and ET domains of different species are conserved. The differences in the sequences fall to a small range (aa 138-149) in the linker region, which may therefore be an important area in the correct response of yeast cells to heat shock and possibly to other stress conditions.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin südamest tänada oma juhendajaid. Signe Värvi, kes koolitas mind laboris. Alati oli positiivne, andis head nõu ning väga hästi juhendas mind töö kirjutamisel. Tänan ka Arnold Kristjuhani, kes samuti aitas töö kirjutamisega. Lisaks soovin tänada ka Henel Jürgensi, kes aitas mulle 10-kordsete lahjendusterea analüüsiga. Tänan ka Rakubioloogia õpetooli meeldiva seltskonna ja abavalmiduse eest

KIRJANDUSE LOETELU

- Andrews, F. H., Shinsky, S. A., Shanle, E. K., Bridgers, J. B., Gest, A., Tsun, I. K., Krajewski, K., Shi, X., Strahl, B. D., ja Kutateladze, T. G. (2016). The Taf14 YEATS domain is a reader of histone crotonylation. *Nature Chemical Biology*, 12(6), 396–398. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2065>
- Bi, X. (2014). Heterochromatin structure: Lessons from the budding yeast. *IUBMB Life*, 66(10), 657–666. <https://doi.org/10.1002/iub.1322>
- Cairns, B. R., Henry, N. L., ja 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), 3308–3316. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.7.3308>
- Chen, G., Wang, D., Wu, B., Yan, F., Xue, H., Wang, Q., Quan, S., ja Chen, Y. (2020). Taf14 recognizes a common motif in transcriptional machineries and facilitates their clustering by phase separation. *Nature Communications*, 11(1), 4206. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18021-7>
- Clapier, C. R., ja Cairns, B. R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 273–304. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223>
- Conaway, R. C., ja Conaway, J. W. (2009). The INO80 chromatin remodeling complex in transcription, replication and repair. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(2), 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.10.010>
- Cramer, P. (2019). Eukaryotic transcription turns 50. *Cell*, 179(4), 808–812. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.018>
- Dechassa, M. L., Zhang, B., Horowitz-Scherer, R., Persinger, J., Woodcock, C. L., Peterson, C. L., ja Bartholomew, B. (2008). Architecture of the SWI/SNF-nucleosome complex.

Molecular and Cellular Biology, 28(19), 6010–6021.

<https://doi.org/10.1128/MCB.00693-08>

Du, J., Nasir, I., Benton, B. K., Kladdé, M. P., ja Laurent, B. C. (1998). Sth1p, a *Saccharomyces cerevisiae* Snf2p/Swi2p homolog, is an essential ATPase in RSC and differs from Snf/Swi in its interactions with histones and chromatin-associated proteins. *Genetics*, 150(3), 987–1005. <https://doi.org/10.1093/genetics/150.3.987>

Erlich, R. L., Fry, R. C., Begley, T. J., Dae, D. L., Lahue, R. S., ja Samson, L. D. (2008). Anc1, a protein associated with multiple transcription complexes, is involved in postreplication repair pathway in *S. cerevisiae*. *PLoS One*, 3(11), e3717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003717>

Faure, G., ja Callebaut, I. (2013). Identification of hidden relationships from the coupling of hydrophobic cluster analysis and domain architecture information. *Bioinformatics*, 29(14), 1726–1733. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt271>

Feigler, J. T., ja Weil, P. A. (2016). The C terminus of the RNA polymerase II transcription factor IID (TFIID) subunit Taf2 mediates stable association of subunit Taf14 into the yeast TFIID complex. *Journal of Biological Chemistry*, 291(43), 22721–22740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.751107>

Fish, R. N., Ammerman, M. L., Davie, J. K., Lu, B. F., Pham, C., Howe, L., Ponticelli, A. S., ja Kane, C. M. (2006). Genetic interactions between TFIIF and TFIIS. *Genetics*, 173(4), 1871–1884. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.058834>

Grant, P. A., Duggan, L., Côté, J., ... Workman, J. L. (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: Characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes & Development*, 11(13), 1640–1650. <https://doi.org/10.1101/gad.11.13.1640>

Green, M. R. (2005). Eukaryotic transcription activation: Right on target. *Molecular Cell*, 18(4), 399–402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.017>

- Henry, N. L., Campbell, A. M., Feaver, W. J., Poon, D., Weil, P. A., ja Kornberg, R. D. (1994). TFIIF-TAF-RNA polymerase II connection. *Genes & Development*, 8(23), 2868–2878.
<https://doi.org/10.1101/gad.8.23.2868>
- Imhof, A., ja Becker, P. B. (2001). Modifications of the histone N-terminal domains: Evidence for an “epigenetic code”? *Molecular Biotechnology*, 17, 1–13.
<https://doi.org/10.1385/MB:17:1:01>
- Itoh, Y., Woods, E. J., Minami, K., Maeshima, K., ja Collepardo-Guevara, R. (2021). Liquid-like chromatin in the cell: What can we learn from imaging and computational modeling? *Current Opinion in Structural Biology*, 71, 123–135.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.06.004>
- John, S., Howe, L., Tafrov, S. T., Grant, P. A., Sternglanz, R., ja Workman, J. L. (2000). The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a yTAFII30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)–FACT complex. *Genes & Development*, 14(10), 1196–1208.
<https://doi.org/10.1101/gad.14.10.1196>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kabani, M., Michot, K., Boschiero, C., ja Werner, M. (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.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.158>
- Kornberg, R. D., ja Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98(3), 285–294.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81958-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81958-3)

- Li, B., Carey, M., ja Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128(4), 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>
- Lõoke, M., Kristjuhan, K., ja Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 50(5), 325–328. <https://doi.org/10.2144/000113672>
- Lorch, Y., ja Kornberg, R. D. (2017). Chromatin-remodeling for transcription. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 50, e5. <https://doi.org/10.1017/S003358351700004X>
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., ja Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Maeshima, K., ja Eltsov, M. (2008). Packaging the genome: The structure of mitotic chromosomes. *Journal of Biochemistry*, 143(2), 145–153. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm214>
- Martin, B. J., McBurney, K. L., Maltby, V. E., Jensen, K. N., Brind'Amour, J., ja Howe, L. J. (2017). Histone H3K4 and H3K36 methylation independently recruit the NuA3 histone acetyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 205(3), 1113–1123. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.199422>
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Cowley, A. P., ja Lopez, R. (2013). Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W597–W600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt376>
- Morrison, A. J. (2017). Genome maintenance functions of the INO80 chromatin remodeller. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1731), 20160289. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0289>
- Myers, L. C., ja Kornberg, R. D. (2000). Mediator of transcriptional regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 729–749. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.729>

- Nemet, J., Vidan, N., ja Sopta, M. (2017). A meta-analysis reveals complex regulatory properties at Taf14-repressed genes. *BMC Genomics*, 18, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3544-6>
- Peil, K., Jürgens, H., Luige, J., Kristjuhan, K., ja Kristjuhan, A. (2020). Taf14 is required for the stabilization of transcription pre-initiation complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Epigenetics & Chromatin*, 13, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13072-020-00347-7>
- Peil, K., Väriv, S., Ilves, I., Kristjuhan, K., Jürgens, H., ja Kristjuhan, A. (2022). Transcriptional regulator Taf14 binds DNA and is required for the function of transcription factor TFIID in the absence of histone H2A. *Z. Journal of Biological Chemistry*, 298(9). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102369>
- Piatti, P., Zeilner, A., ja 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. <https://doi.org/10.3390/ijms12106544>
- Poli, J., Gasser, S. M., ja Papamichos-Chronakis, M. (2017). The INO80 remodeller in transcription, replication and repair. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1731), 20160290. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0290>
- Rando, O. J., ja Winston, F. (2012). Chromatin and transcription in yeast. *Genetics*, 190(2), 351–387. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.132266>
- Rhee, H. S., ja Pugh, B. F. (2012). Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature*, 483(7389), 295–301. <https://doi.org/10.1038/nature10799>
- Sanders, S. L., Garbett, K. A., ja Weil, P. A. (2002). Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* TFIID. *Molecular and Cellular Biology*, 22(16), 6000–6013. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.16.6000-6013.2002>
- Schier, A. C., ja Taatjes, D. J. (2020). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes & Development*, 34(7–8), 465–488. <https://doi.org/10.1101/gad.335679.119>

- Schulze, J. M., Kane, C. M., ja Ruiz-Manzano, A. (2010). The YEATS domain of Taf14 in *Saccharomyces cerevisiae* has a negative impact on cell growth. *Molecular Genetics and Genomics*, 283, 365–380. <https://doi.org/10.1007/s00438-010-0523-x>
- Schulze, J. M., Wang, A. Y., ja Kobor, M. S. (2009). YEATS domain proteins: A diverse family with many links to chromatin modification and transcription. *Biochemistry and Cell Biology*, 87(1), 65–75. <https://doi.org/10.1139/O08-111>
- Shanle, E. K., Andrews, F. H., Meriesh, H., ... Strahl, B. D. (2015). Association of Taf14 with acetylated histone H3 directs gene transcription and the DNA damage response. *Genes & Development*, 29(17), 1795–1800. <https://doi.org/10.1101/gad.269977.115>
- Sudarsanam, P., Iyer, V. R., Brown, P. O., ja Winston, F. (2000). Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3364–3369. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3364>
- Sudarsanam, P., ja Winston, F. (2000). The Swi/Snf family: Nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *TRENDS in Genetics*, 16(8), 345–351. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(00\)02060-6](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)02060-6)
- Tamaru, H. (2010). Confining euchromatin/heterochromatin territory: Jumonji crosses the line. *Genes & Development*, 24(14), 1465–1478. <https://doi.org/10.1101/gad.1941010>
- Tang, L., Nogales, E., ja Ciferri, C. (2010). Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 102(2–3), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.05.001>
- Vinh, D., Welch, M. D., Corsi, A. K., Wertman, K. F., ja Drubin, D. G. (1993). Genetic evidence for functional interactions between actin noncomplementing (Anc) gene products and actin cytoskeletal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 135(2), 275–286. <https://doi.org/10.1093/genetics/135.2.275>

- Welch, M. D., ja Drubin, D. G. (1994). A nuclear protein with sequence similarity to proteins implicated in human acute leukemias is important for cellular morphogenesis and actin cytoskeletal function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 5(6), 617–632. <https://doi.org/10.1091/mbc.5.6.617>
- Wu, J., ja Grunstein, M. (2000). 25 years after the nucleosome model: Chromatin modifications. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(12), 619–623. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01718-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01718-7)
- Zhang, H., Richardson, D. O., Roberts, D. N., Utley, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Côté, J., ja Cairns, B. R. (2004). The Yaf9 component of the SWR1 and NuA4 complexes is required for proper gene expression, histone H4 acetylation, and Htz1 replacement near telomeres. *Molecular and Cellular Biology*, 24(21), 9424–9436. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9424-9436.2004>
- Zhang, W., Zhang, J., Zhang, X., Xu, C., ja Tu, X. (2011). Solution structure of the Taf14 YEATS domain and its roles in cell growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 436(1), 83–90. <https://doi.org/10.1042/BJ20110004>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Saccharomyces Genome Database, <https://www.yeastgenome.org/> Viimati kasutatud 23.04.23

AlphaFold Protein Structure Database, <https://alphafold.ebi.ac.uk/> Viimati kasutatud 25.05.23

Addgene, <https://www.addgene.org/> Viimati kasutati 23.05.23

LISAD

Lisa 1.

Tabelis (Tabel 1) on välja toodud käesolevas töös kasutatud pärmitüvede genotüübid ja päritolu.

Tabel 1. Kasutatud pärmitüvede genotüübid ja päritolu

Tüve number/Pärmiliik	Genotüüp	Päritolu
W303	<i>S. cerevisiae</i> , MAT, A, <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1, can1-100R lys2D</i>	Thomas ja Rothstein, 1989
AKY1351	W303, <i>taf14::KanMx</i> , <i>pRS416-ScTAF14</i>	Johanna Kase, 2015
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (Mp)	-	Õun, Merili Eenraid; Sindi linn, 25.09.2018
<i>Hanseniaspora opuntiae</i> (Ho)	-	Krügeri tuviõun, leht, Tiina Tamm; Harjumaa 05.08.2018
<i>Candida railenensis</i> (Cr)	-	Lemmaltsa õis, Kai Pähkel; Põltsamaa, 01.10.2018
<i>Candida parapsilosis</i> (Cp)	-	Toataime nektari tüüpi mahl, Signe Värvi; Tartu, 2022

AKY2630	W303, <i>taf14::KanMx</i> , pRS413- <i>ScTAF14</i>	käesolev töö
AKY2631	W303, <i>taf14::KanMx</i> , pRS413	käesolev töö
AKY2632	W303, <i>taf14::KanMx</i> , pRS413- <i>MpTAF14</i>	käesolev töö
AKY2633	W303, <i>taf14::KanMx</i> , pRS413- <i>HoTAF14</i>	käesolev töö
AKY2634	W303, <i>taf14::KanMx</i> , pRS413- <i>CpTAF14</i>	käesolev töö

Lisa 2.

Järgnevas tabelis (Tabel 2) on välja toodud käesolevas töös kasutatud praimerite järjestused ning kasutamise põhjused.

Tabel 2. Töös kasutatud plasmiidid

Nimetus	Kirjeldus
pRS413	<i>HIS3</i> markergeeniga pagaripärmi ekspressioonivektor, kasutatud negatiivse kontrolltüve konstrueerimiseks
pRS413-3xFLAG- <i>ScTAF14</i>	Algplasmiid, sisaldab <i>Saccharomyces cerevisiae TAF14</i> geeni, katsetes positiivses kontrolltüves
pRS413-3xFLAG- <i>MpTAF14</i>	Uue tüve konstrueerimine, sisaldab <i>Metschnikowia pulcherrima</i> -st isoleeritud <i>TAF14</i> geeni
pRS413-3xFLAG- <i>HoTAF14</i>	Uue tüve konstrueerimine, sisaldab <i>Hanseniaspora opuntiae</i> -st isoleeritud <i>TAF14</i> geeni
pRS413-3xFLAG- <i>CpTAF14</i>	Uue tüve konstrueerimine, sisaldab <i>Candida parapsilosis</i> -st isoleeritud <i>TAF14</i> geeni

Lisa 3.

Järgnevas tabelis (Tabel 3) on välja toodud käesolevas töös kasutatud praimerite järjestused ning kasutamise põhjused.

Tabel 3. Kasutatud praimerite loetelu

Nimi	Järjestus	Kasutusala
Metpul- Taf14- Xba-F	5' GCT CTA GAG TCA AAA GAA CCA TCC GCA TCA CCA 3'	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> TAF14 amplifitseerimine
Metpul- Taf14- Bgl-R	5' GCA GAT CTT TAA GCG GCG GTG TGC CTC TG 3'	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> TAF14 amplifitseerimine, transformantide kontroll
Canrai- Taf14- Xba-F	5' GC TCTAGA GTAAAAGAAGACTATTAGAATCACAACCGAG 3'	<i>Candida railenensis</i> TAF14 amplifitseerimine
Canrai- Taf14- Bam-R	5' GC GGATCC TTAAACCTCATTTGTGTGTTTCTTCACAAAT 3'	<i>Candida railenensis</i> TAF14 amplifitseerimine, transformantide kontroll
Hanopu- Taf14- Xba-F	5' GC TCTAGA GTTGAGTCTACTAAAAGAACAGTTAGAG 3'	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> TAF14 amplifitseerimine

Hanopu- Taf14- Bam-R	5' GC GGATCC TCAATCAATTGATAAGGTATGTTGTTGAAC 3'	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> TAF14 amplifitseerimine, transformantide kontroll
Canpar- Taf14- Xba-F	5' GC TCTAGA GTAAAAGAACAATTAGAATTACTACTGAAC 3'	<i>Candida parapsilosis</i> TAF14 amplifitseerimine
Canpar- Taf14- Bam-R	5' GC GGATCC TTAAATCTCTCCCGTATGTTTCTTCAC 3'	<i>Candida parapsilosis</i> TAF14 amplifitseerimine, transformantide kontroll
pRS413- F	5' GCGTAATACGACTCACTATAGG 3'	Sekveneerimine
TAF14- 1-R	5' TATTCCAATAACCGCGACAC 3'	Transformantide kontroll, sekveneerimine
TAF14- 1-F	5' GAAATATTGTTGGCTAGCTTTCC 3'	Transformantide kontroll, sekveneerimine

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Katrin Teder,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose „Transkriptsiooni regulaator Taf14 funktsioonide uurimine pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae*“, mille juhendajad on Signe Värvi ja Arnold Kristjuhan reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Katrin Teder

29.05.2023