

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

**Pärmide *MAL* klastrid ja valgud põhirõhuga *Scheffersomyces stipitis*'e
 α -glükosidaasidel**

Magistritöö

30 EAP

Kristina Põšnograjeva

Juhendajad
dots Tiina Alamäe, biol. kand.
Katrín Viigand, PhD

TARTU

2019

Infoleht

Pärmide *MAL* klastrid ja valgud põhirõhuga *Scheffersomyces stipitis*'e α -glükosidaasidel

Pagaripärmi α -glükosiidsete suhkrute metabolismi ja selle eest vastutavaid α -glükosidaase on põhjalikult kirjeldatud, kuid mitte-konventsionaalsetele pärmidele on selles valdkonnas pööratud vähem tähelepanu. Käesoleva töö raames otsiti mitte-konventsionaalsete pärmide genoomist α -glükosiidsete suhkrute metabolismi eest vastutavaid geeniklastreid (*MAL* klastreid) ja uuriti nendes geeniklastrites kodeeritud valkude fülogeneesi. Samuti kirjeldati ühe mitte-konventsionaalse pärmi, *Scheffersomyces stipitis*'e, nelja α -glükosidaasi. Substraadivaliku poolest ei sarnanenud *S. stipitis*'e α -glükosidaasid pagaripärmi tänapäevaste α -glükosidaasidgedega, vaid hoopis nende hüpoteetilise eellasvalguga, millel on laiem substraadivalik.

Märksõnad: *MAL* klaster, α -glükosidaas, *Scheffersomyces stipitis*

CERCS kood: P310 Proteiinid, ensümoloogia

MAL* clusters and proteins of yeasts with emphasis on α -glucosidases of *Scheffersomyces stipitis

The metabolism of α -glucosidic sugars and the partaking α -glucosidases have been thoroughly studied in *S. cerevisiae* but not in non-conventional yeasts. In this thesis, gene clusters responsible for the utilization of α -glucosidic sugars (*MAL* clusters) in genomes of non-conventional yeasts were detected and the phylogenetic relationships of proteins encoded by these clusters were described. Furthermore, the substrate specificity of four α -glucosidases of a non-conventional yeast *Scheffersomyces stipitis* was studied. The substrate specificity of all studied enzymes was different from the substrate specificity of modern *S. cerevisiae* α -glucosidases and instead resembled a hypothetical ancestral maltase-isomaltase of *S. cerevisiae* α -glucosidases.

Keywords: *MAL* cluster, α -glucosidase, *Scheffersomyces stipitis*

CERCS code: P310 Proteins, enzymology

Sisukord

Sisukord	3
Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1. Pärmide mitmekesisus ja fülogenees.....	7
1.1.1. <i>Torulasporea delbrueckii</i>	7
1.1.2. <i>Ogataea polymorpha</i> ja <i>Ogataea parapolyomorpha</i>	8
1.1.3. <i>Cyberlindnera fabianii</i>	8
1.1.4. <i>Debaryomyces hansenii</i>	8
1.1.5. <i>Peterozyma xylosa</i>	8
1.1.6. <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	9
1.1.7. <i>Lodderomyces elongisporus</i>	9
1.1.8. <i>Scheffersomyces stipitis</i>	9
1.1.9. <i>Yamadazyma tenuis</i> ja <i>Spathaspora passalidarum</i>	10
1.1.10. <i>Blastobotrys adenivorans</i>	10
1.1.11. <i>Lipomyces starkeyi</i>	10
1.1.12. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	10
1.1.13. Pärmide fülogenees.....	11
1.2. α -Glükosiidsed suhkrud ja nende metabolism.....	12
1.2.1. α -Glükosidaaside üldiseloomustus.....	12
1.2.2. Inimese ja taimede α -glükosidaasid.....	13
1.2.3. Milleks pärmidele α -glükosidaasid?.....	13
1.2.4. Pagaripärmi α -glükosidaasid.....	14
1.2.5. α -Glükosiidide transporterid.....	16
1.2.6. MAL klastrid.....	17
1.3. Geeniklastrid.....	18
1.3.1. Mis on metaboolne geeniklaster?.....	18
1.3.2. Geeniklastrid erinevates organismides.....	18
1.3.3. Miks geenid klasterduvad?.....	19
1.3.4. Subtelomeersed geeniklastrid.....	20
1.3.5. Kuidas geeniklastrid tekivad?.....	21
2. Eksperimentaalosa	22
2.1. Töö eesmärgid.....	22
2.2. Materjal ja meetodika.....	23

2.2.1.	Järjestuste joondamine, fülogeneesipuude koostamine ja muud <i>in silico</i> meetodid	23
2.2.2.	<i>S. stipitis</i> 'e kasvatamine, kasvusubstraatide testimine	23
2.2.3.	<i>S. stipitis</i> 'e rakulüsaadi valmistamine ja analüüs	24
2.2.4.	α -Glükosidaaside geenide kloneerimine	24
2.2.5.	Pärmide α -glükosidaaside heteroloogne ekspressioon.....	26
2.2.6.	α -Glükosidaaside aktiivsuse mõõtmine.....	27
2.2.7.	Invertaasi olemasolu testimine pärmilüsaadis	28
2.3.	Tulemused ja arutelu	28
2.3.1.	<i>MAL</i> klastrid mitte-konventsionaalsetes pärmides	28
2.3.2.	<i>MAL</i> geenide fülogenees mitte-konventsionaalsetes pärmides	31
2.3.3.	Pärmi <i>S. stipitis</i> kasv α -glükosiidsetel suhkrutel	34
2.3.4.	α -Glükosidaasne aktiivsus <i>S. stipitis</i> 'e rakulüsaatides	35
2.3.5.	<i>S. stipitis</i> 'e α -glükosidaaside substraadivaliku ennustamine.....	37
2.3.6.	<i>S. stipitis</i> 'e α -glükosidaaside substraadivaliku kirjeldamine	40
2.3.7.	Alternatiivne koodonikasutus ja <i>S. stipitis</i> 'e α -glükosidaasid	44
2.3.8.	Katsed <i>S. stipitis</i> 'e α -glükosidaaside lahustuvuse parandamiseks	45
	Kokkuvõte	46
	Summary	47
	Kasutatud kirjandus	49
	Kasutatud veebiaadressid	59
	Lisad	60
	Lisa 1	60
	Lisa 2	61
	Lisa 3	62
	Lisa 4	65
	Lisa 5	66
	Lihtlitsents	68

Kasutatud lühendid

α -MG – α -metüülglükosiid

AG – α -glükosidaas

AGT – α -glükosiidse suhkru transporter

GH – glükosiidi hüdrolaas

K_m – Michaelis'e konstant

MAL geen – α -glükosiidse suhkru kasutamise eest vastutav geen

MAL klaster – α -glükosiidse suhkru kasutamise eest vastutav geeniklaster

MAL valk – α -glükosiidse suhkru kasutamise eest vastutav valk

PNPG – *p*-nitrofenüül- α -D-glükopüranosiid

SUMO – väike ubikviiniisarnane modifitseerija (*small ubiquitin-related modifier*)

TLC – õhukese kihi kromatograafia (*thin layer chromatography*)

UTR – mittetransleeritav järjestus (*untranslated region*)

YNB – Yeast Nitrogen Base (pärmisööde)

Sissejuhatus

Pärmide eelistatud energiaallikaks on suhkrud ja α -glükosiidsed suhkrud satuvad pärmide kasvukeskkonda näiteks tärglase lagunemisel. α -Glükosiidsete suhkrute lagundamise eest vastutavad pärmidel α -glükosidaasid. Väga põhjalikult on kirjeldatud pagaripärmi α -glükosidaase, kuna need mängivad olulist rolli õlle valmimisel (Stewart, 2016). Pagaripärmi α -glükosidaasid jagatakse nende substraadivaliku põhjal maltaasideks ja isomaltaasideks (Krakenaite ja Glemzha, 1983; Naumoff ja Naumov, 2010). On püstitatud hüpotees, et nende eellasvalguks oli laiema substraadivalikuga ensüüm, mis hüdrolyüsib nii tänapäevaste maltaaside kui ka isomaltaaside substraate (Voordeckers *et al.*, 2012). Selline laia substraadivalikuga ensüüm on olemas ka tänapäevastel pärmiliikidel, näiteks *Ogataea polymorpha*'l (Viigand *et al.*, 2016).

Pagaripärmil paikneb α -glükosidaasi geen kromosoomil α -glükosiidide transporteri ja transkriptsiooni aktivaatori vahetus läheduses, seega moodustub kolmest geenist koosnev *MAL* klaster (Chang *et al.*, 1988; Kim ja Michels, 1988). Mitte-konventsionaalsete pärmide *MAL* klastreid on uuritud vähe ja seetõttu on raske hinnata, kui oluline on *MAL* geenide klasterdumine pärmidel ja mis on selle põhjuseks. Samuti on kirjeldatud vaid mõne mitte-konventsionaalse pärmi α -glükosidaasi substraadivalikut. Fülogeneetiliselt pagaripärmist kaugete pärmiliikide α -glükosidaaside substraadivaliku kirjeldamine võimaldab usaldusväärsemalt rekonstrueerida nende ensüümide substraadivaliku evolutsiooni.

Käesoleva töö eesmärk oli otsida *MAL* klastreid mitte-konventsionaalsetes pärmides ja kirjeldada *MAL* valkude fülogeneetilisi suhteid. Samuti oli eesmärgiks iseloomustada pagaripärmist fülogeneetiliselt üsna kaugel pärmiliigi *Scheffersomyces stipitis*'e α -glükosiidsete suhkrute metabolismi ja selles osalevate α -glükosidaaside substraadivalikut. Need teadmised toovad meid lähemale pärmide α -glükosiidsete suhkrute metabolismi ja selles osalevate valkude evolutsiooni mõistmisele.

Töö valmis grantiprojekti "Uudsete prebiootikumide ensümaatiline süntees: ensüümide iseloomustamine ja produktide prebiootilise efektiivsuse hindamine (1.01.2016–31.12.2019)" PUT1050 raames. Magistritöö andmed on esitatud publikatsioonis „Genome mining of non-conventional yeasts: search and analysis of *MAL* clusters and proteins“ ajakirjas *Genes* (2018).

Täna oma juhendajaid Tiina Alamäed ja Katrin Viigandit, kes aitasid planeerida praktilist tööd ja koostada käesolevat tööd.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Pärmide mitmekesisus ja fülogenees

Definitsiooni järgi on pärmid seened, mis suguliselt paljunedes ei moodusta viljakeha ning mittesuguliselt paljunevad pungudes või pooldudes. Pärmid ei ole monofüleetiline rühm ja neid leiab seeneriigi fülogeneesipuu erinevatest harudest. Pärmid kuuluvad Dikarya alamriigi kahte hõimkonda – Ascomycota (kottseened) ja Basidiomycota (kandseened). Ülejäänud seentest eristab pärme nende peamiselt üherakuline eluviis, kuigi mitmed pärmiliikide esindajad on võimelised moodustama ka hulkrakseid pseudohüüfe või hüüfe (Kurtzman *et al.*, 2011). Pärmide viimane ühine eellane oli hulkrakne organism, millest konvergentse evolutsiooni tulemusena tekkis mitmes erinevas fülogeneesi harus pärmidele omane üherakuline eluviis (Nagy *et al.*, 2014). Tänapäeval on kirjeldatud üle 1500 pärmiliigi, kuid need moodustavad tõenäoliselt vähem kui 1% tegelikult eksisteerivatest pärmiliikidest (Kurtzman ja Piškur, 2006).

Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* on üks kõige paremini kirjeldatud eukarüootseid organisme. Palju on uuritud ka poolduvat pärmi (*fission yeast*) *Schizosaccharomyces pombe*. Neid kahte pärmiliiki on hakatud nimetama „konventsionaalseteks“ pärmideks (Prista *et al.*, 2016). Vähem põhjalikult on kirjeldatud ja uuritud kõiki ülejäänud pärmiliike, niinimetatud „mitte-konventsionaalseid“ pärme. Ometigi on nendel pärmidel palju erilisi omadusi, mille uurimine aitaks seletada bioloogilisi protsesse ning mida saaks kasutada biotehnoloogias (Riley *et al.*, 2016). Vaatamata sellele, et pärmid on morfoloogiliselt üsna ühetaolised, on ühte klassi (Saccharomycetes) kuuluvate pärmide geneetiline mitmekesisus vähemalt sama suur kui kogu keelikloomade hõimkonnas, mille esindajad on morfoloogiliselt väga erinevad (Dujon, 2006).

Selles peatükis kirjeldatakse lühidalt kolmeteistkümmet mitte-konventsionaalset pärmi ja *S. pombe*'t, tõstes esile liikidele erilisi omadusi ning võimalusi nende biotehnoloogiliseks kasutamiseks. Need liigid on valitud kahe kriteeriumi järgi: pärm metaboliseerib maltoosi ja selle genoom on sekveneeritud.

1.1.1. *Torulaspora delbrueckii*

T. delbrueckii on toiduainete riknemist põhjustav pärm (Benito, 2018). Kui kõrvale jätta perekonna *Saccharomyces* liigid, on *T. delbrueckii* levinuim veini kääritamisel kasutatav pärm (van Breda *et al.*, 2013; Benito, 2018). Võrreldes *Saccharomyces*'ega kääritatud veinidega on

T. delbrueckii kääritatud veinil mitmeid häid omadusi: madalam äädikhappe sisaldus, madalam alkoholisisaldus, paremad lõhna- ja maitseomadused (Benito, 2018).

1.1.2. *Ogataea polymorpha* ja *Ogataea parapolyomorpha*

Ogataea perekonda kuuluvad pärmid, nende seas ka *O. polymorpha* ja *O. parapolyomorpha*, on metülotroofid – need võivad kasvada keskkonnas, kus metanool on ainukeseks süsinikuallikaks (Limtong *et al.*, 2008). Neid pärme on leitud keskkondades, mis sisaldavad metanooli – riknevates puuviljades, taimelehtedel, mullas ja putukate sooles (Morais *et al.*, 2004; Limtong *et al.*, 2008). *O. polymorpha* kasvab ka väga kõrgel temperatuuril - kuni 48°C (Reinders *et al.*, 1999) ja see on arendatud heteroloogsete geenide ekspressiooniplatvormiks. Näiteks firma Hepavax-Gene kasutab seda hepatiit B vaktsiini ja hepatiit C ravimi tootmiseks (Kunze *et al.*, 2009).

1.1.3. *Cyberlindnera fabianii*

C. fabianii on isoleeritud fermenteeritud alkohoolsetest jookidest (Mukisa *et al.*, 2012), suhkruroost (Limtong *et al.*, 2014) ja puuviljadest (Nyanga *et al.*, 2007), kuid on ka inimese oportunistlik patogeen. *C. fabianii* on väga haruldane infektsiooni põhjustaja, kuid selle teeb ohtlikuks võime moodustada biofilmi ning kiiresti saavutada resistentsus fungitsiididele (Arastehfar *et al.*, 2019). Sellele pärmiliigile on leitud ka biotehnoloogilisi rakendusi – *C. fabianii*'d saab edukalt kasutada reoveest orgaaniliste süsinikuühendite eemaldamiseks (Moriya *et al.*, 1990).

1.1.4. *Debaryomyces hansenii*

D. hansenii on halotolerantne pärm, mille elukeskkonnaks on merevesi (Kumar *et al.*, 2012). *D. hansenii* on ka kõige levinum pärm kõrge soolasisaldusega toidus – juustus (Seiler ja Busse, 1990) ja kääritatud lihatoodetes (Saldanha-da-Gama *et al.*, 1997). *D. hansenii* on vajalik juustu valmimiseks ja selle riknemist põhjustavate bakterite vohamise takistamiseks (Prista *et al.*, 2006), samuti salaami iseloomuliku maitse kujunemiseks (Breuer ja Harms, 2006). Pärmil *D. hansenii* on ka probiootilised omadused (Ochangco *et al.*, 2016).

1.1.5. *Peterozyma xylosa*

Peterozyma xylosa (varasem nimi *Pichia xylosa*) on isoleeritud puuviljakärbse *Drosophila miranda* seedekanalist (Phaff *et al.*, 1956; Stefanini, 2018). *P. xylosa* erineb teistest käesolevas töös kirjeldatud pärmidest, kuna sellele transleeritakse CUG koodonit mitte leutsiinina, nagu standardse geneetilise koodi puhul, ega seriinina, nagu CTG klaadi pärmidel, vaidalaniinina (Krassowski *et al.*, 2018).

1.1.6. *Meyerozyma guilliermondii*

M. guilliermondii elab nii mullas, puuviljadel kui ka inimese nahal ja limaskestadel. *M. guilliermondii* anamorf (suguliselt mittepaljunev vorm) on oportunistlik patogeen *Candida guilliermondii*, mis võib põhjustada invasiivset infektsiooni (Papon *et al.*, 2013). Haigustekitajana on *C. guilliermondii* väga haruldane, nakatades enamasti vähihaigeid, kuid samas on see vähem tundlik fungitsiidile kui teised *Candida* liigid (Savini *et al.*, 2011). Tööstusele pakub huvi *M. guilliermondii* võime toota riboflaviini (vitamiin B₂) (Abbas ja Sibirny, 2011; Papon *et al.*, 2013). Samuti on näidatud, et *M. guilliermondii* takistab hallitusseente vohamist puuviljadel ja seda on võimalik kasutada fungitsiidide asemel põllumajandusliku toodangu riknemise ärahoidmiseks (Wisniewski *et al.*, 1991).

1.1.7. *Lodderomyces elongisporus*

Pärmi *L. elongisporus* on isoleeritud puuviljadest ja magusatest jookidest (James *et al.*, 1994). Selle omaduste ja niši kohta on vähe teada (Al-Obaid *et al.*, 2018). *L. elongisporus* on inimese oportunistlik patogeen ning kuigi registreeritud haigusjuhtumeid on vähe, võib infektsioon olla letaalne (Lockhart *et al.*, 2008; Al-Obaid *et al.*, 2018).

1.1.8. *Scheffersomyces stipitis*

Pärmi *S. stipitis* (varasem nimetus *Pichia stipitis*) on isoleeritud putukavastsetest (Jeffries *et al.*, 2007) ja puidust toituvate põrnikate soolestikust (Suh *et al.*, 2003). Perekonna *Scheffersomyces* pärmid on kohastunud elama hapnikuvaestes tingimustes, kus on osaliselt seeditud puitu (Jeffries *et al.*, 2007). *S. stipitis* kääritab puidu koostisesse kuuluva ksüloosi efektiivselt etanooliks (Toivola *et al.*, 1984; Jeffries *et al.*, 2007). Ksüloosi kääritamine on vajalik bioetanooli efektiivseks tootmiseks taimsest biomassist, kuna glükoosi järel on ksüloos kõige enam esinev monomeer lignotselluloosis (Jeffries ja Van Vleet, 2009). Tööstuslikul bioetanooli tootmisel kasutatakse tavaliselt pagaripärmi, mis on hea glükoosi kääritaja, vastupidav kõrgele etanooli kontsentratsioonile ja madalale pH tasemele, kuid ei käärita ksüloosi (Mohd Azhar *et al.*, 2017). Lignotselluloosi efektiivselt etanooliks kääritava pärmi konstrueerimiseks on *S. stipitis*'e ksüloosi metabolismi geene viidud pagaripärmi, kuid saadud transgeensel pagaripärmil on ilmnunud mitmeid puudusi (Jeffries ja Van Vleet, 2009). Näiteks oleks vaja muuta ksüloosi transporti pagaripärmi rakku efektiivsemaks (Nijland *et al.*, 2017), hoida reaktsioonides osalevate kofaktorite hulka tasakaalus (Salusjärvi *et al.*, 2013) ja tagada ksüloosipetsiifiliste geenide ekspressioon sobival tasemel (Zeng *et al.*, 2017).

1.1.9. *Yamadazyma tenuis* ja *Spathaspora passalidarum*

Y. tenuis (varasem nimetus *Candida tenuis*) ja *S. passalidarum* elavad sümbiontidena põrnikate soolestikus (Nguyen *et al.*, 2006; Davis, 2014). Nagu ka *S. stipitis* (vt ptk 1.1.8), fermenteerib *S. passalidarum* ksüloosi. Aeroobsetel tingimustel on *S. passalidarum*'i ksüloosi fermenteerimise võime võrreldav *S. stipitis*'e omaga ja anaeroobsetel tingimustel isegi parem kui *S. stipitis*'el (Veras *et al.*, 2017). Pärmis *S. passalidarum* uuritakse, et paremini mõista ksüloosi metabolismi mehhanisme ja tõhustada taimsest biomassist bioetanooli tootmist (Wohlbach *et al.*, 2011).

1.1.10. *Blastobotrys adenivorans*

Pärmis *B. adenivorans* (varasem nimetus *Arxula adenivorans*) elukoht on muld (Middelhoven *et al.*, 1984). *B. adenivorans* eristub teistest pärmiliikidest oma robustsuse ja ebatavaliste biokeemiliste omaduste tõttu – selle liigi esindajad on termo-, ksero- ja osmotolerantsed ning metaboliseerivad väga erinevaid süsiniku- ja lämmastikuallikaid. Näiteks võib *B. adenivorans* kasutada amiine ja adeniini ainukese energia- ja süsiniku- ja lämmastikuallikana ning metaboliseerida n-butanooli ja tanniini (Kunze *et al.*, 2014). *B. adenivorans* on temperatuurist sõltuv polümorf. Madalal temperatuuril kasvab pärm üksikute punguvate rakkudena, temperatuuril 42 °C moodustab pseudomütseeli ja sellest kõrgemal temperatuuril mütseeli, kusjuures mütseelina sekreteerib pärm kaks korda rohkem valke kui üksikute rakkudena (Wartmann *et al.*, 2000). Seetõttu arendatakse meetodeid, et kasutada seda pärmis heteroloogsete valkude tootmiseks (Malak *et al.*, 2016).

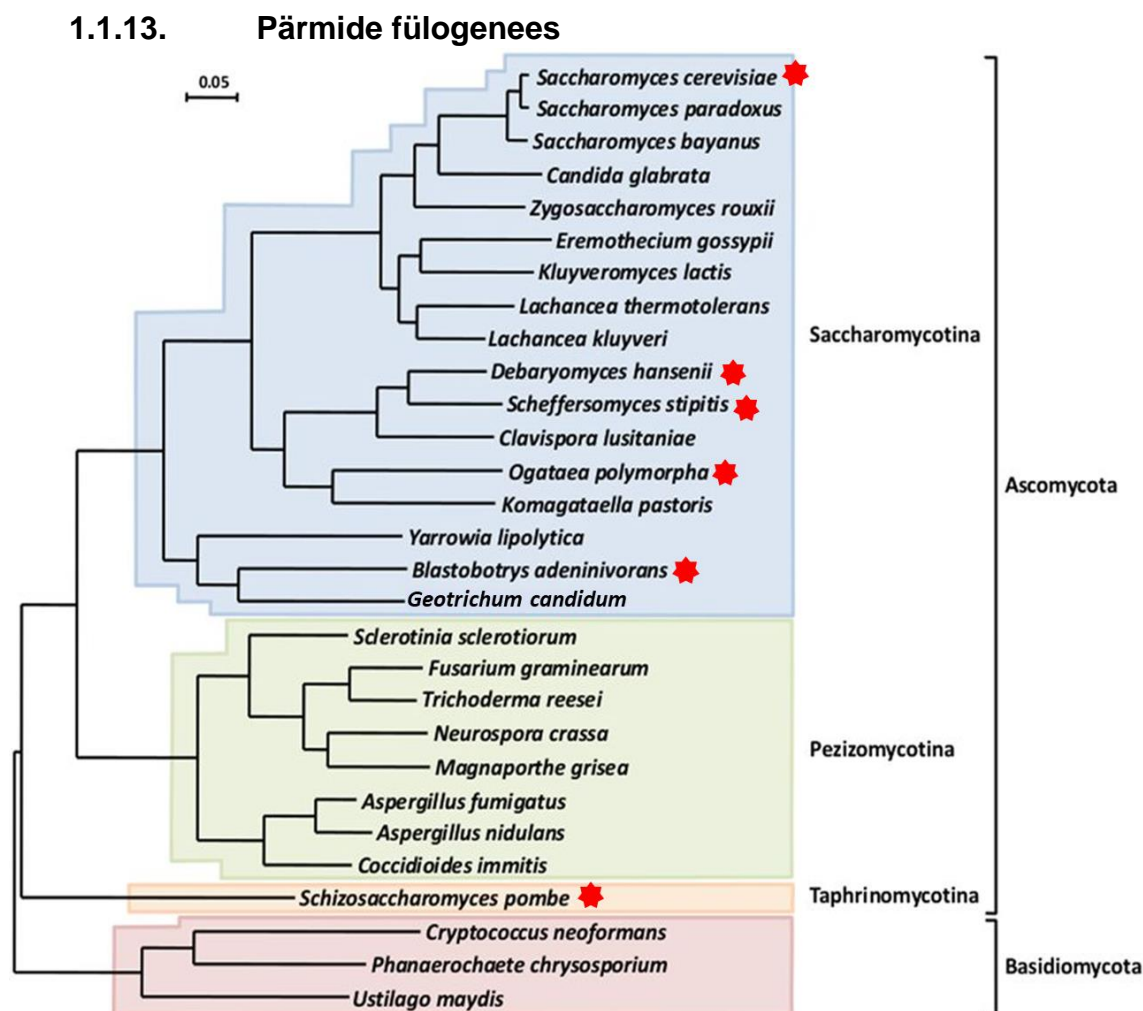
1.1.11. *Lipomyces starkeyi*

L. starkeyi peamiseks elukohaks on muld (Lodder ja Kreger-van Rij, 2010), milles olevaid süsivesikuid lagundab pärm energia saamiseks ekstratsellulaarsete hüdrolaaside abil. *L. starkeyi* on pärmiliikide seas üks võimsamaid tähtsise hüdrolyüsijaid (Spencer-Martins ja Uden, 1977). Samuti akumulatsioon *L. starkeyi* raku sisse suurel hulgal lipiide, mis võivad moodustada kuni 70% pärmis kuivmassist (Ageitos *et al.*, 2011). Selle omaduse tõttu pakub *L. starkeyi* huvi tööstusele – uuritakse võimalust kasutada pärmis biodiisli tootmiseks. *L. starkeyi* kasvukeskkonnaks ja lipiidide tootmise substraadiks on võimalik kasutada näiteks reovett (Angerbauer *et al.*, 2008) või paberitööstuse jääki hemitselluloosi (Brandenburg *et al.*, 2016).

1.1.12. *Schizosaccharomyces pombe*

Pärmis *S. pombe* on leitud puuviljadelt ja teeseenejoogist (Hoffman *et al.*, 2015). Mõned tootjad kasutavad seda tumeda rummi valmistamiseks (Gomes *et al.*, 2002). *S. pombe* on ka väga oluline mudelorganism – katsed selle pärmiga on viinud tähtsate avastusteni rakutsükli,

replikatsiooni, rekombinatsiooni, kromosoomide segregatsiooni ja epigeneetika kohta (Hoffman et al., 2015 ja sealsed viited). Paul Nurse on saanud Nobeli preemia (<https://www.nobelprize.org>) rakkude kasvu ja jagunemist kontrollivate mehhanismide avastamise eest. Tema katsetes oli peamiseks mudelorganismiks *S. pombe* (Beach et al., 1982; Lee ja Nurse, 1987).



Joonis 1. Dikarya alamriigi fülogeneesipuu, mis on koostatud 246 valgu järjestusi võrreldes. Skaala pikkus tähistab viite asendust saja positsiooni kohta. Punase tärniga on märgistatud pärmiliigid, mida käsitleti käesolevas peatükis. Joonis on pärit modifitseeritud kujul artiklist (Morel et al., 2015).

Joonisel 1 on näidatud Dikarya alamriiki kuuluvate seente fülogeneetilised suhted. Käesolevas peatükis kirjeldatud pärmid kuuluvad hõimkonda Ascomycota ja kõik pärmiliigid, v.a *S. pombe*, kuuluvad selle alamhõimkonda Saccharomycotina. Saccharomycotina alamhõimkonnas eristatakse nn CTG klaadi, millesse kuuluvatel pärmidel transleeritakse CUG koodonit seriinina, mitte leutsiinina, nagu standardse geneetilise koodi puhul. CTG klaadi kuuluvad teiste hulgas *M. guilliermondii*, *L. elongisporus*, *Y. tenuis*, *S. passalidarum*, *S. stipitis* ja *D.*

hansenii, neist kaks viimast on olemas ka ülaltoodud fülogeneetilisel puul (Riley *et al.*, 2016; Krassowski *et al.*, 2018). *B. adenivorans* kuulub Saccharomycotina basaalsesse klaadi – see liik lahkes varakult Saccharomycotina teistest pärmidest ja loetakse seega fülogeneetiliselt vanaks pärmiks. Veelgi varem on aga *S. cerevisiae* liinist lahknunud Taphrinomycotina alamhõimkonda kuuluv *S. pombe*. See lahknemine võis aset leida üsna varsti pärast loomade ja seente lahknemist, mistõttu evolutsiooniline kaugus *S. pombe* ja *S. cerevisiae* vahel on samas suurusjärgus, kui evolutsiooniline kaugus kummagi pärmide ja imetajate vahel (Sipiczki, 2000).

1.2. α -Glükosiidsed suhkrud ja nende metabolism

1.2.1. α -Glükosidaaside üldisloomustus

α -Glükosidaasid on glükosiidi hüdrolaasid (GH), mis katalüüsivad α -1,1-; α -1,2-; α -1,3-; α -1,4- ja α -1,6-glükosiidsideme hüdrolyüsi oligo- ja polümeersetes suhkrutes, alates disahhariididest nagu maltoos ja isomaltoos ning lõpetades polüsahhariididega nagu tärklis. Reaktsiooni tulemusena vabaneb suhkru mitteredutseerivast otsast α -D-glükoosi molekul (<http://www.cazy.org/>). Lisaks hüdrolyüsi reaktsioonile võivad paljud α -glükosidaasid suhkruid ka transglükosüleerida (Mangas-Sánchez ja Adlercreutz, 2015).

Glükosiidi hüdrolaasid jagatakse CAZy (*Carbohydrate-active enzymes database*) andmebaasis (Lombard *et al.*, 2014) aminohappelise järjestuse sarnasuse alusel 163 perekonnaks (29.05.2019 seisuga). α -Glükosidaase leiab peamiselt perekondadest GH13 ja GH31 (Henrissat ja Davies, 1997). GH13 ja GH31 valkude primaarjärjestuste sarnasus on madal, kuid nende struktuuris ja reaktsioonimehhanismis on mitmeid ühiseid jooni (Janeček *et al.*, 2007). Nii GH13 kui ka GH31 perekonna valkude katalüütiline domeen on $(\beta/\alpha)_8$ -tüüpi struktuuriga. Mõlema perekonna valkude reaktsioonimehhanism on „*retaining*“ tüüpi - glükosiidsideme katkestamisel jääb vabaneva suhkru anomeerne konfiguratsioon samaks (MacGregor *et al.*, 2001; Janeček *et al.*, 2007). Katalüütiline masinavärk on aga nende kahe perekonna valkudel erinev. GH13 perekonna valkudel koosneb see kolmest aminohappest: glutamaadist ja kahest aspartaadist (Matsuura *et al.*, 1984), kuid GH31 perekonna valkudel osaleb katalüüsis vaid kaks aspartaati (Lovering *et al.*, 2005).

Samuti on erinev GH13 ja GH31 perekonna valkude levik organismides. GH31 α -glükosidaasid on laiema levikuga – neid on nii bakterites, arhedes kui ka eukarüootides (sh ka imetajates). GH13 perekonna α -glükosidaase on leitud lisaks bakteritele vaid seentel ja putukatel (Gabriško ja Janeček, 2011). Pagaripärmi α -glükosidaasid kuuluvad perekonda GH13 (Needleman *et al.*,

1978; Deng *et al.*, 2014), pärmil *S. pombe* on kirjeldatud nii perekonna GH13 (Chi *et al.*, 2008) kui ka GH31 α -glükosidaase (Jansen *et al.*, 2006).

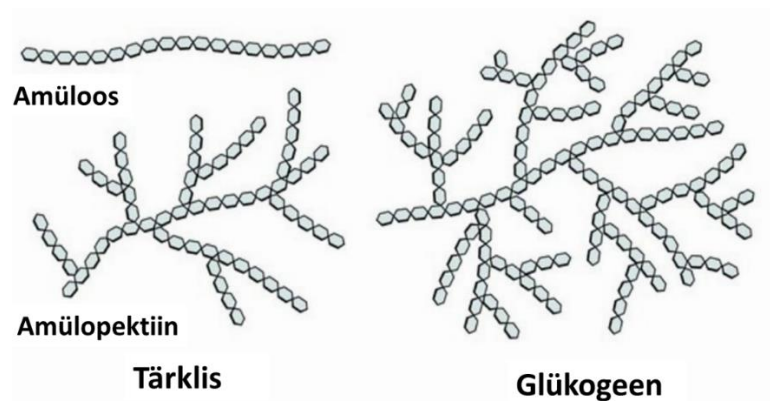
1.2.2. Inimese ja taimede α -glükosidaasid

Kõikidel eukarüootidel on α -glükosidaasid endoplasmaatilises retiikulumis, kus need osalevad glükosüülitud valkude voltumise kvaliteedikontrollil, eemaldades glükosüülitud valkudelt otsmised glükoosi molekulid (Hebert *et al.*, 1995; Ferris *et al.*, 2014). Lisaks endoplasmaatilise retiikulumi α -glükosidaasile on inimesel kaks erineva substraadivalikuga rakuvälist α -glükosidaasi peensoole limaskesta pinnal, mis osalevad toidus sisalduva tärklise lagundamisel (Nichols *et al.*, 1998) ja üks rakusisene lüsoosoomides paiknev α -glükosidaas, mis osaleb glükogeeni lõhustamisel glükoosiks. Funktsionaalse lüsoosomaalse α -glükosidaasi puudus põhjustab inimesel Pompe haigust (Hers, 1963).

Taimedel, näiteks odral ja peedil, ekspresseeruvad α -glükosidaasid seemnetes. Seemne idanemisel osalevad α -glükosidaasid seemnes sisalduva tärklise lagundamisel glükoosiks, mis on energiaallikas taimeembrüo arenguks (Yamasaki ja Suzuki, 1980; Stanley *et al.*, 2011; Andriotis *et al.*, 2016).

1.2.3. Milleks pärmidele α -glükosidaasid?

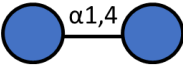
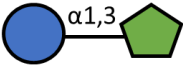
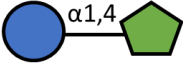

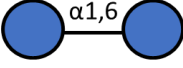
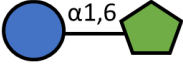

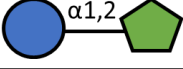
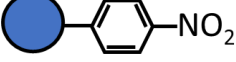
Pärmid elavad mitmekesistes keskkondades: mullas, vees, taimede ja loomade pinnal või sisemuses. Eriti armastavad pärmid suhkrurikkaid keskkondi – küpseid marju ja puuvilju. Pärmide looduslikus kasvukeskkonnas leidub pärmidele C- ja energiaallikaks sobivaid α -glükosiidseid suhkruid (erinevate α -glükosiidide struktuur on näidatud joonisel 3). α -Glükosiidid maltoos, maltotriios ja isomaltoos tekivad taimsetes jäänustes leiduva tärklise lagundamisel mikroobsete amülaasidega (Janeček, 2009). Needsamad α -glükosiidsed suhkrud tekivad ka glükogeeni lagundamisel, mis on varuaineks nii bakteritel, eukarüootidel kui ka arhedel (Ball *et al.*, 2011). Tärklise (amüloosi ja amülopektiini) ning glükogeeni struktuur on näidatud joonisel 2). Pärmide sahharoosi allikaks on marjad ja taimemahl (Winter ja Huber, 2000). Erinevad α -glükosiidid tekivad ka suhkrute transglükosüülimisel, mida viivad läbi taimed, seemned, bakterid ja putukad. Näiteks mesilased sünteesivad taimenektaris sisalduvast sahharoosist transglükosüülimise teel turanoosi, palatinoosi ja maltuloosi (Ngiwsara *et al.*, 2012; Sawale *et al.*, 2017 ja sealsed viited).

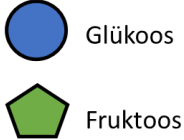


Joonis 2. Tärklise ja glükogeeni struktuur. Nende polüsahhariidide lagundamisel mikroobsete amülaasidega tekivad maltoos, maltotriios ja isomaltoos, mis on substraadiks α -glükosidaasidele. Tärklis ja glükogeen koosnevad glükooosi monomeeridest, mis on ahela lineaarses osas ühendatud α -1,4-glükosiidsidemega ning hargnemise kohas α -1,6-glükosiidsidemega. Tärklis koosneb lineaarsest amüloosist ja hargnenud amülopektiinist. Glükogeen on amülopektiinist rohkem hargnenud. Joonis on pärit modifitseeritud kujul veebipõhisest õpikust (OpenStax College, 2013).

1.2.4. Pagaripärmi α -glükosidaasid

Pärmide α -glükosidaasidest on kõige enam uuritud *S. cerevisiae* vastavaid ensüüme, kuna neil on biotehnoloogiline tähtsus. Pagaripärmi kasutatakse õlle pruulimisel ja õllevirdes on suurel hulgal α -glükosiide maltoosi, maltotriioosi ja isomaltoosi, mis tekivad viljaterades sisalduva tärklise lagundamisel (Stewart, 2016). *S. cerevisiae* α -glükosidaasid (kõik kuuluvad GH13 perekonda) jagatakse substraadivaliku põhjal kahte rühma: maltaasid ja isomaltaasid. Maltaasid (EC 3.2.1.20) hüdrolüüsivad kõige efektiivsemalt α -1,4-glükosiidsidet ja isomaltaasid (EC 3.2.1.10) α -1,6-glükosiidsidet. Need ensüümid lagundavad di- ja oligosahhariide, kuid polüsahhariide aeglasemalt või üldse mitte (Krakenaite ja Glemzha, 1983; Naumoff ja Naumov, 2010; Teste *et al.*, 2010). Maltaaside ja isomaltaaside substraadid on esitatud joonisel 3. On püstitatud hüpotees, et pagaripärmi maltaasid ja isomaltaasid evolutsioneerusid eellasvalgust, mis suutis hüdrolüüsida mõlemat tüüpi sidemeid (Voordeckers *et al.*, 2012). Huvitaval kombel on selle hüpoteetilise „ürgmaltaasiga“ sarnane pärmi *O. polymorpha* tänapäevane α -glükosidaas MAL1 (maltaas-isomaltaas) – see valk suudab efektiivselt hüdrolüüsida nii α -1,4- kui ka α -1,6-glükosiidsidet, ehk nii maltoosi- kui ka isomaltoosi tüüpi substraate (Viigand *et al.*, 2016).

Suhkru nimetus	Suhkru ehitus	Suhkrut hüdrolüüsivad ensüümid
Maltoos		Maltaasid
Turanoos		
Maltuloos		
Maltotriioos		
Isomaltoos		Isomaltaasid
Palatinoos		
α -MG		
Sahharoos		Maltaasid ja isomaltaasid
PNPG		



Joonis 3. Maltaaside ja isomaltaaside substraatide, α -glükosiidsete suhkrute struktuur. Joonise koostamisel kasutati PubChem andmebaasi (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Töös mainitud suhkrute struktuur on esitatud ka lisa 2. α -MG – α -metüülglükosiid, PNPG – p-nitrofenüül- α -D-glükopüranosiid.

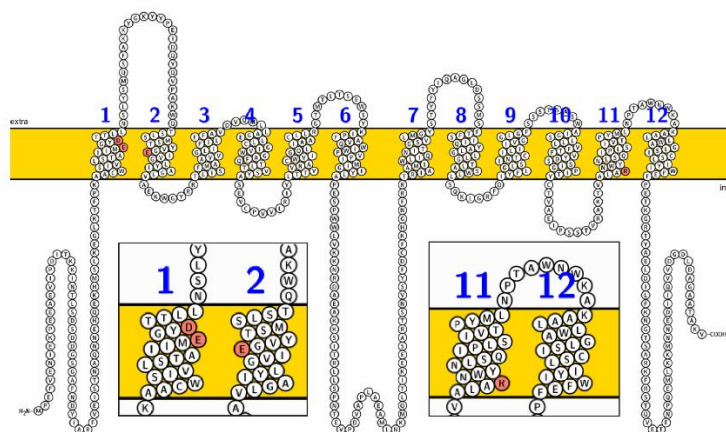
Pagaripärmil on kirjeldatud kaks maltaasi (MAL12, MAL32) ja viis isomaltaasi (IMA1, IMA2, IMA3/IMA4, IMA5) (Needleman *et al.*, 1978; Krakenaite ja Glemzha, 1983; Deng *et al.*, 2014). Lisaks *S. cerevisiae* α -glükosidaasidele on biokeemilisi omadusi kirjeldatud veel vaid mõne pärmilise GH13 perekonna α -glükosidaasil, need on toodud tabelis 1. Mitte-konventsionaalsete pärmide α -glükosidaase tasub uurida, kuna erinevates keskkonnatingimustes ja eriilmeliste biokeemiliste tunnustega pärmidest võib avastada ebatüüpiliste omadustega α -glükosidaase. Samuti võimaldavad teadmised pärmide, eriti *S. cerevisiae* põlvnemisliinist vara lahknenu pärmide α -glükosidaaside omaduste kohta teha usaldusväärsemaid järeldusi α -glükosidaaside evolutsiooni kohta.

Tabel 1. Pärmide GH13 perekonna α -glükosidaasid, mille substraadivalik on kirjeldatud. *L. thermotolerans* – *Lachancea thermotolerans*, *C. albicans* – *Candida albicans*, *K. lactis* – *Kluyveromyces lactis*.

Pärmiliik	Valgu nimi (tähistus)	α -Glükosidaasi tüüp	Viide
<i>S. pombe</i>	Mal1	Maltaas	(Chi <i>et al.</i> , 2008)
<i>L. thermotolerans</i>	KLTH0G19470p	Maltaas	(Voordeckers <i>et al.</i> , 2012)
<i>L. thermotolerans</i>	KLTH0B00308p	Isomaltaas	(Voordeckers <i>et al.</i> , 2012)
<i>O. polymorpha</i>	MAL1	Maltaas-isomaltaas	(Liiv <i>et al.</i> , 2001; Viigand <i>et al.</i> , 2016)
<i>L. elongisporus</i>	MalS	Maltaas-isomaltaas	(Voordeckers <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. albicans</i>	CAMAL2	Maltaas-isomaltaas	(Geber <i>et al.</i> , 1992)
<i>K. lactis</i>	KLLA0_B00242g	Maltaas-isomaltaas	(Voordeckers <i>et al.</i> , 2012)

1.2.5. α -Glükosiidide transporterid

α -Glükosiidide metabolism võib pärmidel olla rakusisene või rakuväline. Enamasti on pärmide α -glükosidaasid rakusisesed (Needleman *et al.*, 1978; Deng *et al.*, 2014) ning seega on metabolismiks vaja α -glükosiidid transportida raku. α -Glükosiidide transport on pärmidel aktiivne ja kulutab membraanile tekitatud prootongradiendi energiat – substraat transportitakse raku koos prootoniga (Van Leeuwen *et al.*, 1992). Aktiivtransport võimaldab α -glükosiide raku kontsentreerida. See on vajalik nende suhkrute tõhusaks hüdrolyüsiks raku, kuna α -glükosidaasidel on väga madal afiinsus substraadile (Needleman *et al.*, 1978; Alamäe ja Liiv, 1998). Näiteks *O. polymorpha* α -glükosidaasi MAL1 K_m (Michaelis'e konstant) väärtus maltoosile on 51.8 ± 3.7 mM (Viigand *et al.*, 2016), kuid α -glükosiidi transporter MAL2 K_m väärtus maltoosile on 0.23 ± 0.05 mM (Viigand ja Alamäe, 2007). Tüüpiliselt on α -glükosiidide transporteritel kaksteist transmembraanset domeeni (Cheng ja Michels, 1989; Han *et al.*, 1995). Joonisel 4 on näidatud *O. polymorpha* α -glükosiidi transporter (MAL2) ennustatud struktuur. Esimeses, teises ja üheteistkümnendas transmembraanses domeenis on punasega tähistatud konserveerunud positsioonides paiknevad laetud aminohapped, mis tõenäoliselt vastutavad maltoosi ja prootoni seondumise ning transpordi eest. Samades positsioonides olevate aminohapete (Glu120, Asp123, Glu167 ja Arg504) muteerimine *S. cerevisiae* α -glükosiidi transporteris AGT1 on tõestanud nende aminohapete olulisust α -glükosiidide transpordis (Trichez *et al.*, 2019).



Joonis 4. *Ogataea polymorpha* α -glükosiidi transporteri (MAL2) ennustatud struktuur. Esimeses, teises ja üheteistkümnendas transmembraanses domeenis on punasega tähistatud aminohapped, mis tõenäoliselt vastutavad maltoosi ja prootoni seondumise ning transpordi eest. Transmembraansed domeenid ennustati CCTOP veebilehel (Dobson *et al.*, 2015) ja struktuur visualiseeriti programmiga Protter program (Omasits *et al.*, 2014). Joonise autor on K. Viigand (avaldamata andmed).

α -Glükosiidide transportereid on nii laia kui kitsa substraadispetsiifikaga. Näiteks pagaripärmi MAL61 on kitsa substraadivalikuga ja transpordib vaid maltoosi ja turanoosi (Cheng ja Michels, 1991), kuid AGT1 on laia substraadivalikuga ja transpordib paljusid α -glükosiide (trehaloosi, sahharoosi, PNPG'd, maltoosi, maltotriooosi, α -MG'd, isomaltoosi, meletsitoosi ja palatinoosi) (Han *et al.*, 1995; Hollatz ja Stambuk, 2001; Day *et al.*, 2002). *O. polymorpha* MAL2 transpordib maltoosi, sahharoosi, maltotriooosi, turanoosi, PNPG'd ja trehaloosi (Viigand ja Alamäe, 2007). Suhkrute struktuur on esitatud lisa 2.

1.2.6. MAL klastrid

Maltoosi metabolismi eest vastutavad transporteri ja α -glükosidaasi geenid on paljudes pärmides klasterdunud ehk asuvad genoomis füüsiliselt lähestikku. *S. cerevisiae* MAL klaster koosneb kolmest geenist: lisaks transporterit ja α -glükosidaasi kodeerivatele geenidele on klatri koosseisus ka nende ekspressiooni aktiveeriva regulaatori geen. Pagaripärmi α -glükosidaasi ja transporterit kodeerivad geenid paiknevad divergentselt ning jagavad kahesuunalist promootorala, millele seonduv aktivaator indutseerib mõlema geeni transkriptsiooni (Chang *et al.*, 1988; Kim ja Michels, 1988; Meurer *et al.*, 2017). *S. cerevisiae* MAL klattrisse kuuluv aktivaator on tsinksõrm-domeeniga valk (Chang *et al.*, 1988).

MAL geenide arv ja asukoht kromosoomis varieeruvad erinevatel pärmiliikidel ja ka tüvedel. Paljudes pagaripärmi tüvedes on viis MAL klattrit (Needleman, 1991; Brown *et al.*, 2010), kuid näiteks laboritüves S288C on vaid kaks MAL klattrit ning see tüvi ei kasva maltoosil MAL aktivaatori geeni mittefunktsionaalse alleeli tõttu (Cohn *et al.*, 2006). Pärmide erinevates

evolutsiooniliinides on *MAL* klatri geenid duplitseerunud, tekkinud geenikoopiad on divergeerunud või kaduma läinud. Ilmselt selle tulemusena on pagaripärmil tekkinud erineva substraadivalikuga α -glükosidaasid – maltaasid ja isomaltaasid, mis võimaldavad efektiivselt kasutada erinevaid substraate (Brown *et al.*, 2010). Pagaripärmi α -glükosidaaside evolutsiooni on *in silico* imiteeritud (Voordeckers *et al.*, 2012).

Lisaks pagaripärmile on *MAL* klastreid leitud ja kirjeldatud järgmistes pärmides: *O. polymorpha* (Viigand *et al.*, 2005), *O. parapolyomorpha* (Ravin *et al.*, 2013), *T. delbrueckii* (Alves-Araújo *et al.*, 2004), *S. stipitis* (Jeffries ja Van Vleet, 2009) ja *K. lactis* (Fairhead ja Dujon, 2006; Leifso *et al.*, 2007). Pärmil *K. lactis* genoomis on kaks *MAL* klassist (Fairhead ja Dujon, 2006) ja *S. stipitis*'e genoomis on neli *MAL* klassist (Jeffries ja Van Vleet, 2009), ülejäänud pärmidel on üks *MAL* klaster. α -Glükosiidsete suhkrute metabolismi klastreid on lisaks pärmidele leitud ka filamentsetes seentes, kuid mitte taimedes ega loomades. *MAL* geeniklastreid on kirjeldatud äädikakärbsel, kuid need koosnevad α -glükosidaase kodeerivate paraloogsete geenide tandemkordustest, seega on need väga erinevad pärmide mittehomoogsetest geenidest koosnevatest *MAL* klassistest (Gabriško ja Janeček, 2011). *MAL* klasterite otsimine ja kirjeldamine enamates pärmiliikides aitab mõista metabolismi geenide klasterdumise funktsiooni ja olulisust pärmides.

1.3. Geeniklastrid

1.3.1. Mis on metaboolne geeniklaster?

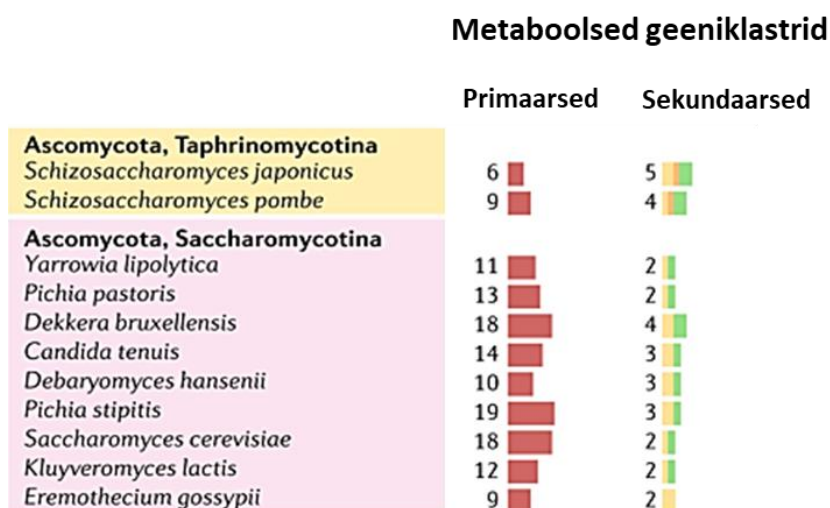
Metaboolne geeniklaster moodustub kromosoomil kõrvuti paiknevatest geenidest, mis täidavad ühist metaboolset funktsiooni. Metaboolsed geeniklastrid koosnevad mittehomoogsetest geenidest ja iga geeni produkt täidab erinevat ülesannet – viib läbi ühte etappi metaboolses rajas. Metaboolsed geeniklastrid erinevad bakterite operonidest, kuna operonis paiknevaid gene transkribeeritakse ühe polütsistronse mRNA'na, klasteris paiknevaid eukarüootseid gene aga eraldi (Jeffries ja Van Vleet, 2009).

1.3.2. Geeniklastrid erinevates organismides

Bakterites on ühist funktsiooni täitvate geenide lähestikku paiknemine tavaline – enam kui 50% bakteri geenidest moodustavad operone (Nützmann *et al.*, 2018). Eukarüootides on aga mittehomoogsete geenide klasterdumine üsna ebatavaline nähtus. Pagaripärmis paiknevad enamike metabolismiradade geenid genoomis juhuslikult (Hall ja Dietrich, 2007). Geeniklastreid on kõige enam leitud ja kirjeldatud pärmides ja seentes, kuid viimasel ajal on neid rohkem avastatud ka taimedest (Nützmann *et al.*, 2018). Üksikuid geeniklastreid on leitud

ka loomadel, näiteks inimesel on klasterdunud MHC geenid, mis on hädavajalikud immuunsuse tekkeks (The MHC sequencing consortium, 1999), ja kaks *de novo* puriinide sünteesil osalevat geeni (GPAT ja AIRC) (Brayton *et al.*, 1994).

Metaboolsed geeniklastrid jagunevad primaarse ja sekundaarse metabolismi geeniklastriteks. Primaarse metabolismi geeniklastrid kodeerivad valke, mis osalevad suhkrute, lämmastikuühendite, vitamiinide ja aminohapete metabolismis. Primaarse metabolismi geeniklastrite hulgast on pärmides põhjalikult kirjeldatud süsinikuallikate metabolismi (Viigand *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2010; Slot ja Rokas, 2010) ja nitraadi assimileerimise klastreid (Siverio, 2002; Ávila *et al.*, 2002; Böer *et al.*, 2009). Sekundaarse metabolismi geeniklastrite funktsioon on toksiinide, antibiootikumide ja pigmentide tootmine. Sekundaarse metabolismi geeniklastreid on vähem pärmidel ja rohkem filamentsetel seentel ning taimedel. Mudeltaimes *Arabidopsis thaliana* on ennustatud neljakümne viie geeniklastri olemasolu (Nützmänn *et al.*, 2018), milles paiknevate geenide funktsioon on tõenäoliselt kaitse herbivooride ja patogeenide vastu (Nützmänn ja Osbourn, 2015). Pagaripärmis on leitud kakskümmend metaboolset geeniklastrit (Rokas *et al.*, 2018). Joonisel 5 on näidatud ka teistes pärmiliikides leitud metaboolsete klastrite arv.



Joonis 5. Metaboolsete primaarsete ja sekundaarsete geeniklastrite arv pärmides. *Pichia stipitis* – uue nimega *Scheffersomyces stipitis*, *Candida tenuis* – uue nimega *Yamadazyma tenuis*. Joonis on pärit modifitseeritud kujul Rokas *et al.* (2018) artiklist.

1.3.3. Miks geenid klasterduvad?

Mitmed geeniklastrid on evolutsioonis konserveerunud, seega peab geenide klasterdumisele mõjuma positiivse valiku surve. On pakutud välja kolm võimalikku seletust, miks klastrid tekivad ja alles jäävad. Nendeks on koregulatsioon, geenide aheldumine ja klastri isekus (Rokas *et al.*, 2018).

Klastri tekke esimeseks võimalikuks põhjuseks on klasterdunud geenide koreguleerimisel tekkiv eelis. On näidatud, et geeniklastris paiknevad geenid on tugevalt koekspressioneeritud (Rokas *et al.*, 2018). Klastri geenide efektiivset koregulatsiooni võimaldab sarnane kromatiini pakituse aste genoomis lähestikku paiknevatel geenidel ning klastritele tüüpilised kahe-suunalised promootoralad (Nützmann *et al.*, 2018).

Teiseks võib klastrite teket põhjustada geenide aheldumisega kaasnev eelis. Geenide lähestikku paiknemine vähendab rekombinatsiooni toimumise tõenäosust ja seega suureneb tõenäosus, et meiosis päranduvad järglastele kõik metaboolse funktsiooni täitmiseks vajalikud geenid (Hall ja Dietrich, 2007).

Kolmandaks geeniklastrite tekke võimalikuks seletuseks on „iseka geeniklastri“ teooria. Walton (2000) püstitas hüpoteesi, et looduslik valik toimub mitte organismile, vaid geeniklastrile. Klastril on eelis mitteklaasterdunud geenide ees, kuna see saab liikuda mitte ainult vertikaalse, vaid ka horisontaalse geeniülekanne kaudu (Walton, 2000). See teooria eeldab, et horisontaalne geeniülekanne toimub üpris tihti. Mitmed teadlased aga arvavad, et horisontaalne geeniülekanne ei ole seeneriigis piisavalt sagedane sündmus, et toetada iseka geeniklastri teooriat (Wisecaver ja Rokas, 2015; Rokas *et al.*, 2018).

Metaboolsete geeniklastrite teket ja levikut on lihtne põhjendada, kui metabolismirajas tekib toksiline vaheühend – see põhjustab tugevat looduslikku valikut klastri kooshoidmiseks. Klasterdumine tagab täpse koregulatsiooni ja vähendab tõenäosust, et osa raja geenidest läheb rekombinatsiooni tõttu kaduma. See hoiab ära toksilise vaheühendi kuhjumise organismis (Rokas *et al.*, 2018). Nii mõnegi metabolismiraja geenide kohta on aga näidatud, et need klasterduvad ühes fülogeneetilises rühmas (perekonnas, liigis, tüves), teises aga mitte. Selliste geeniklastrite tekkimise põhjust ja vajalikkust organismile on märksa keerulisem seletada ning ühtset seisukohta uurijatel selle kohta ei ole (Nützmann *et al.*, 2018).

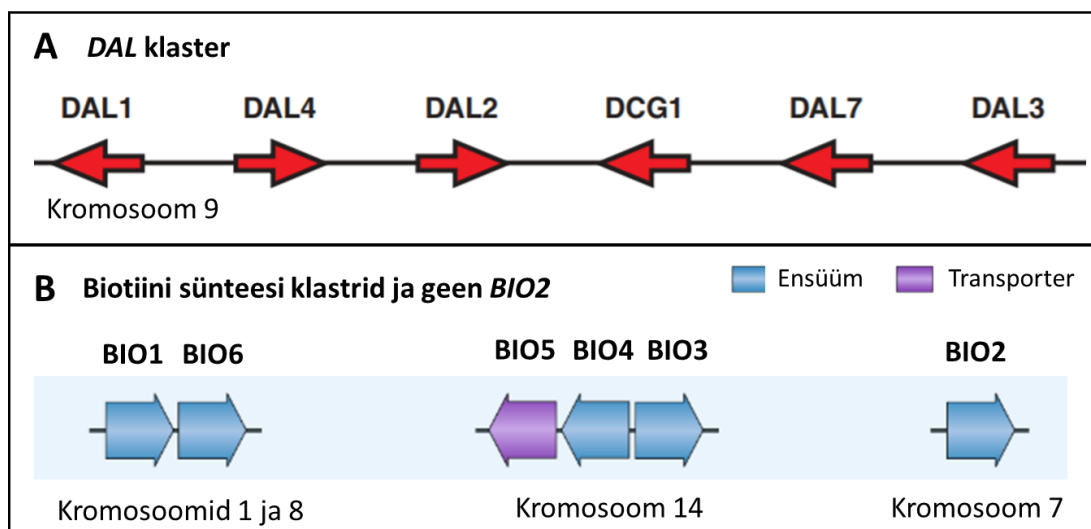
1.3.4. Subtelomeersed geeniklastrid

Pagaripärmi *MAL* klastrid paiknevad kromosoomide subtelomeersetes piirkondades (Fairhead ja Dujon, 2006; Brown *et al.*, 2010). Selline paiknemine on näidatud ka mitmetel teistel klastritel. Subtelomeerne kromosoomi regioon on telomeeri kõrval paiknev ala, mis pärmidel on keskmiselt 33 kb pikk (Brown *et al.*, 2010). Kromosoomi subtelomeerne piirkond erineb ülejäänud kromosoomist, kuna see on kordusterohkem ja geenivaesem, rekombinatsiooni ja mutatsioonide tekke sagedus on seal kõrgem ning sealsed geenid on suurema tõenäosusega

epigeneetiliselt vaigistatud (Brown *et al.*, 2010 ja sealsed viited). Subtelomeerse piirkonna ebastabiilsus võimaldab organismil kiiresti adapteeruda uutele niššidele. Subtelomeerses aladesse kuhjuvad geenid, mis on seotud ühendite metabolismi ja transpordiga ning vastusega stressile ja toksiinidele (Cohn *et al.*, 2006). Sagedase rekombinatsiooni tõttu duplitseeruvad subtelomeersed geenid tihedamini. Subtelomeersed duplikaadid divergeeruvad kiiresti tänu kõrgemale mutatsioonisagedusele ja paindlikumale ekspressioonile. Brown *et al.* (2010) oletavad, et see võimaldas pagaripärmi *MAL* klastril korduvalt duplitseeruda ja vähespetsiifilistel *MAL* valkudel divergeeruda maltaasideks ja isomaltaasideks (Brown *et al.*, 2010).

1.3.5. Kuidas geeniklastrid tekivad?

Metaboolsed geeniklastrid on tekkinud evolutsiooniprotsessi tagajärjel: nende teket, levikut ja püsijäämist on mõjutanud looduslik valik (Rokas *et al.*, 2018). Enamik seente ja taimede klastritest on tõenäoliselt tekkinud geenide duplitseerumise ja genoomi ümberkorralduste tõttu, kuid osade klastrite tekkel on olulist rolli mänginud ka horisontaalne geeniülekanne (Nützmann *et al.*, 2018).



Joonis 6. *S. cerevisiae* DAL klaster (paneelil A) ja biotiini sünteesi klastrid ja geen *BIO2* (paneelil B). Paneeli A koostamisel oli aluseks joonis Wong ja Wolfe (2005) artiklist ja paneeli B koostamisel joonis Rokas *et al.* (2018) artiklist.

Näiteks pagaripärmi allantoiini metabolismi eest vastutav *DAL* klaster tekkis geenide duplitseerumise ja genoomi ümberkorralduste tõttu. Kõik kuus *DAL* klastrisse kuuluvat geeni (vt joonis 6) olid pagaripärmi eellase genoomis olemas, kuid paiknesid genoomis juhuslikult. Klastrite tekkel relokeerusid neli geeni ühte subtelomeersesse lookusesse ning kaks geeni esmalt duplitseerusid ja seejärel relokeerusid samasse lookusesse (Wong ja Wolfe, 2005).

Pagaripärmi biotiini (vitamiin B₇) sünteesi klasteri tekkel oli aga oluline nii pagari pärmi geenide duplitseerumine ja neofunktsionaliseerumine kui ka horisontaalne geeniülekanne. Biotiini sünteesi eest vastutab pagari pärmil kuus geeni, mis moodustavad kaks subtelomeerset klasterit: üks klaster sisaldab kolme geeni (*BIO3*, 4 ja 5), teine kahte geeni (*BIO1* ja 6) ja üks geen ei paikne klasteris (*BIO2*) (vt joonis 6). *BIO3* ja *BIO4* on pagari pärmi genoomi tulnud horisontaalse geeniülekanne kaudu kahelt prokarüootselt doonorilt, vastavalt gamma- ja alfa proteobakterilt. Geenid *BIO1*, *BIO5* ja *BIO6* on tekkinud eellasgeenide duplitseerumise ja neofunktsionaliseerumise tulemusena. Geenidest *BIO1* ja *BIO6* on genoomis olemas ka mittefunktsionaalsed koopiad (Hall ja Dietrich, 2007).

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärgid

Meie uurimisgrupis on uuritud mitte-konventsionaalse pärmi *O. polymorpha* laia substraadivalikuga maltaas-isomaltaasi MAL1. Seda valku kodeeritakse geeniklasteris, mis sisaldab ka teisi α -glükosiidide kasutamiseks vajalikke gene. Teised uurijad on analüüsinud *S. cerevisiae* MAL klastreid ja nendes kodeeritud kitsama substraadivalikuga valkusiid – maltaase ja isomaltaase. Selle magistritöö esimeseks põhieesmärgiks oli otsida ja kirjeldada MAL klastreid mitte-konventsionaalsete pärmi genoomidest ning iseloomustada neis kodeeritud valkude fülogeneesi. Teiseks põhieesmärgiks oli kirjeldada pagari pärmi fülogeneetilist üsna kauge pärmi liigi, *S. stipitis*'e α -glükosiidsete suhkrute kasutamist ja α -glükosidaase.

Töös püstitati järgmised ülesanded:

1. Otsida MAL klastreid mitte-konventsionaalsetest pärmi liikidest, millel pole seni MAL klastreid kirjeldatud
2. Iseloomustada pärmi MAL klasterites kodeeritud valkude fülogeneetilisi suhteid
3. Teha kindlaks, millistel α -glükosiidsetel suhkrutel kasvab *S. stipitis* lisaks neile, mille kohta on teave CBS andmebaasis
4. Kirjeldada, kuidas sõltub *S. stipitis*'e α -glükosidaasne aktiivsus söötmele lisatud suhkrust
5. Ennustada *S. stipitis*'e α -glükosidaaside substraadivalikut valgusjärjestuse põhjal
6. Tõestada *S. stipitis*'e α -glükosidaaside substraadivalikut eksperimentaalselt – kas need on maltaasid, isomaltaasid või laia substraadivalikuga maltaas-isomaltaasid

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Järjestuste joondamine, fülogeneesipuude koostamine ja muud *in silico* meetodid

Töös kasutatud pärmitüved ja genoomiandmete allikad on kirjeldatud Viigand *et al.* (2018) (vt lisa 1) meetodika peatükis 2.1 ja esitatud lisa 3 tabelis 4. Genoomidest geeniklastrite otsimise meetodika on kirjeldatud sama artikli peatükis 2.2 (lisa 1).

Valkude fülogeneesipuude koostamiseks kasutatud valgujärjestuste tunnusnumbrid on esitatud lisa 3 tabelites 5 ja 6. Pärmide fülogeneesipuu koostamiseks kasutati 26S rDNA esimese ja teise domeeni järjestust (D1/D2) (Kurtzman *et al.*, 2015). *C. fabianii* puhul kasutati YJS4271 tüve asemel CBS 5640 tüve D1/D2 järjestust, kuna tüve YJS4271 järjestus ei olnud kättesaadav. Nukleotiidsete ja aminohappeliste järjestuste otsimiseks sarnasuse alusel kasutati veebipõhist programmi Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Nukleotiidsete ja aminohappeliste järjestuste joondamisel ja fülogeneesipuude konstrueerimisel kasutati MEGA-X tarkvara (Kumar *et al.*, 2018), joondamisel kasutati ClustalW programmi (Larkin *et al.*, 2007). Fülogeneesipuude koostamiseks kasutati Neighbour Joining meetodit (Saitou ja Nei, 1987). Valgujärjestuste puhul kasutati Dayhoff mudelit (Dayhoff *et al.*, 1978) ja nukleotiidsel järjestusel Maximum Composite Likelihood mudelit (Tamura *et al.*, 2004). *Bootstrap* korduste arv oli tuhat. Kõikide parameetrite puhul, mida pole mainitud, kasutati standardseid parameetreid. Valgujärjestuste identsuse arvutamiseks kasutati BioEdit tarkvara (Hall, 1999). *S. stipitis*'e MAL klastrite asukoha skemaatiliseks kujutamiseks kromosoomil kasutati veebipõhist programmi PhenoGram (Wolfe *et al.*, 2013). *S. cerevisiae* isomaltaasi IMA1 ruumilise struktuuri visualiseerimiseks kasutati programmi Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

2.2.2. *S. stipitis*'e kasvatamine, kasvusubstraatide testimine

S. stipitis CBS 6054 saadi Prof. A. Sibirnylt (Lviv, Ukraina). Pärm kasvatati temperatuuril 30°C tard- või vedelsöötmele, mis sisaldas järgmisi komponente: 0.67% Yeast Nitrogen Base (YNB) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), histidiin (50 mg/L), trüptofaan (50 mg/L), glükoos (0.2%). Pärm kasvusubstraatide testimiseks kasutati YNB vedelsöödet (lisatud histidiin ja trüptofaan), kuid varieeriti süsinikuallikat (glükoosi asemel erinevad α -glükosiidid, lõppkontsentratsiooniga 0.2%). Negatiivse kontrollina kasutati C-allikata söödet. Pärm kasvatati mikroplaadil (Greiner 96-well flat-bottom transparent, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Saksamaa) aereerides. Inokuleerimiseks kasutati 0.2% glükoosiga minimaalsöötmele kasvanud üleökultuuri, inokuleerimisel oli kultuuri algtihedus lainepikkusel

600 nm ligikaudu $A=0.1$. Rakkude optiline tihedus mõõdeti katse alguses ja pärast 24-tunnist kasvu mikroplaadi lugejaga Tecan infinite M200 PROTm (Tecan Group Ltd., Šveits) lainepikkusel 600 nm. Arvutati rakkude optilise tiheduse muutus 24 h jooksul (ΔOD_{600}) ning sellest lahutati negatiivse kontrolli vastav näit.

2.2.3. *S. stipitis*'e rakulüsaadi valmistamine ja analüüs

Erinevatel C-allikatel kasvanud *S. stipitis*'e rakkude lüsaatides mõõdeti α -glükosidaasest aktiivsust. Selleks kasvatati pärmirakke YNB vedelsöötmes, millele olid lisatud aminohapped (vt ptk 2.2.2) ja 1% suhkur (glükoos, maltoos, sahharoos, palatinoos või ksüloos). Kultuuri kasvatati, kuni see jõudis eksponentsiaalse faasi keskossa, rakud sadestati tsentrifuugimisega ja pesti kaks korda maltaasipuhvriga (100 mM K-fosfaatpuhver, 0.1 mM etüleendiamiintetra-äädikhape (EDTA), pH 6.5). Rakud purustati klaaskuulidega. Rakulüsaatides määrati koguvalgu sisaldus kasutades BCA Protein Assay Kit'i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Saadud rakulüsaate kasutati valgupreparaadina α -glükosidaase aktiivsuse mõõtmisel (vt ptk 2.2.6).

2.2.4. α -Glükosidaaside geenide klonimine

S. stipitis'e α -glükosidaaside substraadivaliku uurimiseks kloneriti vastavad geenid (*AGL1*, *MAL6*, *MAL7*, *MAL8*, *MAL9*) pURI3Cter vektorisse (Curiel *et al.*, 2011) ja ekspresseeriti *Escherichia coli*'s. Võrdluseks kloneriti ja ekspresseeriti heteroloogset ka *S. cerevisiae* maltaas *MAL62*. *S. stipitis*'e geenide klonimiseks eraldati pärmist genoomne DNA PowerSoil Kit'iga (MoBio, Carlsbad, CA, USA) ja kasutati seda matriitsina α -glükosidaase kodeerivate geenide amplifitseerimiseks. *S. cerevisiae* geeni klonimiseks kasutati plasmidi pY6 (Charron *et al.*, 1989), mis saadi C. Michels'ilt (New York, NY, USA). See plasmiid sisaldab *S. cerevisiae* gene *MAL61* ja *MAL62*.

Plasmiidide konstrueerimiseks kasutati *E. coli* tüve DH5 α (Invitrogen, CA, USA). Rakkudest eraldati plasmiidne DNA Favor PrepTM Plasmid Extraction Mini Kit'iga (Favorgen Biotech Corp., Taiwan). PCR (polümeraasi ahelreaktsioon, *polymerase chain reaction*) reaktsioonides kasutati rekombinantset Pfu polümeraasi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Kasutatud praimerid on esitatud tabelis 2.

Tabel 2. Konstrueeritud plasmiidid ja selleks kasutatud praimerid. Geenide kloonimiseks pURI3Cter vektorisse kasutatud praimeritel on halli taustaga pURI3Cter vektoriga komplementaarne osa, kaldkirjas on geeni järjestusega komplementaarne osa, rasvases kirjas märgitud start- ja stoppkoodon.

Plasmiid	Kasutatud praimerid	Primeri järjestus 5' → 3' suunaga	Geeni päritoluorganism	Geen
Sc MAL62 pJET1.2	MAL62PURICter_Fw	TAAC TT TAAGAAGGAGATATACAT ATG ACT ATTT CTGATCATCCAGAA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MAL62
	MAL62PURICter_Rev	GCT ATTA ATGATGATGATGATGATG TT TGACGAGGTAG ATT CTAC CTTC		
Sc MAL62 pURI3Cter	MAL62PURICter_Fw	TAAC TT TAAGAAGGAGATATACAT ATG ACT ATTT CTGATCATCCAGAA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MAL62
	MAL62PURICter_Rev	GCT ATTA ATGATGATGATGATGATG TT TGACGAGGTAG ATT CTAC CTTC		
Ss AGL1 pJET1.2	Ss_AGL1_prom_Fw	GATCC ATT GCAACTATCAATCAGT	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	AGL1
	Ss_AGL1_3'_Rev	GCACTAAAG TT CCTATACTAAGGG		
Ss AGL1 pURI3Cter	Ss_AGL1_PURICter_Fw	TAAC TT TAAGAAGGAGATATACAT ATG ACA ATT ACTCGCAACTGGTGG	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	AGL1
	Ss_AGL1_PURICter_Rev	GCT ATTA ATGATGATGATGATGATG TT CAACAATGTAAAGACGTG CTT		
Ss MAL6 pJET1.2	Ss_MAL6_prom_Fw	TTTCTTTTGGATCTCCCCAG	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	MAL6
	Ss_MAL6_3'_Rev	TATTTATTT CGT GTATAACATTA ACT GC		
Ss MAL6 pURI3Cter	Ss_MAL6_PURICter_Fw	TAAC TT TAAGAAGGAGATATACAT ATG ACA ATT GCTCGCAACTGGTGG	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	MAL6
	Ss_MAL6_PURICter_Rev	GCT ATTA ATGATGATGATGATGATG TT CAACAATATATAGACG ACTT		
Ss MAL7 pJET1.2	Ss_MAL7_prom_Fw	ACCACTCTAGAAAGTAATAA ATT CC	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	MAL7
	Ss_MAL7_3'_Rev	GAA AA TATCTTCGATTCATATTTAAGG		
Ss MAL7 pURI3Cter	Ss_MAL7_PURICter_Fw	TAAC TT TAAGAAGGAGATATACAT ATG ACA ATT GCTCGAGAATGGTGG	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	MAL7
	Ss_MAL7_PURICter_Rev	GCT ATTA ATGATGATGATGATGATG TT CAACAATGTATAGACG ACTT		
Ss MAL8 pJET1.2	Ss_MAL8_prom_Fw	GATCTTCATGTATTCATAAATATTTGTA CG	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	MAL8
	Ss_MAL8_3'_Rev	CCAATCCTTCTATGTATCTTCC		
Ss MAL8 pURI3Cter	Ss_MAL8_PURICter_Fw	TAAC TT TAAGAAGGAGATATACAT ATG ACTG TTG CACACAAATGGTGG	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	MAL8
	Ss_MAL8_PURICter_Rev	GCT ATTA ATGATGATGATGATGATG TT CAACAATGTAGAGACG ACCC		
Ss MAL9 pJET1.2	Ss_MAL9_prom_Fw	ATCTCATATTT CAGA ATCAACTACTC	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	MAL9
	Ss_MAL9_3'_Rev	GGT TA CTCTGGAGGAC CCG		
Ss MAL9 pURI3Cter	Ss_MAL9_PURICter_Fw	TAAC TT TAAGAAGGAGATATACAT ATG ACT AAA AGAATCTGGTGG AA G	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	MAL9
	Ss_MAL9_PURICter_Rev	GCT ATTA ATGATGATGATGATGATG TT ACAACAAGTAGAC CCGGCT		

S. stipitis'e α -glükosidaaside geenide 5' ja 3' piirnevad nukleotiidsed järjestused on väga sarnased ja seega oli võimatu disainida praimereid, mis oleksid selektiivsed. Seetõttu amplifitseeriti esmalt genoomselt DNA'lt pikemad järjestused, mis lisaks α -glükosidaasi geenile sisaldasid ka osa promootoralast ja 3' UTR'st (mittetransleeritavast järjestusest). Need produktid viidi kommertsiaalsesse pJET1.2 vektorisse (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) järgides tootja protokollit. Saadud plasmiididelt amplifitseeriti α -glükosidaase kodeerivad geenid (ilma promootor- ja 3' UTR järjestuseta), kasutades praimereid, mis osaliselt anniiluvad geeniga ja osaliselt plasmiidiga pURI3Cter (vt tabel 2). Saadud produktid olid praimeriteks PCR's, kus matriitsina kasutati tühja pURI3Cter vektorit ning mille produktiks oli meid huvitavat geeni sisaldav pURI3Cter plasmiid. Ekspressioonivektorisse pURI3Cter klonerimise meetod on detailselt kirjeldatud artiklis Rivas *et al.* (2007). *S. cerevisiae* geeni MAL62 klonerimisel kasutati sama meetodikat, kuid mõlemasse vektorisse klonerimiseks kasutati pikemaid, nii geeniga kui pURI3Cter vektoriga anniiluvaid praimereid. Konstrueeritud plasmiidid on esitatud tabelis 2.

Ekspressioonivektoritega transformeeritud bakterirakkude kolooniates kontrolliti α -glükosidaasi geeni olemasolu PCR'ga. Selleks kasutatud praimerid on esitatud lisa 4 tabelis 7. Metoodika on kirjeldatud minu bakalaureusetöö peatükis 2.2.3 (Põšnograjeva, 2017). Vektoritesse inserteerunud α -glükosidaasi geenid sekveneeriti, kasutades BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Kanada) komplekti ja modifitseeritud tootjapoolset protokollit, mis on kirjeldatud minu bakalaureusetöö peatükis 2.2.3 (Põšnograjeva, 2017).

2.2.5. Pärmide α -glükosidaaside heteroloogne ekspressioon

Pärmi α -glükosidaasi geeni sisaldavad pURI3Cter plasmiidid transformeeriti *E. coli* rakkudesse, nagu on kirjeldatud minu bakalaureusetöö peatükis 2.2.3 (Põšnograjeva, 2017). pURI3Cter on kõrge koopiaarvuga plasmiid, millelt ekspresseerides lisandub valgu C-terminusesse His₆-järjestus, mis võimaldab valgu puhastamist Ni²⁺-afiinsuskromatograafia abil (Curiel *et al.*, 2011). α -Glükosidaaside ekspressiooniks kasutati *E. coli* tüve BL21(DE3), mille genoomis on IPTG'ga (isopropüül- β -D-1-tiogalaktopüranosiid) indutseeritav T7 polümeraasi geen (Studier ja Moffatt, 1986). *E. coli* transformante kasvatati ampitsilliini (0.15 mg/mL) sisaldavas LB (Luria puljongsoode) tard- või vedelsöötmes temperatuuril 37°C. Pärmi α -glükosidaasi geeni olemasolu transformantides kontrolliti PCR'ga. Aktiivse α -glükosidaasi olemasolu tuvastamiseks transformantides testiti permeabiliseeritud bakterirakkudes p-nitrofenooli

teket PNPG'st (Zimmermann *et al.*, 1977), nagu kirjeldatud minu bakalaureusetöös peatükis 2.2.3 (Põšnograjeva, 2017).

Heteroloogset ekspressiooniga *S. stipitis*'e α -glükosidaaside (AGL1, MAL6, MAL7, MAL8, MAL9) aktiivsust substraadivaliku hindamiseks mõõdeti *E. coli* rakulüsaadis. Lisaks puhastati kaks pärmivalgu (*S. cerevisiae* MAL62 ja *S. stipitis* AGL1) Ni^{2+} -afiinsuskromatograafiaga ning nende substraadivaliku iseloomustamiseks kasutati ensüümpreparaadina puhastatud valku (vt ptk 2.2.6). Heteroloogset valguekspressiooni, rakulüsaadi valmistamist ja valgu puhastamist on detailselt kirjeldatud minu bakalaureusetöös peatükkides 2.2.4-2.2.6 (Põšnograjeva, 2017). Rakulüsaati, rakkude purustamisel tekkinud sadet ja puhastatud valguga fraktsioone analüüsiti denatureeriva 10% polüakrüülamiidgeelelektroforeesiga (SDS (naatriumdodetsüülsulfaat)-PAGE) (Sambrook *et al.*, 1989), valgu suurusmarkerina kasutati Protein Ladder Blue Prestained (Naxo, Eesti).

Rakulüsaatides määrati koguvalgu sisaldus BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) abil. Puhastatud valgu puhul määrati valgu kontsentratsioon spektrofotomeetriliselt mikroplaadil (NanoQuantPlate; Tecan Group Ltd., Šveits) mikroplaadilugejaga Tecan infinite M200 PROTM (Tecan Group Ltd., Šveits). Andmete kogumiseks kasutati Tecan'i control programmi (Tecan Group Ltd., Šveits). Valgukontsentratsioon arvutati valemiga $C=A/(\epsilon \cdot L)$, kus C on kontsentratsioon (mg/ml), A on optiline tihedus lainepikkusel 280 nm, ϵ on ekstinktsioonikoefitsient ja L on lahuse kihi paksus. α -Glükosidaaside ekstinktsioonikoefitsientide väärtused arvutati ExpASy serveris (Gasteiger *et al.*, 2003).

2.2.6. α -Glükosidaaside aktiivsuse mõõtmine

E. coli ja *S. stipitis*'e rakulüsaatide ning puhastatud valkude α -glükosidaasne aktiivsus määrati temperatuuril 30°C, kasutades järgmisi substraate ja kontsentratsioone: 1 mM PNPG ning maltoos, sahharoos, palatinoos ja α -MG (kõik 100 mM). PNPG hüdrolyüsireaktsiooni algkiirust mõõdeti p-nitrofenooli vabanemise järgi (Zimmermann *et al.*, 1977). Ülejäänud substraatide hüdrolyüsireaktsioonide algkiirusi mõõdeti glükoosi vabanemise järgi (Ernits *et al.*, 2017). Sahharoosi ja α -MG hüdrolyüsimisel vabaneb üks glükoosi molekul lõhustatud substraadi kohta, maltoosi ja isomaltoosi puhul kaks.

Eriaktiivsused arvutati ühe minuti jooksul hüdrolyüsitud substraadi hulgana mikromoolides mg valgu kohta ($\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$; U/mg). Kuna *S. stipitis*'e MAL7, MAL8 ja MAL9 puhul mõõdeti

α -glükosidaasset aktiivsust ainult ensüümi ekspresseeriva *E. coli* lüsaadis, siis tehti ka kontrollkatse, milles kõikide kasutatud α -glükosiidide hüdrolüüsi mõõdeti lüsaadiga tühja pURI3Cter vektorit sisaldava *E. coli* rakkudest. α -Glükosidaasse aktiivsuse puudumine selles lüsaadis näitas, et *E. coli* puudub endogeenne α -glükosidaasne aktiivsus. Seda teadmist oli varem kasutatud ka *O. polymorpha* maltaasi substraadispetsiifika ja muude omaduste kirjeldamisel, kasutades ensüümpreparaadina *O. polymorpha* maltaasi valku ekspresseeriva *E. coli* lüsaati (Liiv et al., 2001).

2.2.7. Invertaasi olemasolu testimine pärmilüsaadis

Invertaasi olemasolu *S. stipitis*'e rakulüsaadis määrati 100 mM K-fosfaatpuhvril, hinnates rafinoosi hüdrolüüsi. Reaktsioonisegu inkubeeriti 1 h temperatuuril 30°C. Reaktsiooniproductide tuvastamiseks lahutati reaktsioonisegus sisalduvad suhkrud õhukese kihiga kromatograafiaga (TLC), nagu kirjeldatud minu bakalaureusetöös peatükis 2.2.8 (Põšnograjeva, 2017).

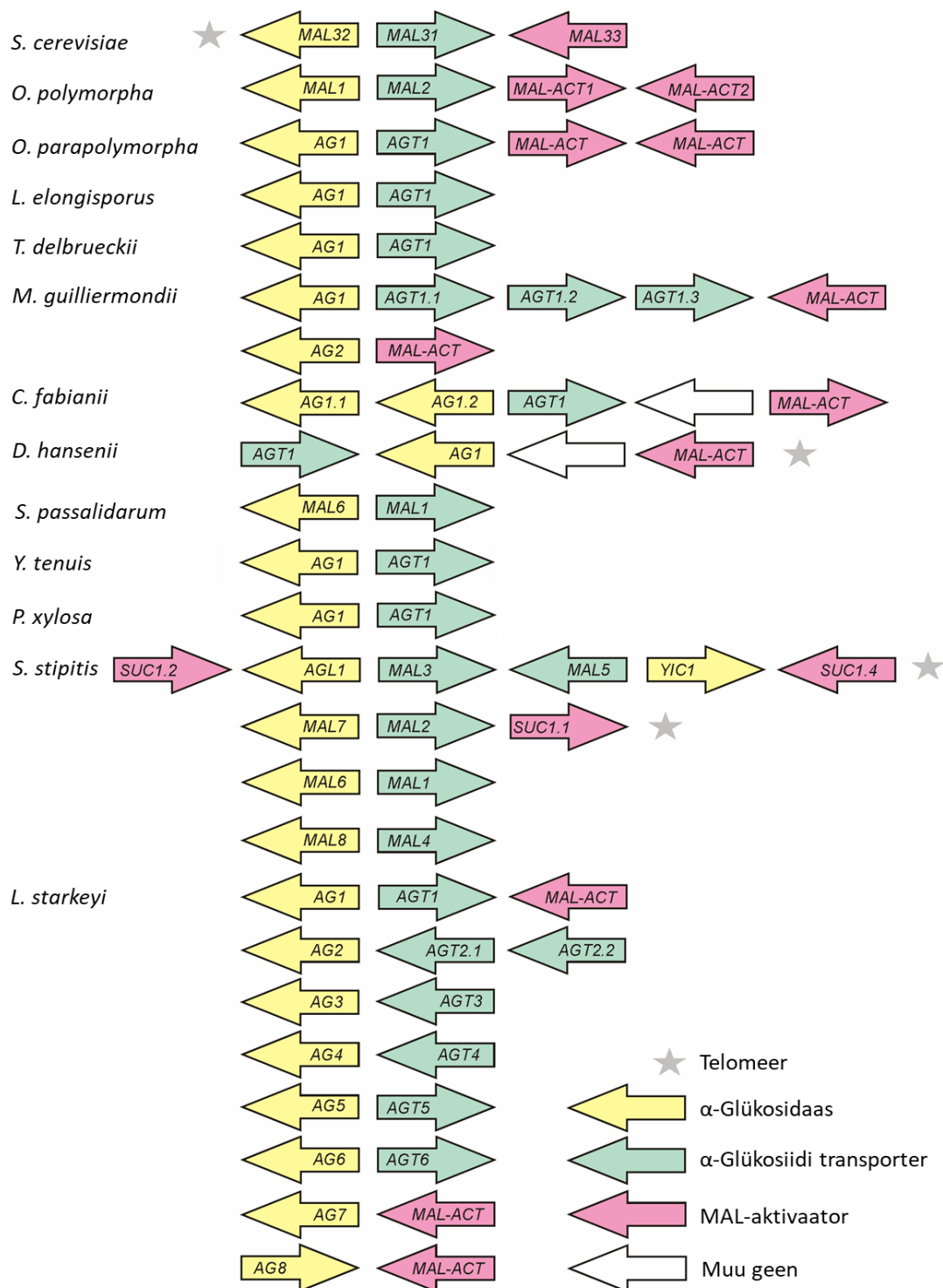
2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. MAL klastrid mitte-konventsionaalsetes pärmides

Maltoosi metabolismi klastreid on kirjeldatud pagaripärmil ja viiel mitte-konventsionaalsel pärmil (vt ptk 1.2.6). Käesoleva töö ülesanne oli otsida MAL klastreid mitte-konventsionaalsetest sekveneeritud genoomiga pärmiliikidest, mis kasvavad maltoosil ja millel MAL klastreid pole seni kirjeldatud. Teadmised MAL klastrite olemasolu ja ehituse kohta pärmiliikidel, millel on erinev looduslik nišš ja fülogeneetiline kaugus *S. cerevisiae*'st, võimaldab teha järeldusi MAL klastrite olulisuse ja evolutsiooni kohta.

Kasutatud pärmitüved ja genoomiandmete allikad on esitatud lisa 3 tabelis 4. Geeniklastrite otsimise meetodika on kirjeldatud Viigand *et al.* (2018) artikli peatükis 2.2 (lisa 1). MAL klaster defineeriti kui vähemalt kahest geenist koosnev klaster, mille üks geen kodeerib potentsiaalset α -glükosidaasi ja teine potentsiaalset α -glükosiidi transporterit või potentsiaalset MAL-aktivaatorit. Neid valke ei ole biokeemiliselt kirjeldatud ja nende funktsiooni ennustus põhineb järjestuse sarnasusel varem kirjeldatud valkudega. Pärmide *S. passalidarum*, *P. xylosa* ja *Y. tenuis* genoomidest otsis MAL klastreid käesoleva töö autor. Pärmide *L. elongisporus*, *M. guilliermondii*, *D. hansenii*, *C. fabianii*, *L. starkeyi*, *B. adeninivorans* ja *S. pombe* genoomidest otsis MAL klastreid Katrin Viigand (lisa 1). Varasemalt on kirjeldatud järgmiste pärmide MAL klastrid: *S. cerevisiae* (Needleman, 1991; Brown *et al.*, 2010), *O. polymorpha* (Viigand *et al.*, 2005), *O. parapolyomorpha* (Ravin *et al.*, 2013), *T. delbrueckii*

(Alves-Araújo *et al.*, 2004) ja *S. stipitis* (Jeffries ja Van Vleet, 2009). Kõikide nende pärmide MAL klastrid on kujutatud joonisel 7.



Joonis 7. Pärmide MAL klastrid ja nende ehitus. MAL klastrite otsimine genoomsetest andmetest on kirjeldatud Viigand *et al.* (2018) artikli peatükis 2.2 (lisa 1). Varasemalt on avaldatud info järgmiste pärmide MAL klastrite kohta: *S. cerevisiae* (Needleman, 1991; Brown *et al.*, 2010), *O. polymorpha* (Viigand *et al.*, 2005), *O. parapolymorpha* (Ravin *et al.*, 2013), *T. delbrueckii* (Alves-Araújo *et al.*, 2004), *S. stipitis* (Jeffries ja Van Vleet, 2009). Joonise koostamisel on alusena kasutatud joonist Viigand *et al.* (2018) artiklist (lisa 1).

Käesolevas töös käsitletud pärmide genoomidest ei leitud ühtegi *MAL* klastrit pärmidel *B. adenivorans* ja *S. pombe*. Need pärmid assimileerivad sellele vaatamata maltoosi, kuna sisaldavad genoomis klasterdumata *MAL* geene (Chi *et al.*, 2008; lisa 1). Järelikult ei ole *MAL* geenide klasterdumine tingimata vajalik maltoosi kasutamiseks. Enamikel pärmidel (üheksal viieteistkümnest) leiti üks *MAL* klaster. Nendest andmetest lähtub, et *MAL* geenide klasterdumine annab pärmile evolutsioonilise eelise ning paljude pärmiliikide puhul piisab ühest *MAL* klastrist, et pärm assimileeriks α -glükosiidseid substraate piisavalt efektiivselt.

Mõnel pärmil on *MAL* klastreid rohkem – *M. guilliermondii*'l kaks, *S. stipitis*'el neli (Jeffries ja Van Vleet, 2009) ja *S. cerevisiae*'l viis (joonisel 7 on kujutatud neist üks) (Needleman, 1991; Brown *et al.*, 2010). Kõige rohkem *MAL* klastreid, kaheksa, on *L. starkeyi*'l (lisa 1). Teadaolevalt on *L. starkeyi Lipomyces kononekoe* järel parim tärglist lagundav pärm. (Spencer-Martins ja Uden, 1977). Tärglise lagundamisel tekib maltoosi, maltotrioosi ja isomaltoosi (vt ptk 1.2.3, joonis 2), mille edasist metabolismi viivad läbi *MAL* valgud. Seega võib oletada, et kui pärmi oluliseks C- ja energiaallikaks on tärglis, annab *MAL* klastrite rohkus genoomis pärmile evolutsioonilise eelise. Lisaks, kui pärmi genoomis on mitu *MAL* klastri koopiat, võimaldab see *MAL* valkudel spetsialiseeruda. Näiteks viie *MAL* klastriga *S. cerevisiae*'l on evolutsiooni käigus ilmselt üks laia substraadivalikuga α -glükosidaas duplitseerunud ja evolutsioneerunud maltaasideks ja isomaltaasideks (Brown *et al.*, 2010; Voordeckers *et al.*, 2012), kuid ühe *MAL* klastriga *O. polymorpha*'l on üks laia substraadivalikuga α -glükosidaas ehk maltaas-isomaltaas (Viigand *et al.*, 2016). Kaheksa *MAL* klastriga *L. starkeyi*'l on substraadivalikut kirjeldatud vaid ühel ekstratsellulaarsel α -glükosidaasil, mis osutus maltaas-isomaltaasiks (Kelly *et al.*, 1985). Ei ole teada, millise geeni produkt kirjeldatud α -glükosidaas on ning millisesse GH perekonda (13 või 31) see kuulub. Nelja *MAL* klastriga *S. stipitis*'e α -glükosidaaside substraadivalikut pole uuritud.

Kui geen või klaster asub pärmi kromosoomi subtelomeerses alas, siis on selle duplitseerumise tõenäosus suurem (vt ptk 1.3.4) (Brown *et al.*, 2010). *S. cerevisiae* ja *S. stipitis*'e puhul peab see seos paika: *S. cerevisiae* viis klastrit on kõik subtelomeersed, *S. stipitis*'el on subtelomeersed kaks *MAL* klastrit neljast (vt joonis 7, subtelomeerne klaster on tähistatud halli tähega). *L. starkeyi* genoom ei ole assambleeritud kromosoomide tasemel, seega ei ole võimalik kindlaks teha, kas selle *MAL* klastrid paiknevad subtelomeerses kromosoomide osades. Ühe *MAL* klastriga *O. polymorpha*'l ja *O. parapolyomorpha*'l ei ole *MAL* klastrid

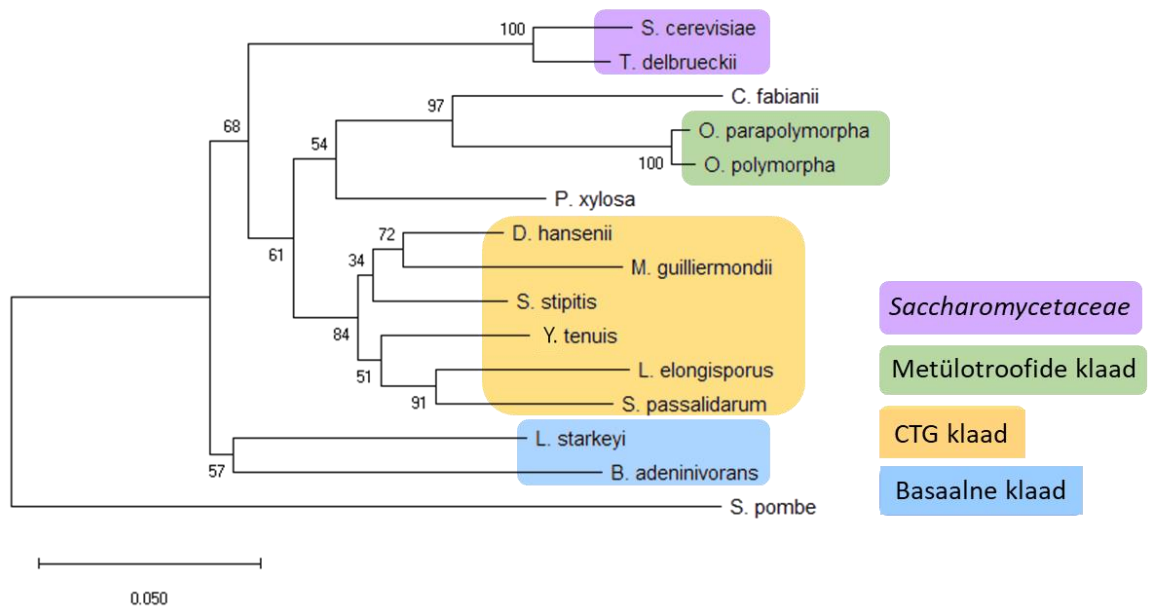
subtelomeersed. Kuid see seaduspära ei pea alati paika, näiteks *D. hansenii* ainuke *MAL* klaster asub subtelomeerses piirkonnas.

MAL klastrite ehituses on konserveerunud α -glükosidaasi ja α -glükosiidi transporteri divergentne asend. Need kaks geeni paiknevad divergentselt seitsmeteistkümnel ja mitte-divergentselt neljal *MAL* klastril, mis on esitatud joonisel 7. Tänu geenide divergentssele asetusele võivad need jagada kahesuunalist promootorala, mis tagab divergentselt paiknevate geenide efektiivse koregulatsiooni (Viigand *et al.*, 2005; Nützmänn *et al.*, 2018). Jagatud promootorist tulenev evolutsiooniline eelis on tõenäoliselt peamine *MAL* klastreid koos hoidev tegur, kuigi ei saa välistada, et olulist rolli mängib ka klasteri geenide koospärandumise suurem tõenäosus ja sarnane kromatiini pakituse aste (vt ptk 1.3.3). *MAL*-aktivaatori olemasolu ja asend pärmide *MAL* klastris ei ole tugevalt konserveerunud – vaid pooled joonisel 7 kujutatud klastrid sisaldavad *MAL*-aktivaatori geeni. See aga ei tähenda, et pärmi genoomis *MAL*-aktivaator puudub, tõenäoliselt see lihtsalt ei ole α -glükosidaasiga ja α -glükosiidi transporteriga klasterdunud.

2.3.2. *MAL* geenide fülogenees mitte-konventsionaalsetes pärmides

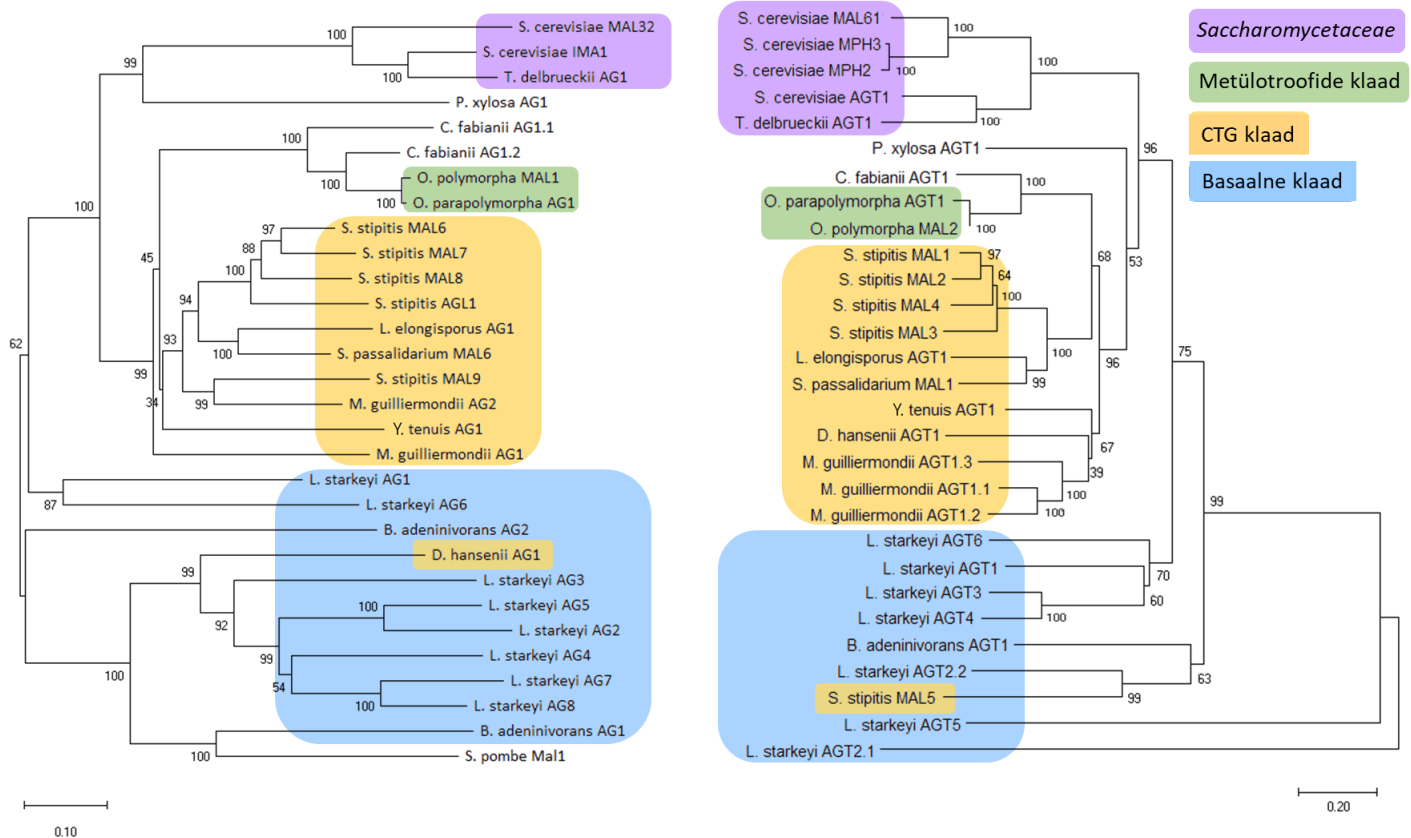
Töös käsitletud pärmiliikide (vt ptk 1.1) evolutsiooni kujutab fülogeneesipuu joonisel 8. Selle fülogeneesipuu koostamisel kasutati 26S rDNA esimese ja teise domeeni järjestust (D1/D2) (vt ptk 2.2.1) (Kurtzman *et al.*, 2015). Puul on värvilise taustaga eristatud alamhõimkonna *Saccharomycotina* klaadid: *Saccharomycetaceae* klaad, metülotroofsete pärmide klaad (vt ptk 1.1.2), alternatiivse koodonikasutusega pärmidest koosnev CTG klaad (vt ptk 1.1.13) ja *Saccharomycotina* basaalne klaad (Dujon ja Louis, 2017).

Gabriško (2013) püstitas hüpoteesi, et kottseente eellase genoomis oli kaks α -glükosidaasi kodeerivat geeni: maltaasi ja isomaltaasi geen. *Saccharomycotina* alamhõimkonnas läks isomaltaasi kodeeriv geen kaduma ning maltaasi kodeeriv geen jäi alles, see duplitseerus mitmes pärmiliinis ja osad koopiad divergeerusid isomaltaasideks (Gabriško, 2013). Seega laia substraadivalikuga maltaas-isomaltaasid, nagu näiteks *O. polymorpha* MAL1, võiks olla evolutsiooni vaheaste (Viigand *et al.*, 2016). Voordeckers *et al.* (2012) püstitas aga hüpoteesi, et *S. cerevisiae* maltaaside ja isomaltaaside eellaseks oli laia substraadivalikuga α -glükosidaas. Need kaks hüpoteesi ei välista siiski teineteist – kui kottseente α -glükosidaaside eellaseks oli maltaas, võis see tänapäevaste pärmiliikide eellasel areneda laia substraadivalikuga α -glükosidaasiks ning seejärel evolutsioneeruda erinevates pärmiliikides tagasi kitsama substraadivalikuga maltaasideks ja isomaltaasideks.



Joonis 8. Pärmiliikide fülogeneesipuu. Saccharomycotina erinevatesse klaididesse (Dujon ja Louis, 2017) kuuluvad pärmid on märgistatud vastava taustavärviga. Fülogeneesipuude sõlmedes on näidatud *bootstrap* väärtus protsendina (tuhande korduse põhjal). Skaala pikkus tähistab viite asendust saja positsiooni kohta. Fülogeneesipuu konstrueerimine on kirjeldatud peatükis 2.2.1.

Käesoleva töö üks ülesanne oli iseloomustada mitte-konventsionaalsete pärmide *MAL* klastrite geenide kodeeritud valkude fülogeneetilisi suhteid. Selleks koostati eelmises peatükis kirjeldatud *MAL* klastrisse kuuluvate geenidega kodeeritud α -glükosidaaside ja α -glükosiidi transporterite valgujärjestuste põhjal fülogeneesipuud, mis on näidatud joonisel 9. Kasutatud valkude tunnusnumbrid on esitatud lisas 3 tabelites 5 ja 6. Analüüsist jäeti välja *S. stipitis*'e valk YIC1, kuna see on väga erinev ülejäänud pärmide α -glükosidaasidest. YIC1 on ennustuse järgi α -glükosidaas/ksülosidaas ja kuulub perekonda GH31 (Jeffries ja Van Vleet, 2009). Kuna pärmidel *B. adenivorans* ja *S. pombe* puuduvad *MAL* klastrid, siis kaasati fülogeneesipuude koostamisse eksperimentaalselt uuritud (*S. pombe* Mal1) või *O. polyomorpha* MAL1 (α -glükosidaas) ja MAL2 (α -glükosiidi transporter) valkudele kõige sarnasemad homologid (*B. adenivorans*'i AG1, AG2 ja AGT1).



Joonis 9. Pärmide α -glükosidaaside (vasakpoolne) ja α -glükosiidi transporterite (parempoolne) fülogeneesipuud. Pärmivalkude taust on värviliselt märgistatud vastavalt Saccharomycotina alamgrupile (vt joonis 8) (Dujon ja Louis, 2017). Fülogeneesipuude sõlmedes on näidatud *bootstrap* väärtus protsendina (tuhande korduse põhjal). Vasakpoolse fülogeneesipuu skaala pikkus tähistab ühte asendust kümne aminohappelise positsiooni kohta ja parempoolse fülogeneesipuu skaala pikkus tähistab kahte asendust kümne positsiooni kohta. Fülogeneesipuude koostamine on kirjeldatud peatükis 2.2.1.

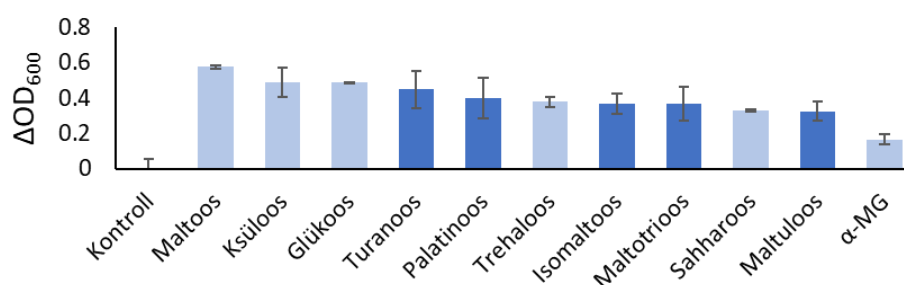
Valkude fülogeneesipuud (joonis 9) langevad suures osas kokku pärmiliikide fülogeneesipuuga (joonis 8) – erinevatel puudel saab eristada samu alamgruppe (tähistatud värvilise taustaga). Seega võis MAL klaster, mis koosnes divergentselt paiknevatest α -glükosidaasi ja α -glükosiidi transporterite geenist, olemas olla juba Saccharomycotina eellase genoomis. See MAL klaster jäi püsima ja evolutsioneerus paljudes pärmiliinides. Mõnes liinis MAL klaster duplitseerus korduvalt. Kahel juhul ei langenud liikide fülogenees ja valkude fülogenees kokku – *S. stipitis*'e α -glükosiidi transporterite MAL5 ja *D. hansenii* α -glükosidaasi AG1 puhul – need klasterdusid kokku Saccharomycotina basaalse klaadi vastavate valkudega. See võib viidata horisontaalse geeniülekanne toimumisele. Kuigi geeniülekanne seente erinevate liikide vahel on haruldane (Wisecaver ja Rokas, 2015), võib see siiski seletada nende valkude fülogeneetilisi suhteid. Ka Gabriško (2013) tähendas *D. hansenii* α -glükosidaasi ebatavalisi fülogeneetilisi suhteid pärmide α -glükosidaasidega ja seletas seda potentsiaalse horisontaalse geeniülekanne toimumisega. Selleks, et täpsemini ennustada α -glükosidaaside ja nende substraadivaliku

evolutsiooni, on vaja kirjeldada enamate tänapäevaste pärmide α -glükosidaaside substraadivalikut.

2.3.3. Pärm *S. stipitis* kasv α -glükosiidsetel suhkrutel

CBS andmebaasi (<http://www.westerdijkinstituut.nl/>) andmetel kasvab *S. stipitis* CBS 6054 järgmistel α -glükosiidsetel suhkrutel: sahharoos, maltoos, trehaloos ja α -MG (suhkrute struktuur on esitatud lisas 2). Seega assimileerib *S. stipitis* maltoosi-tüüpi suhkruid (maltoosi), kuid isomaltoosi-tüüpi substraatidest on *S. stipitis*'e kasvu näidatud ainult α -MG'l, mis on mitteleoduslik α -glükosiid. Looduses esinevatel isomaltoosi-tüüpi suhkrutel isomaltoosil ja palatinoosil ei ole selle pärm kasvu testitud. Käesoleva töö ülesanne oli uurida, millistel α -glükosiidsetel suhkrutel kasvab *S. stipitis* lisaks neile neljale, mille kohta on teave CBS andmebaasis olemas.

Metoodika *S. stipitis*'e kasvu testimiseks erinevatel substraatidel on kirjeldatud peatükis 2.2.2. Uuriti *S. stipitis*'e võimet kasvada maltoosi-tüüpi suhkrutel turanoosil, maltuloosil ja maltotrioozil ning isomaltoosi-tüüpi suhkrutel isomaltoosil ja palatinoosil (suhkrute struktuur on esitatud lisas 2). Selleks, et kontrollida saadud tulemuste usaldusväärsust, testiti paralleelselt selle pärm kasvu ka neljal α -glükosiidsetel suhkrul ja monosahhariididel glükoosil ja ksüloosil, mida *S. stipitis* kirjanduse andmetel assimileerib. Tulemused on esitatud joonisel 10. *S. stipitis* kasvas kõikidel suhkrutel, mille kohta oli vastav info CBS andmebaasis. Samuti kasvas pärm kõikidel esmakordselt testitud substraatidel. Järelikult assimileerib *S. stipitis* paljusid erinevaid maltoosi-tüüpi suhkruid ning ka looduses esinevaid isomaltoosi-tüüpi suhkruid.



Joonis 10. *S. stipitis*'e kasv 0.2% lõppkontsentratsiooniga suhkrutel. Pärm kasvatati mikroplaadil 24 h ja kasvu hinnati kultuuri optilise tiheduse järgi (vt ptk 2.2.2). Tumesinised tulbad kujutavad pärm kasvu substraatidel, mille kohta varasemalt teavet ei olnud. Helesinised tulbad kujutavad kasvu substraatidel, mille kohta oli teave CBS andmebaasis (<http://www.westerdijkinstituut.nl/>) olemas. Vearibad näitavad standardhälvet.

Kuna *S. stipitis*'el on genoomis viis α -glükosidaasi kodeerivat geeni (Jeffries ja Van Vleet, 2009), siis on kaks võimalust seletada, kuidas on võimalik selle pärm kasvu erinevatel α -glükosiidsetel

suhkrutel: (i) vähemalt üks *S. stipitis*'e α -glükosidaas on funktsionaalne maltaas ja üks on funktsionaalne isomaltaas või (ii) vähemalt üks on laia substraadivalikuga funktsionaalne α -glükosidaas, sarnaselt *O. polymorpha* valguga MAL1 (Viigand *et al.*, 2016).

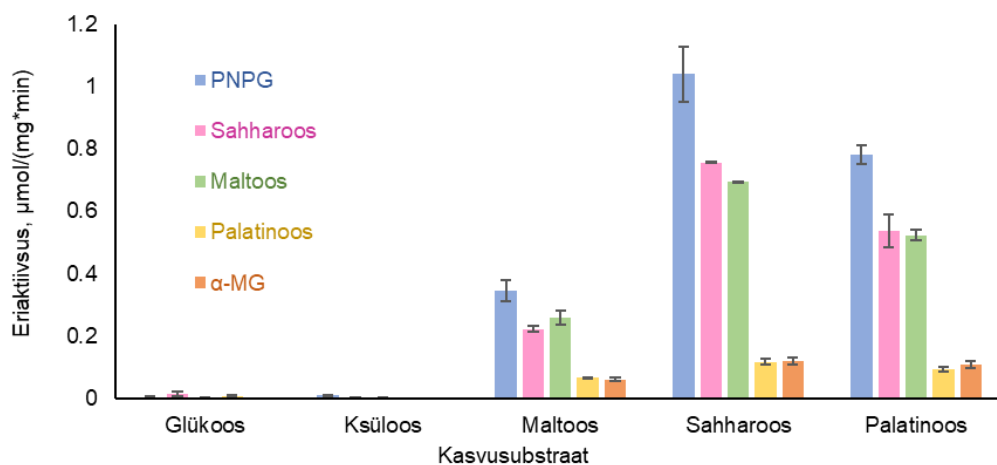
2.3.4. α -Glükosidaasne aktiivsus *S. stipitis*'e rakulüsaatides

Pärmide eelistatuid C- ja energiaallikad on monosahhariidid glükoos ja fruktoos. Seetõttu glükoosil kasvanud *S. cerevisiae*, *C. albicans* ja *O. polymorpha* rakkudes α -glükosidaase ei sünteesita glükoosi repressiooni tõttu, mis transkriptsiooni tasemel paneb kinni vastavate geenide ekspressiooni (Geber *et al.*, 1992; Bell *et al.*, 1995; Alamäe ja Liiv, 1998). Kirjanduse andmetel indutseerub α -glükosidaaside ekspressioon, kui rakkude kasvukeskkonnas on α -glükosiidseid suhkruid, kuid ekspressiooni tugevus sõltub ka α -glükosiidist. Nii näiteks indutseerib maltoos pagaripärmil maltaaside (MAL12 ja MAL32) ekspressiooni keskmiselt 5.2 korda tugevamini kui isomaltoos. Isomaltaaside IMA2 ja IMA5 ekspressiooni indutseerib aga tugevamini isomaltoos, keskmiselt vastavalt 2 ja 1.6 korda tugevamini kui maltoos. Isomaltaaside IMA3/IMA4 (järjestuselt identsed valgud) ekspressioon on nii maltoosil kui ka isomaltoosil sama tugev ja isomaltaasi IMA1 ekspressiooni indutseerib maltoos veidi (keskmiselt 1.5 korda) tugevamini kui isomaltoos (Teste *et al.*, 2010).

S. stipitis'e *MAL* geenide ekspressiooni ei ole põhjalikult uuritud. Ksüloosil kasvades detekteeriti vaid ühe α -glükosidaasi (MAL8) ekspressioon väga madalal tasemel (Jeffries *et al.*, 2007). Samuti mainiti, et ühe *MAL* klasteri (sisaldab *MAL6* ja *MAL1* geeni, vt joonis 7) ekspressiooni indutseeritakse tugevalt, kui pärmirakud kasvavad maltoosil (Jeffries ja Van Vleet, 2009).

Käesoleva töö ülesanne oli kirjeldada, kuidas sõltub *S. stipitis*'e α -glükosidaaside ekspressioon söötmele lisatud suhkrust. Selleks kasvatati *S. stipitis*'e rakke 1% monosahhariidiga (glükoos või ksüloos) või α -glükosiidse disahhariidiga (sahharoos, maltoos või palatinoos) söötmes (vt ptk 2.2.2). Pärmirakkudest valmistati lüsaat (vt ptk 2.2.3) ja seda kasutati ensüümiallikana α -glükosidaasse aktiivsuse mõõtmisel (vt ptk 2.2.6), kasutades järgmisi substraate: PNPG, sahharoos, maltoos, palatinoos ja α -MG. PNPG kontsentratsioon reaktsioonisegus oli 1 mM, kõikidel ülejäänud suhkrutel 100 mM. Saadud tulemused on esitatud joonisel 11. *S. stipitis*'e genoomis on viis α -glükosidaasi kodeerivat geeni (Jeffries ja Van Vleet, 2009), seega ei saa pärmiraku lüsaati kasutades mõõdetud aktiivsuste põhjal teha järeldusi üksikute geenide ekspressioonitaseme ega valkude substraadivaliku kohta. Küll aga saab selle katse tulemuste

põhjal teha järeldusi selle kohta, milline on *S. stipitis*'e üldine võime hüdrolüüsida α -glükosiidseid substraate ja kuidas seda mõjutab C-allikas pärmi kasvusöötmes.



Joonis 11. α -Glükosidaasne eriaktiivsus erinevatel suhkrutel kasvatatud *S. stipitis*'e rakulüsaatides. Vearivad näitavad eriaktiivsuste standardhälvet.

Glükoosil kasvanud *S. stipitis*'el ei olnud α -glükosidaasest aktiivsust või jäi see mõõtevea piiresse. Järelikult *S. stipitis*'el, sarnaselt juba uuritud pärmidele, surutakse glükoosil kasvades α -glükosidaaside ekspressioon alla. *S. stipitis* on ka väga efektiivne ksüloosi fermenteerija (vt ptk 1.1.8), mistõttu kasutasime pärmi kasvusubstraadina ka ksüloosi. Ksüloosil kasvanud pärmirakkudes ei olnud α -glükosidaasest aktiivsust. Järelikult eelistab *S. stipitis* C- ja energiaallikana α -glükosiidsetele suhkrutele monosahhariide glükoosi ja ksüloosi.

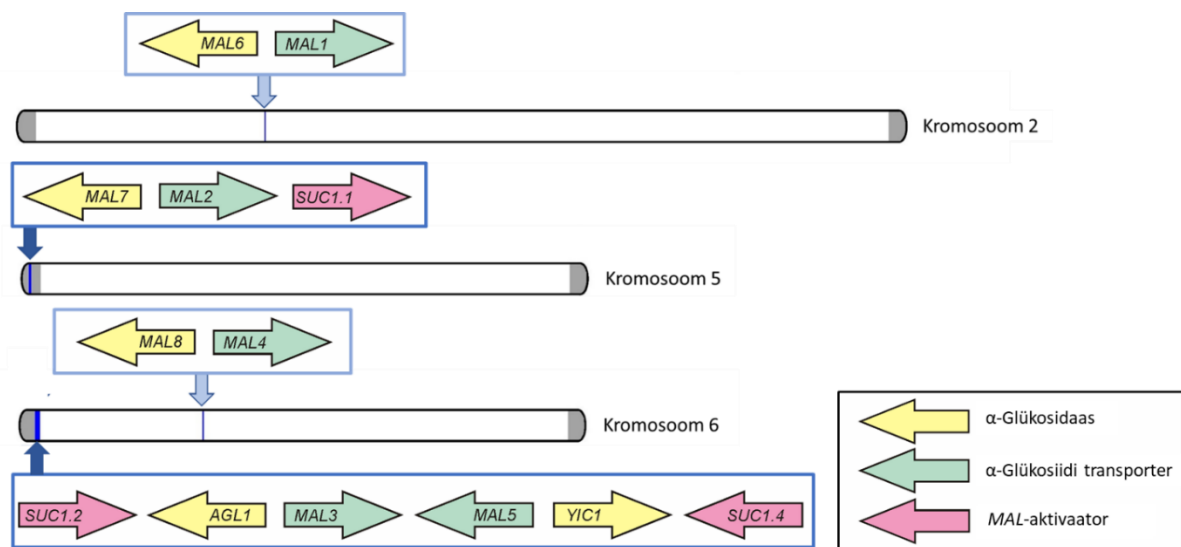
α -Glükosiidsetel disahhariididel maltoosil, sahharoosil ja palatinoosil kasvanud pärmirakkude lüsaadis on α -glükosidaasne aktiivsus olemas. Sahharoos oli testitud kasvusubstraatidest kõige efektiivsem α -glükosidaaside ekspressiooni indutseerija. Kõigil kolmel α -glükosiidsetel suhkrul kasvanud rakud hüdrolüüsisid nii maltoosi- kui ka isomaltoosi-tüüpi substraate. Eriaktiivsuste muster on kolmel substraadil kasvanud rakkudel sarnane: kunstlikku substraati PNPG'd hüdrolüüsitakse kõige efektiivsemalt, isomaltoosi-tüüpi suhkruid palatinoosi ja α -MG'd aeglasemini. Vastupidiselt sahharoosil ja palatinoosil kasvanud rakkudele, on maltoosil kasvanud pärmirakkudel maltoosi hüdrolüüsi aktiivsus veidi kõrgem kui sahharoosi oma, kuigi erinevus ei ole märkimisväärselt suur. Järelikult *S. stipitis*'e rakulüsaatide α -glükosidaase aktiivsuse substraadivaliku muster ei sõltu oluliselt sellest, kas kasvukeskkonnas on maltoosi- või isomaltoosi-tüüpi suhkrut. Võib-olla pole *S. stipitis*'el spetsialiseerunud α -glükosidaase nagu pagaripärmil või pole nende ekspressioon tugevalt reguleeritud sõltuvalt kasvusubstraadi tüübist.

Kasutades rakulüsaati ensüümpreparaadina reaktsioonisegudes peab arvestama, et ensüümi substraati võivad lõhustada ka teised rakulüsaadis sisalduvad ensüümid. Antud katses kasutati reaktsioonisegus α -glükosidaasi substraadina sahharoosi, mida suudab hüdroolüüsida ka invertaas (EC 3.2.1.26). Seega testiti, kas *S. stipitis*'el on olemas invertaas. Esmalt otsiti *S. stipitis*'e genoomist veebipõhise programmi Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) abil pagaripärmi invertaasi geenile (GenBank tunnusnumber BAJ07815.1) sarnast geeni, kuid ühtegi vastet ei saadud. Seejärel testiti invertaasi olemasolu *S. stipitis*'el biokeemiliste meetoditega. Invertaas hüdroolüüsib lisaks sahharoosile ka rafinoosi (suhkru struktuur esitatud lisa 2), mis ei ole substraadiks α -glükosidaasidele (Sainz-Polo *et al.*, 2013). Uuriti rafinoosi lagundamist reaktsioonisegus, kus ensüümpreparaadiks oli sahharoosil kasvanud *S. stipitis*'e rakulüsaat ning reaktsiooni produkte analüüsiti TLC'ga (vt ptk 2.2.7). Invertaasset aktiivsust *S. stipitis*'el ei olnud, järelikult põhjustasid katses mõõdetud sahharoosi hüdroolüüsi α -glükosidaasid. Invertaasnegatiivseid pärme on teisigi. Näiteks puudub invertaas *O. polymorpha*'l, mis kasvab sahharoosil, lagundades sahharoosi raku sees maltaasiga (Alamäe ja Liiv, 1998). Sahharoos transporditakse raku α -glükosiidide transporteriga MAL2, mis transpordib ka teisi α -glükosiidseid suhkruid (Viigand ja Alamäe, 2007). Pagaripärmil lagundab sahharoosi raku pinnale seostunud invertaas ja sahharoosi laguproduktid – glükoos ja fruktoos – transporditakse raku (Alamäe ja Liiv, 1998 ja sealsed viited).

2.3.5. *S. stipitis*'e α -glükosidaaside substraadivaliku ennustamine

S. stipitis'e α -glükosidaaside AGL1, MAL6, MAL7, MAL8 ja MAL9 valgularjenduste identsus jääb vahemikku 66%...85%. Andmed *S. stipitis*'e ja teiste pärmivalkude identsuse kohta on esitatud artikli Viigand *et al.* (2018) lisamaterjalina. Jeffries *et al.* (2009) näitasid, et *S. stipitis*'e neli α -glükosidaasi kodeerivad geenid (*AGL1*, *MAL6*, *MAL7* ja *MAL8*) on klasterdunud ja üks (*MAL9*) ei paikne klasteris. Autorid arvavad, et esialgu oli *S. stipitis*'e genoomis üks *MAL* klaster, mis koosnes kahest divergentselt paiknevatest geenist – α -glükosidaasi ja α -glükosiidi transporterit kodeerivast geenist. Tekkinud klaster duplitseerus korduvalt ja divergentne klasteri geenide asetus säilus, kuid geenid evolutsioneerusid. Tõenäoliselt kuulus ka *MAL9* klasterisse, kuid kaotas evolutsiooni käigus oma partnertransporteri ja paikneb nüüd teise transportvalgu, ennustatud $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporterit kõrval (Jeffries ja Van Vleet, 2009). Käesolevas töös jäeti joondustest, fülogeneesipuudelt ja edasisest analüüsist välja kuuendas kromosoomis asuvast telomeersest klasterist pärit geen *YIC1* (vt ptk 2.3.2). *S. stipitis*'e *MAL* klasterite ehitus ja asukoht kromosoomil on näidatud joonisel 12. Neljast *S. stipitis*'e *MAL* klasterist asuvad kaks kromosoomide subtelomeerses piirkonnas ja kaks ei asu (Jeffries ja Van

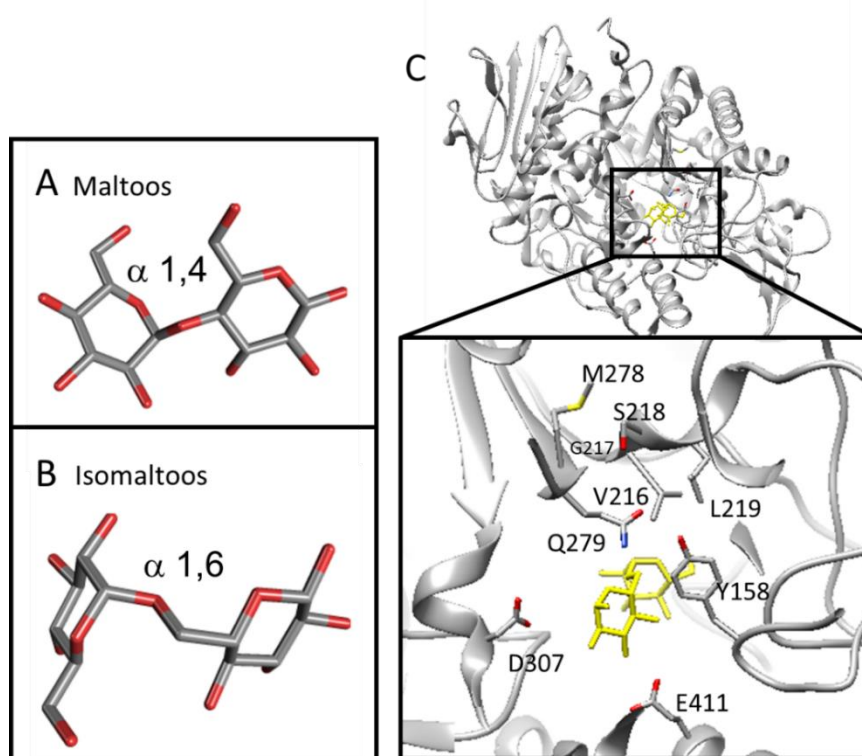
Vleet, 2009). Arvatakse, et subtelomeerne asukoht on võimaldanud pagaripärmi *MAL* klastril korduvalt duplitseeruda ja *MAL* valkudel divergeeruda erineva substraadivalikuga α -glükosidaasideks: maltaasideks ja isomaltaasideks (vt ptk 1.3.4) (Brown *et al.*, 2010).



Joonis 12. *S. stipitis*'e nelja *MAL* klastrite asukoht kromosoomidel. Kaks klastrit on subtelomeersed (tähistatud tumesinise noolega), kaks ei ole (tähistatud helesinise noolega) (Jeffries ja Van Vleet, 2009). Subtelomeerne osa (33 000 ap (Brown *et al.*, 2010)) on näidatud halli värviga. Kromosoomide skemaatiliseks kujutamiseks kasutati veebipõhist programmi PhenoGram (Wolfe *et al.*, 2013). *MAL* klastrite skeemid on koostanud Katrin Viigand (lisa 1).

Käesoleva töö üheks ülesandeks oli otsida seoseid *S. stipitis*'e α -glükosidaaside aminohappelise järjestuse ja substraadivaliku mustri vahel. Enne *S. stipitis*'e α -glükosidaaside substraadivaliku biokeemilist iseloomustamist ennustati seda valgujärjestuse põhjal. Pärmide maltaasidest ja isomaltaasidest on kristallstruktuur olemas ainult pagaripärmi isomaltaasil IMA1 (Yamamoto *et al.*, 2010, 2011). Metsiktüüpi IMA1 on kristalliseeritud koos mittetoimiva konkureeriva substraadiga – maltoosiga – ja katalüütiliselt inaktiivset IMA1 koos maltoosiga ja isomaltoosiga. Seetõttu on teada, millised aminohapped asuvad valgu ruumilises struktuuris substraadi seondumistasku ümber (Yamamoto *et al.*, 2010, 2011). IMA1 substraaditasku äärtes paikneb üheksa aminohapet, mis määravad, milline substraat sinna seonduda saab. Eriti oluline on α -glükosidaasi substraadivaliku kujunemisel positsioon, mis vastab *S. cerevisiae* IMA1 valgu positsioonile Val216. Maltoosi- ja isomaltoosi-tüüpi suhkrutel on erinev ruumiline kuju, seega steerilise takistuse tõttu ei hüdroolüüsi isomaltaas maltoosi ja maltaas isomaltoosi. Laia substraadivalikuga α -glükosidaaside seondumistaskusse sobituvad nii maltoosi- kui isomaltoosi-tüüpi suhkrud (Yamamoto *et al.*, 2004; Voordeckers *et al.*, 2012; Viigand *et al.*,

2016). Maltoosi ja isomaltoosi ruumiline struktuur ja IMA1 seondumistasku kuju mõjutavad aminohapped on näidatud joonisel 13.



Joonis 13. Maltoosi (paneel A) ja isomaltoosi (paneel B) α -glükosiidsideme tüübid ja sellest tingitud ruumilise struktuuri erinevus. Paneel C kujutab *S. cerevisiae* IMA1 struktuuri koos isomaltoosiga (kollane) substraadi seondumistaskus (Yamamoto *et al.*, 2010). Substraadi seondumistasku kuju mõjutavad aminohapped on tähistatud aminohappe nimetuse ja asukohanumbriga IMA1 valgujärjestuses. Paneelide A ja B koostamiseks kasutati PubChem andmebaasi jooniseid (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) ja paneeli C koostamiseks programmi Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

α -Glükosidaasi substraadi seondumistasku ümber asuva üheksa aminohappe, nn „tunnusaminohappe“ põhjal ennustati *S. stipitis*'e α -glükosidaaside substraadivalikut. Selleks joondati mõned GH13 perekonna α -glükosidaasid, mille substraadivalik on kirjeldatud, *S. stipitis*'e viie α -glükosidaasiga (vt ptk 2.2.1). Joendusest otsiti välja *S. cerevisiae* IMA1 seondumistaskusse ulatuvale üheksale aminohappele vastavad aminohapped ka teistes valkudes. Need on esitatud tabelis 3. *S. stipitis*'e tunnusaminohappeid võrreldi biokeemiliselt kirjeldatud substraadivalikuga α -glükosidaaside vastavate aminohapetega. Positsioonides 216, 217 ja 218 (nummerdatud *S. cerevisiae* IMA1 järgi) asuvate aminohapete võrdlus näitab, et *S. stipitis*'e α -glükosidaaside tunnusaminohapped erinevad oluliselt isomaltooside tunnusaminohapetest ning sarnanevad maltaasidele ja laia substraadivalikuga ensüümide omadele. Positsioonid 158, 219 ja 278 ei ole informatiivsed eristamiseks üksteisest maltaase ja laia substraadivalikuga ensüüme, selleks tuleb võrrelda aminohappeid positsioonides 279, 307

ja 411. Positsioonis 307 asuva aminohappe põhjal on MAL8 ja MAL9 sarnased maltaasidega, kuid positsioonides 279 ja 411 on kõikidel *S. stipitis*'e α -glükosidaasidel samad aminohapped, mis laia substraadivalikuga ensüümidel. Seega ennustati, et kõik *S. stipitis*'e α -glükosidaasid on laia substraadivalikuga ehk maltaas-isomaltaasid. Kõikide peatükis 1.1 kirjeldatud pärmide α -glükosidaaside tunnusaminohapped on esitatud ja nende funktsiooni ennustatud Viigand *et al.* (2018) artikli peatükis 3.5.

Tabel 3. Pärmide α -glükosidaaside tunnusaminohapped ja nende funktsioon või selle ennustus. Tõestatud funktsiooniga α -glükosidaaside substraadivalik on rasvases kirjas, ennustatud substraadivalik tavalises kirjas. Rohelise taustavärviga on tähistatud maltaas-isomaltaasid, kollasega maltaasid ja sinisega isomaltaasid. Helerohelise taustavärviga on tähistatud ennustatud maltaas-isomaltaasid. Rasvases kirjas on ka positsioonis 216 asuv aminohape, millel on suurim mõju α -glükosidaasi substraadivalikule (Yamamoto *et al.*, 2004; Viigand *et al.*, 2016).

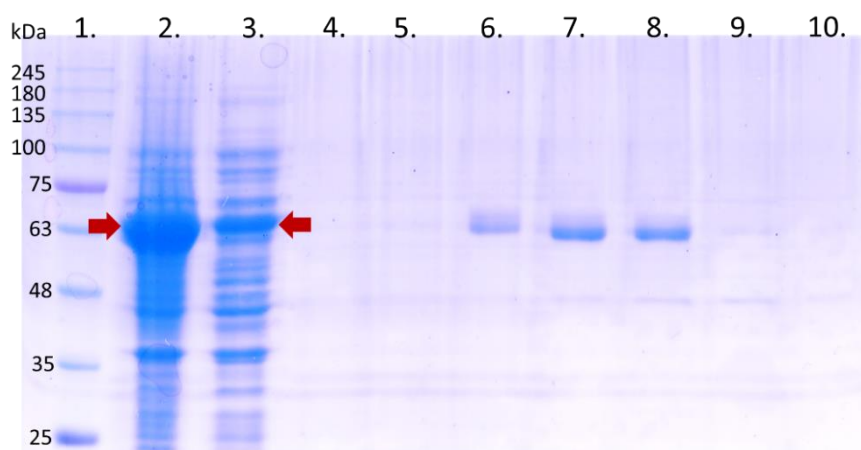
α -Glükosidaas	Tunnusaminohapped (nummerdatud <i>S. cerevisiae</i> IMA1 järgi)									Funktsioon/ennustus
	158	216	217	218	219	278	279	307	411	
<i>O. polymorpha</i> MAL1	F	T	A	G	L	V	G	D	N	Maltaas-isomaltaas
<i>L. elongisporus</i> AG1	H	T	A	G	M	V	G	D	N	Maltaas-isomaltaas
ancMALS	F	T	A	G	L	V	G	D	E	Maltaas-isomaltaas
<i>S. cerevisiae</i> MAL12, MAL32	F	T	A	G	L	V	A	E	D	Maltaas
<i>S. cerevisiae</i> IMA1, IMA2	Y	V	G	S	L	M	Q	D	E	Isomaltaas
<i>S. cerevisiae</i> IMA3/IMA4	Y	V	G	S	L	M	R	D	E	Isomaltaas
<i>S. cerevisiae</i> IMA5	F	V	G	S	M	V	G	S	E	Isomaltaas
<i>S. stipitis</i> MAL6	Y	T	A	G	L	V	G	N	N	Maltaas-isomaltaas
<i>S. stipitis</i> MAL7	F	T	A	G	L	V	G	T	N	Maltaas-isomaltaas
<i>S. stipitis</i> MAL8	Y	T	A	G	L	V	G	E	N	Maltaas-isomaltaas
<i>S. stipitis</i> MAL9	Y	T	A	G	M	V	G	E	N	Maltaas-isomaltaas
<i>S. stipitis</i> AGL1	Y	T	A	G	L	V	G	W	N	Maltaas-isomaltaas

2.3.6. *S. stipitis*'e α -glükosidaaside substraadivaliku kirjeldamine

Käesoleva töö ülesanne oli kirjeldada *S. stipitis*'e α -glükosidaaside substraadivalikut – kas need on maltaasid, isomaltaasid või laia substraadivalikuga maltaas-isomaltaasid. Selleks, et kirjeldada *S. stipitis*'e α -glükosidaaside substraadivalikut, kloonitati iga geen ekspressioonivektorisse ja ekspresseeriti heteroloogsest *E. coli*'s (ptk 2.2.4-2.2.5). Võrdluseks kloonitati ja puhastati ka *S. cerevisiae* maltaas MAL62. *S. stipitis*'e α -glükosidaaside substraadivalikut hinnati, kasutades ensüümpreparaadina bakteri rakulüsaati. Sama meetodit

on kasutatud *O. polymorpha* MAL1 substraadivaliku kirjeldamiseks (Liiv *et al.*, 2001). Oma bakalaureusetöös võrdlesin α -glükosidaaside substraadivaliku määramise tulemusi, mis saadi puhastatud valku ja valku üleekspresserinud rakkude lüsaati kasutades. Näitasin, et *E. coli* lüsaati võib kasutada α -glükosidaasi substraadivaliku usaldusväärseks iseloomustamiseks (Põšnograjeva, 2017).

S. cerevisiae maltaasi MAL62 üleekspresserinud bakterirakkude lüsaadis oli α -glükosidaasne aktiivsus kõrge, kuid *S. stipitis*'e valkudega lüsaadis palju madalam. Analüüsidest rakulüsaati ja lüsaadi valmistamisel allesjäänud sadet geelelektroforeesil selgus, et osa heteroloogset ekspresseeritud *S. stipitis*'e ensüümidest ei olnud lahustunud kujul lüsaadis, vaid sadenesid välja (vt joonis 14). See ei ole haruldane nähtus – valkude heteroloogsel ekspresseerimisel *E. coli*'s ei pruugi need õigesti voltuda, valgud akumuleeruvad inklusioonikehadesse ja on katalüütiliselt inaktiivsed. Näiteks *S. cerevisiae* α -glükosidaasi (α -glükosidaas PI, mis on 99.7% identne MAL32'ga) heteroloogsel üleekspresserimisel *E. coli*'s sadeneb osa valku inklusioonikehadesse. Ebakorrektselt voltuva α -glükosidaasi osakaal sõltub katsetingimustest – kasvutemperatuurist, rakkude kasvukiirusest, söötmest ja ekspressiooni induktori kontsentratsioonist (Kopetzki *et al.*, 1989; Le Thanh ja Hoffmann, 2005). Lisaks võib pärmi valk olla rakulüsaadis või puhastatud valguna lahuses ebastabiilne. Näiteks pagaripärmi isomaltaas IMA5 oli puhastatuna väga ebastabiilne ja temperatuuril 37°C säilis puhastamisest 3 minuti möödudes vaid pool ensüümi algsest aktiivsusest (Deng *et al.*, 2014).



Joonis 14. *S. stipitis*'e valgu AGL1 üleekspresserimise ja puhastamise analüüs geelelektroforeesil (vt ptk 2.2.5). Radadele 1.-10. kanti järgmised proovid: 1. valgu suurusmarker; 2. AGL1 üleekspresserinud *E. coli* purustatud rakud; 3. AGL1 üleekspresserinud *E. coli* rakkude purustamisel saadud lüsaat (supernatant). 4.-10. AGL1 valgu puhastamisel saadud fraktsioonid. Fraktsioonid radadel 6-8 sisaldavad puhast AGL1 valku. Punase noolega on näidatud valgule AGL1 vastav triip lüsaadis ja lahustumatute valkude hulgas.

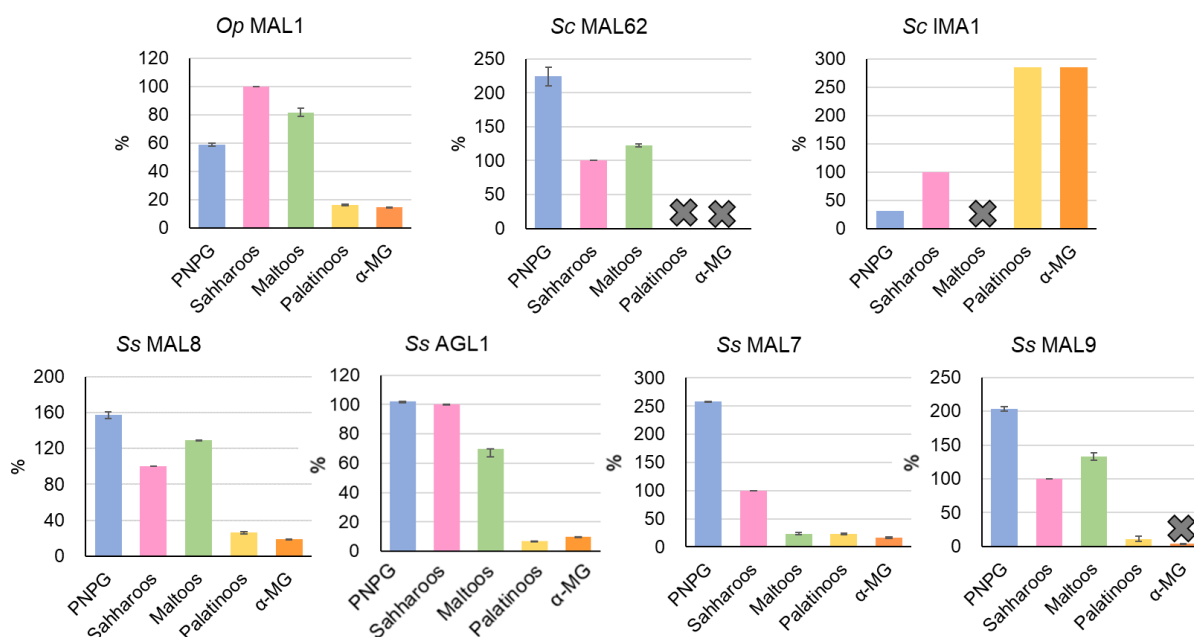
Samuti on näidatud, et eukarüootse valgu ekspresseerimine bakteris ja valgule His₆-järjestuse lisamine võib vähendada valgu üldist aktiivsust. Näiteks ekspresseerides inimese maksavalku arginaas I *E. coli*'s, on valgu eriaktiivsus ligikaudu 10 korda madalam võrreldes natiivse ensüümiga, mis on välja puhastatud inimese maksast. Ekspresseerides aga arginaas I *E. coli*'s koos N-terminaalse His₆-järjestusega, on valgu eriaktiivsus ligikaudu 140 korda madalam võrreldes inimese natiivse arginaas I'ga (Zakalskiy *et al.*, 2012).

Seega võib eukarüootse ensüümi heteroloogne ekspresseerimine bakteris põhjustada selle madalat aktiivsust ja valgu kogunemist inklusioonikehadesse. Siiski oli AGL1, MAL7, MAL8 ja MAL9 üleekspresseerinud rakkude lüsaadis piisavalt kõrge α -glükosidaasne aktiivsus, et mõõta ensüümide eriaktiivsust ja hinnata nende substraadivalikut. MAL6 ekspresseerinud rakkude lüsaadis ei olnud piisavalt kõrget α -glükosidaasest aktiivsust, et oleks võimalik teha usaldusväärseid järeldusi valgu omaduste kohta. Seega on MAL6 järgnevatest katsetest ja järelduste tegemisel välja jäetud.

α -Glükosidaaside eriaktiivsust mõõdeti viiel substraadi: PNPG'l, sahharoosil (*S. cerevisiae* maltaaside ja isomaltaaside substraadid), maltoosil (maltaaside substraat), palatinoosil ja α -MG'l (isomaltaaside substraadid)(vt joonis 3). PNPG kontsentratsioon reaktsioonisegus oli 1 mM, kõikidel ülejäänud suhkrutel 100 mM. Kuigi *E. coli*'l puudub α -glükosidaas (Boos ja Shuman, 1998), viidi kõik reaktsioonid paralleelselt läbi ka *E. coli* lüsaadiga, mis oli transformeeritud tühja ekspresiooniplasmiidiga (vt ptk 2.2.6), et kinnitada taustaktiivsuse puudumist. *S. cerevisiae* MAL62 ja *S. stipitis*'e AGL1 puhastati rakulüsaadist Ni²⁺-afiinsuskromatograafiaga (vt ptk 2.2.5) ning nende α -glükosidaaside puhul kasutati reaktsioonisegudes ensüümpreparaadina puhast valku. Tulemuseks saadud valkude eriaktiivsused on kujutatud joonisel 15.

Joonise 15 ülemises reas on näidatud varasemalt biokeemiliselt kirjeldatud substraadivalikuga α -glükosidaaside substraadivalikut kirjeldavad graafikud, võrdluseks *S. stipitis*'e ensüümide substraadivaliku mustriaga. Kõik joonisel 15 esitatud ensüümid hüdrolüüsivad PNPG'd ja sahharoosi. Graafik *O. polymorpha* laia substraadivalikuga maltaas-isomaltaasi MAL1 kohta on koostatud avaldatud andmeid kasutades (Viigand *et al.*, 2016). *S. cerevisiae* MAL62 kohta esitatud andmed on saadud puhastatud valku kasutades. Joonis näitab, et MAL62 hüdrolüüsib maltoosi, kuid isomaltoosi-tüüpi suhkruid mitte. Need andmed MAL62 substraadivaliku kohta ühtivad publitseeritud andmetega (Needleman *et al.*, 1978; Krakenaite ja Glemzha, 1983). Graafik *S. cerevisiae* isomaltaasi IMA1 kohta on koostatud Deng *et al.* (2014) artikli tabelis 2

esitatud andmete alusel. On näha, et IMA1 ei hüdrolüüsi maltoosi, küll aga kahte isomaltoosi-tüüpi substraati.



Joonis 15. *S. stipitis*'e α -glükosidaaside MAL8, AGL1, MAL7 ja MAL9 substraadivalik võrrelduna *S. cerevisiae* isomaltaasiga IMA1 (Deng *et al.*, 2014) ja maltaasiga MAL62 ning *O. polymorpha* maltaas-isomaltaasiga MAL1 (Viigand *et al.*, 2016). Eriaktiivsused ($\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$) on esitatud protsendina, kus 100%'ga on võrdsustatud sahharoosi hüdrolüüsi eriaktiivsus. MAL62 ja AGL1 puhul on tulemused saadud puhastatud valku kasutades, MAL7, MAL8 ja MAL9 puhul on näidatud *E. coli* lüsaadiga tehtud katsete tulemused. Vearibad näitavad standardhälvet. IMA1 tulemuste standardhälbed on esitatud Deng *et al.* (2014) artiklis. Kui ensüüm substraati ei hüdrolüüsi või eriaktiivsus on mõõtevea piires, on see joonisel tähistatud ristiga.

Joonise 15 alumisel paneelil on esitatud *S. stipitis*'e nelja α -glükosidaasi substraadivalikut iseloomustavad graafikud. Kõik need neli valku hüdrolüüsivad maltoosi. Kolm valku neljast – MAL8, AGL1, MAL7 – hüdrolüüsivad mõlemat testitud isomaltoosi-tüüpi suhkrut. MAL9 hüdrolüüsib palatinoosi, kuid mitte α -MG'd (eriaktiivsus on mõõtevea piires). MAL8 ja AGL1 on substraadivaliku poolest väga sarnased *O. polymorpha* MAL1'ga – need ensüümid hüdrolüüsivad isomaltoosi-tüüpi suhkruid, kuid maltoosi hüdrolüüsi efektiivsus võrreldes isomaltoosi-tüüpi substraatide hüdrolüüsi efektiivsusega on oluliselt kõrgem. MAL7 hüdrolüüsib aga isomaltoosi-tüüpi substraate ligikaudu sama efektiivselt kui maltoosi.

Kuna kõik neli *S. stipitis*'e testitud ensüümi hüdrolüüsivad vähemalt ühte maltoosi- ja ühte isomaltoosi-tüüpi substraati, võib need kõik liigitada laia substraadivalikuga α -glükosidaaside hulka. Järelikult pidas tunnusaminohapete võrdluse põhjal tehtud valkude funktsiooni ennustus paika (vt pkt 2.3.5). Samuti seletab kõikide *S. stipitis*'e α -glükosidaaside lai

substraadivalik, miks erinevate α -glüosiidide hüdrolüüsi võime oli erinevatel suhkrutel kasvanud pärmirakkude lüsaadis väga sarnane (vt ptk 2.3.4).

Voordeckers *et al.* (2012) näitasid, et α -glükosidaase kodeerivate geenide arvu ja nende substraadivaliku vahel kehtib seaduspära. Kui pärmil on üks funktsionaalset α -glükosidaasi kodeeriv geen, siis on sellele vastav ensüüm laia substraadivalikuga (näiteks *L. elongisporus*, *K. lactis* (Voordeckers *et al.*, 2012) ja *O. polymorpha* (Viigand *et al.*, 2016)). Kui pärmis on mitu α -glükosidaasi kodeerivat geeni, siis ensüümid on spetsialiseerunud kas maltoosi- või isomaltoosi-tüüpi substraatide lagundamisele (näiteks *S. cerevisiae*, *L. thermotolerans*) (Voordeckers *et al.*, 2012). *S. stipitis*'e puhul see seaduspära ei kehti – viiest α -glükosidaasist on vähemalt neli laia substraadivalikuga. Samas võivad *S. stipitis*'e α -glükosidaasid olla kitsama substraadivalikuga ensüümideks spetsialiseerumise vaheetapis. Näiteks ensüümil MAL7 on madal maltoosi hüdrolüüsi võime, mistõttu see on sarnasem *S. cerevisiae* isomaltaasidele ja MAL9 hüdrolüüsib kehvasti isomaltoosi-tüüpi substraate ja seega on sarnasem *S. cerevisiae* maltaasidele. *S. stipitis*'e α -glükosidaaside substraadivalikut arvesse võttes on tõenäoline, et nende eellaseks oli laia substraadivalikuga α -glükosidaas, nagu Voordeckers *et al.* (2012) hüpoteesi põhjal ka *S. cerevisiae* α -glükosidaasidel.

2.3.7. Alternatiivne koodonikasutus ja *S. stipitis*'e α -glükosidaasid

Nagu mainiti peatükis 1.1.13, on pärmil *S. stipitis* alternatiivne koodonikasutus, seega koodonit CUG transleeritakse *S. stipitis*'e rakkudes seriinina, *E. coli* rakkudes aga leutsiinina (Riley *et al.*, 2016). Sellega arvestati enne kloneerimise alustamist ning kontrolliti, kas α -glükosidaase kodeerivad geenid sisaldavad CTG koodoneid (mRNA CUG koodonile vastav DNA koodon). Geenid *AGL1* ja *MAL8* ei sisalda ühtegi CTG koodonit, *MAL7* sisaldab ühte ning *MAL6* ja *MAL9* kahte CTG koodonit.

Järgnevalt uuriti, kas CTG koodoni kodeeritud aminohape asub *S. stipitis*'e α -glükosidaasi konserveerunud osas. Selleks joondati *S. stipitis*'e valgud teiste α -glükosidaasidega (nende nimetused ja Geenipanga tunnusnumbrid on esitatud lisa 3 tabelis 5) ja vaadati, kas antud positsioonis asuv aminohape on pärmide α -glükosidaasidel konserveerunud. Konserveerunuks loeti positsioon, milles on sama aminohape vähemalt 50% analüüsi kaasatud pärmide α -glükosidaasidest. Ükski CTG koodonile vastavatest aminohapetest ei olnud konserveerunud valgu primaarse järjestuse tasandil.

Samuti ennustati, kuhu võivad asetuda CTG koodoni kodeeritud aminohapped α -glükosidaasi ruumilises struktuuris, kasutades selleks *S. cerevisiae* IMA1 struktuuri (Yamamoto *et al.*, 2010). Kuna CTG koodoni kodeeritud aminohapped ei asu α -glükosidaasi substraadi seondumistaskus või selle läheduses, siis on äärmiselt ebatõenäoline, et need aminohapped võivad mõjutada α -glükosidaasi substraadivalikut. Ei saa aga välistada, et CTG koodoni kodeeritud aminohappe muutus mõjutab valgusid aktiivsust. AGL1, MAL7, MAL8 ja MAL9 aktiivsus rakulüsaadist mõõdetuna oli samas suurusjärgus, vaatamata erinevale CTG koodoni arvule nendes geenides, kuid MAL6 madal aktiivsus võib olla põhjustatud CTG koodoni valest transleerimisest bakterirakus. CTG koodonite asukoht *S. stipitis*'e MAL geenides, väljavõtte α -glükosidaaside joondusest ja CTG koodonitele vastavate aminohapete asukoht α -glükosidaasi ruumilisel valgustruktuuril on esitatud lisa 5.

2.3.8. Katsed *S. stipitis*'e α -glükosidaaside lahustuvuse parandamiseks

S. stipitis'e α -glükosidaaside heteroloogsel ekspresseerimisel *E. coli*'s sadeneb suur osa valgust inkluusioonikehadesse (vt joonis 14), seega peab edasisel *S. stipitis*'e valkude uurimisel otsima uut lähenemist nende ekspresseerimiseks. Madalam temperatuur valkude ekspresseerimisel ja madalam induktori kontsentratsioon on tõstnud õigesti voltuvate valkude osakaalu pagaripärmi α -glükosidaasi heteroloogsel ekspresseerimisel *E. coli*'s (Kopetzki *et al.*, 1989). Seega ekspresseeriti ka *S. stipitis*'e α -glükosidaase madalamal temperatuuril (22°C asemel 18°C) või madalama ekspressiooni induktori (IPTG) juuresolekul (0.5 mM asemel 0.25 või 0.05 mM). Õigesti voltunud funktsionaalse ensüümi hulka hinnati α -glükosidaase aktiivsuse järgi rakulüsaadis (vt ptk 2.2.6) ning analüüsid rakulüsaati ja selle valmistamisel tekkinud sadet geelelektroforeesiga (vt ptk 2.2.5). Kummalgi juhul ei olnud funktsionaalse ensüümi hulk lüsaadis kasvanud.

S. stipitis'e α -glükosidaaside korrektse voltumise parandamiseks võib veel proovida järgnevat lähenemisi: (i) ekspresseerida valkusiid nõrgema promootori tagant, (ii) ekspresseerida valkusiid madala koopiarvuga plasmiidilt (Schumann ja Ferreira, 2004), (iii) lisada valkudele õiget voltumist ja lahustuvust tõstev järjestus, näiteks SUMO (väike ubikvitiinisarnane modifitseerija) (Butt *et al.*, 2005), (iv) ekspresseerida *S. stipitis*'e α -glükosidaase teises pärmis, näiteks *O. polymorpha* tüves, millel on deleteeritud natiivset α -glükosidaasi kodeeriv MAL1 geen (Viigand *et al.*, 2016).

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli kirjeldada α -glükosiidsete suhkrute metabolismi, selle eest vastutavaid MAL geeniklastreid ja α -glükosidaase mitte-konventsionaalsetel pärmidel, põhirõhuga pärmil *Scheffersomyces stipitis*.

Töö raames analüüsiti 24 MAL klastrit 13 pärmiliigist, pöörates tähelepanu klastrite arvule ja ehitusele erinevate pärmide genoomides. Tulemused näitasid, et α -glükosidaasi ja α -glükosiidi transporterit kodeerivate geenide divergentne paigutus MAL klastris on konserveerunud. Järelikult on nende geenide täpne koregulatsioon tähtis ning see võib olla põhjuseks, miks MAL klastrid on tekkinud ja püsima jäänud. Käesolevas magistritöös kirjeldati esmakordselt MAL klastreid pärmidel *P. xylosa*, *Y. tenuis* ja *S. passalidarum*. Uuriti ka MAL klastrites kodeeritud valkude fülogeneesi. Saadud andmetest lähtub, et kahest divergentselt paiknevast geenist koosnev MAL klaster võis tekkida juba Saccharomycotina eellase genoomis, misjärel MAL klaster evolutsioneerus erinevates pärmiliinides, duplitseerudes mõne pärmiliigi genoomis korduvalt.

Töö põhirõhk oli pagaripärmist fülogeneetiliselt üpris kaugel pärmi *S. stipitis*'e α -glükosiidsete suhkrute metabolismil. Näidati, et lisaks sahharoosile, maltoosile, trehaloosile ja α -metüülglükosiidile võib *S. stipitis* kasvada ka turanoosil, maltuloosil, maltotriiosil, isomaltoosil ja palatinoosil. Samuti kirjeldati, kuidas sõltub *S. stipitis*'e α -glükosiidsete suhkrute lagundamise võime kasvusubstraadist. Glükoosil ja ksüloosil kasvades surutakse *S. stipitis*'el α -glükosidaaside ekspressioon alla, järelikult eelistab see pärm substraadina α -glükosiididele monosahhariide glükoosi ja ksüloosi. α -Glükosiidsetel disahhariididel maltoosil, sahharoosil ja palatinoosil kasvanud pärmirakkudes α -glükosidaasne aktiivsus indutseeritakse, kõige tugevam on induktsioon sahharoosil kasvanud rakkudes.

Iseloomustati *S. stipitis*'e nelja α -glükosidaasi substraadivalikut eesmärgiga teada saada, kas need on sarnased *S. cerevisiae* maltaasidele, isomaltaasidele, või on hoopis laia substraadivalikuga α -glükosidaasid. Kuna kõik neli *S. stipitis*'e testitud ensüümi hüdrolüüsivad vähemalt ühte maltoosi- ja ühte isomaltoosi-tüüpi substraati, võib need kõik liigitada laia substraadivalikuga α -glükosidaaside hulka. See tulemus ühtib ensüümide primaarse järjestuse põhjal tehtud substraadivaliku ennustusega. *S. stipitis*'e α -glükosidaaside eellasvalguks oli tõenäoliselt üks laia substraadivalikuga ensüüm, mis korduvalt duplitseerus ja koopiad on hakanud divergeeruma – näiteks MAL9 sarnaneb substraadivaliku poolest rohkem pagaripärmi maltaasidele ja MAL7 isomaltaasidele.

MAL* clusters and proteins of yeasts with emphasis on α -glucosidases of *Scheffersomyces stipitis

Kristina Põšnograjeva

Summary

Sugars are the preferred energy source for yeasts. Thus, yeasts thrive in habitats with access to α -glucosidic sugars, for example maltose and isomaltose, which are released as products of starch degradation. In *S. cerevisiae*, α -glucosidic sugars are hydrolysed by two specialized α -glucosidases — maltases and isomaltases. The ancestor of these α -glucosidases was most probably an enzyme that could hydrolyse the substrates of both modern maltases and isomaltases (Voordeckers *et al.*, 2012). Surprisingly, it was shown that substrate specificity of α -glucosidase of a non-conventional yeast *O. polymorpha* is very similar to this hypothetical ancestral α -glucosidase (Viigand *et al.*, 2016). According to the literature, the genes that are required for utilization of α -glucosidic sugars form metabolic gene clusters (*MAL* clusters) in *S. cerevisiae* and *O. polymorpha*, even though gene clustering is quite unusual in eukaryotes. The α -glucoside metabolism has been thoroughly studied in *S. cerevisiae*, but not in non-conventional yeasts. Therefore, it is impossible to make reliable conclusions about the evolution of *MAL* clusters and substrate specificity of yeast α -glucosidases.

In this thesis, *MAL* clusters of non-conventional yeasts were addressed. The structures of 24 *MAL* clusters from 13 yeasts were analysed and the phylogenetic relationships of the proteins encoded by these clusters were studied. Novel *MAL* clusters were detected in *P. xylosa*, *Y. tenuis* and *S. passalidarum*. It was concluded that the divergent position of genes coding for α -glucosidase and α -glucoside transporter was conserved in most clusters. The strict coregulation it provides is possibly the main reason for the existence of *MAL* clusters. The *MAL* cluster consisting of two genes may have already formed in the common ancestor of Saccharomycotina.

MAL clusters of *S. stipitis* and putative α -glucosidases encoded by the clusters were studied in more detail. *S. stipitis* is phylogenetically quite distant from the well-studied model yeast *S. cerevisiae*. This study showed that in addition to some previously assayed α -glucosidic sugars (sucrose, maltose, trehalose and α -MG), *S. stipitis* can also assimilate turanose, maltulose, maltotriose, isomaltose and palatinose. Furthermore, the effect of growth substrate on the

expression of α -glucosidases was studied. When grown on monosaccharides glucose or xylose, the expression of α -glucosidases was repressed. When grown on α -glucosidic sugars maltose, isomaltose and sucrose, the expression of α -glucosidases was induced. Sucrose was the most potent inducer of α -glucosidic activity.

The substrate specificity of four α -glucosidases (AGL1, MAL7, MAL8 and MAL9) of *S. stipitis* was assayed. All these enzymes could hydrolyse at least one substrate of *S. cerevisiae* maltases and one substrate of *S. cerevisiae* isomaltases. Therefore, AGL1, MAL7, MAL8 and MAL9 are α -glucosidases with a broad substrate specificity and hence similar to the hypothetical ancestral protein of *S. cerevisiae* α -glucosidases. The substrate specificity of the assayed enzymes was in agreement with a prediction based on the primary sequence of these proteins. Modern α -glucosidases of *S. stipitis* could have evolved from an ancestral α -glucosidase with a broad substrate specificity through the reoccurring duplication of *MAL* gene cluster and the following evolution of the duplicates. Although all four α -glucosidases of *S. stipitis* have a broad substrate specificity, it varies to some extent. For example, the substrate specificity of MAL9 is more similar to *S. cerevisiae* maltases, whereas the substrate specificity of MAL7 is more similar to *S. cerevisiae* isomaltases.

Kasutatud kirjandus

Abbas, C. A., and Sibirny, A. A. (2011). Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 321–360.

Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., and Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 1219–1227.

Alamäe, T., and Liiv, L. (1998). Glucose repression of maltase and methanol-oxidizing enzymes in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: isolation and study of regulatory mutants. *Folia Microbiol* 43: 443–452.

Al-Obaid, K., Ahmad, S., Joseph, L., and Khan, Z. (2018). *Lodderomyces elongisporus*: a bloodstream pathogen of greater clinical significance. *New Microbes New Infect* 26: 20–24.

Alves-Araújo, C., Hernandez-Lopez, M. J., Sousa, M. J., Prieto, J. A., and Randez-Gil, F. (2004). Cloning and characterization of the *MAL11* gene encoding a high-affinity maltose transporter from *Torulaspora delbrueckii*. *FEMS Yeast Res* 4, 467–476.

Andriotis, V. M. E., Saalbach, G., Waugh, R., Field, R. A., and Smith, A. M. (2016). The maltase involved in starch metabolism in barley endosperm is encoded by a single gene. *PLOS ONE* 11, e0151642.

Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., and Guebitz, G. M. (2008). Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour Technol* 99: 3051–3056.

Arastehfar, A., Fang, W., Al-Hatmi, A. M. S., ... Boekhout, T. (2019). Unequivocal identification of an underestimated opportunistic yeast species, *Cyberlindnera fabianii*, and its close relatives using a dual-function PCR and literature review of published cases. *Med Mycol*. 10.1093/mmy/myy148

Ávila, J., González, C., Brito, N., Machín, M. F., Pérez, D., and Siverio, J. M. (2002). A second Zn(II)2Cys6 transcriptional factor encoded by the *YNA2* gene is indispensable for the transcriptional activation of the genes involved in nitrate assimilation in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 19: 537–544.

Ball, S., Colleoni, C., Cenci, U., Raj, J. N., and Tirtiaux, C. (2011). The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *J Exp Bot* 62: 1775–1801.

Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P. (1982). Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* 300: 706–709.

Bell, P. J. L., Bissinger, P. H., Evans, R. J., and Dawes, I. W. (1995). A two-reporter gene system for the analysis of bi-directional transcription from the divergent *MAL6T-MAL6S* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 28: 441–446.

Benito, S. (2018). The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Appl Microbiol Biotechnol* 102: 3081–3094.

Böer, E., Schröter, A., Bode, R., Piontek, M., and Kunze, G. (2009). Characterization and expression analysis of a gene cluster for nitrate assimilation from the yeast *Arxula adenivorans*. *Yeast* 26: 83–93.

Boos, W., and Shuman, H. (1998). Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 204–229.

- Brandenburg, J., Blomqvist, J., Pickova, J., Bonturi, N., Sandgren, M., and Passoth, V. (2016). Lipid production from hemicellulose with *Lipomyces starkeyi* in a pH regulated fed-batch cultivation. *Yeast* 33: 451–462.
- Brayton, K. A., Chen, Z., Zhou, G., Nagy, P. L., Gavalas, A., Trent, J. M., Deaven, L. L., Dixon, J. E., and Zalkin, H. (1994). Two genes for *de novo* purine nucleotide synthesis on human chromosome 4 are closely linked and divergently transcribed. *J Biol Chem* 269: 5313–5321.
- van Breda, V., Jolly, N., and van Wyk, J. (2013). Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains. *Int J Food Microbiol* 163: 80–88.
- Breuer, U., and Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23: 415–437.
- Brown, C. A., Murray, A. W., and Verstrepen, K. J. (2010). Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeasts. *Curr Biol CB* 20: 895–903.
- Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., ... Cuomo, C. A. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459: 657–662.
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P., and Mattern, M. R. (2005). SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif* 43: 1–9.
- Chang, Y. S., Dubin, R. A., Perkins, E., Forrest, D., Michels, C. A., and Needleman, R. B. (1988). *MAL63* codes for a positive regulator of maltose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 14: 201–209.
- Charron, M. J., Read, E., Haut, S. R., and Michels, C. A. (1989). Molecular evolution of the telomere-associated *MAL* loci of *Saccharomyces*. *Genetics* 122: 307–316.
- Cheng, Q., and Michels, C. A. (1989). The maltose permease encoded by the *MAL61* gene of *Saccharomyces cerevisiae* exhibits both sequence and structural homology to other sugar transporters. *Genetics* 123: 477–484.
- Cheng, Q., and Michels, C. A. (1991). *MAL11* and *MAL61* encode the inducible high-affinity maltose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 173: 1817–1820.
- Chi, Z., Ni, X., and Yao, S. (2008). Cloning and overexpression of a maltase gene from *Schizosaccharomyces pombe* in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant maltase. *Mycol Res* 112: 983–989.
- Cohn, M., Liti, G., and Barton, D. B. 2006. Telomeres in fungi, p. 101-130. *In* P. Sunnerhagen, and J. Piškur (ed.), *Comparative Genomics. Topics in Current Genetics*, vol.15. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Curiel, J. A., de las Rivas, B., Mancheño, J. M., and Muñoz, R. (2011). The pURI family of expression vectors: A versatile set of ligation independent cloning plasmids for producing recombinant His-fusion proteins. *Protein Expr Purif* 76: 44–53.
- Davis, T. (2014). The ecology of yeasts in the bark beetle holobiont: A century of research revisited. *Microb Ecol* 69: 723-32
- Day, R. E., Rogers, P. J., Dawes, I. W., and Higgins, V. J. (2002). Molecular analysis of maltotriose transport and utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 68: 5326–5335.

- Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M., and Orcutt, B. C. 1978. A model of Evolutionary Change in Proteins, p. 345-352. In M. O. Dayhoff (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, vol.5., National Biomedical Research Foundation, Washington, DC.
- Deng, X., Petitjean, M., Teste, M.-A., Kooli, W., Tranier, S., François, J. M., and Parrou, J.-L. (2014). Similarities and differences in the biochemical and enzymological properties of the four isomaltases from *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Open Bio 4: 200–212.
- Dobson, L., Reményi, I., and Tusnády, G. E. (2015). CCTOP: a Consensus Constrained TOPology prediction web server. Nucleic Acids Res 43: W408–W412.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., ... Souciet, J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. Nature 430: 35–44.
- Dujon, B. (2006). Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. Trends Genet 22: 375–387.
- Dujon, B. A., and Louis, E. J. (2017). Genome diversity and evolution in the budding yeasts (Saccharomycotina). Genetics 206: 717–750.
- Ernits, K., Viigand, K., Visnapuu, T., Põšnograjeva, K., and Alamäe, T. (2017). Thermostability measurement of an α -glucosidase using a classical activity-based assay and a novel Thermofluor method. Bio-protocol 7, 10.21769/BioProtoc.2349.
- Fairhead, C., and Dujon, B. (2006). Structure of *Kluyveromyces lactis* subtelomeres: duplications and gene content. FEMS Yeast Res 6: 428–441.
- Ferris, S. P., Kodali, V. K., and Kaufman, R. J. (2014). Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. Dis Model Mech 7: 331–341.
- Freel, K. C., Sarilar, V., Neuvéglise, C., Devillers, H., Friedrich, A., and Schacherer, J. (2014). Genome sequence of the yeast *Cyberlindnera fabianii* (*Hansenula fabianii*). Genome Announc 2, e00638-14.
- Gabriško, M. (2013). Evolutionary history of eukaryotic α -glucosidases from the α -amylase family. J Mol Evol 76: 129–145.
- Gabriško, M., and Janeček, Š. (2011). Characterization of maltase clusters in the genus *Drosophila*. J Mol Evol 72: 104–118.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res 31: 3784–3788.
- Geber, A., Williamson, P. R., Rex, J. H., Sweeney, E. C., and Bennett, J. E. (1992). Cloning and characterization of a *Candida albicans* maltase gene involved in sucrose utilization. 174: 6992–6996.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey H., ... Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. Science 274: 546–567.
- Gomes, F., Pataro, C., Guerra, J., Neves, M., Corrêa, S., Moreira, E., and Rosa, C. (2002). Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentation during the production of Brazilian cachaça. Can J Microbiol 48: 399–406.
- Gordon, J. L., Armisén, D., Proux-Wéra, E., ÓhÉigeartaigh, S. S., Byrne, K. P., and Wolfe, K. H. (2011). Evolutionary erosion of yeast sex chromosomes by mating-type switching accidents. Proc Natl Acad Sci 108: 20024–20029.

- Hall, C., and Dietrich, F. S. (2007). The reacquisition of biotin prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae* involved horizontal gene transfer, gene duplication and gene clustering. *Genetics* 177: 2293–2307.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Han, E.-K., Cotty, F., Sottas, C., Jiang, H., and Michels, C. A. (1995). Characterization of *AGT1* encoding a general α -glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol Microbiol* 17: 1093–1107.
- Hebert, D. N., Foellmer, B., and Helenius, A. (1995). Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* 81: 425–433.
- Henrissat, B., and Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* 7: 637–644.
- Hers, H. G. (1963). α -Glucosidase deficiency in generalized glycogen-storage disease (Pompe's disease). *Biochem J* 86: 11-16.
- Hoffman, C. S., Wood, V., and Fantes, P. A. (2015). An ancient yeast for young geneticists: a primer on the *Schizosaccharomyces pombe* model system. *Genetics* 201: 403–423.
- Hollatz, C., and Stambuk, B. U. (2001). Colorimetric determination of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Methods* 46: 253–259.
- James, S. A., Collins, M. D., and Roberts, I. N. (1994). The genetic relationship of *Lodderomyces elongisporus* to other ascomycete yeast species as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *Lett Appl Microbiol* 19: 308–311.
- Janeček, Š. (2009). Amylolytic enzymes – focus on the alpha-amylases from archaea and plants. *Nova Biotechnol* 9, 5-25.
- Janeček, Š., Svensson, B., and MacGregor, E. A. (2007). A remote but significant sequence homology between glycoside hydrolase clan GH-H and family GH31. *FEBS Lett* 581: 1261–1268.
- Jansen, M. L. A., Krook, D. J. J., De Graaf, K., Van Dijken, J. P., Pronk, J. T., and De Winde, J. H. (2006). Physiological characterization and fed-batch production of an extracellular maltase of *Schizosaccharomyces pombe* CBS 356. *FEMS Yeast Res* 6: 888–901.
- Jeffries, T. W., Grigoriev, I. V., Grimwood, J., ... Richardson, P. M. (2007). Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat Biotechnol* 25: 319–326.
- Jeffries, T. W., and Van Vleet, J. R. H. (2009). *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *Fems Yeast Res* 9: 793–807.
- Kelly, C. T., Moriarty, M. E., and Fogarty, W. M. (1985). Thermostable extracellular α -amylase and α -glucosidase of *Lipomyces starkeyi*. *Appl Microbiol Biotechnol* 22: 352–358.
- Kim, J., and Michels, C. A. (1988). The *MAL63* gene of *Saccharomyces* encodes a cysteine-zinc finger protein. *Curr Genet* 14: 319–323.
- Kopetzki, E., Schumacher, G., and Buckel, P. (1989). Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast α -glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions. *Mol Gen Genet MGG* 216: 149–155.

- Krakenaite, R. P., and Glemzha, A. A. (1983). Some properties of two forms of α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae*-II. *Biochemistry* 48: 62–68.
- Krassowski, T., Coughlan, A. Y., Shen, X.-X., ... Wolfe, K. H. (2018). Evolutionary instability of CUG-Leu in the genetic code of budding yeasts. *Nat Commun* 9, 10.1038/s41467-018-04374-7.
- Kumar, S., Randhawa, A., Ganesan, K., Raghava, G. P. S., and Mondal, A. K. (2012). Draft genome sequence of salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* MTCC 234. *Eukaryot Cell* 11: 961–962.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35: 1547–1549.
- Kunze, G., Gaillardin, C., Czernicka, M. ... Neuvéglise, C. (2014). The complete genome of *Blastobotrys (Arxula) adenivorans* LS3 - a yeast of biotechnological interest. *Biotechnol Biofuels* 7, 10.1186/1754-6834-7-66.
- Kunze, G., Kang, H. A., and Gellissen, G. 2009. *Hansenula polymorpha (Pichia angusta)*: Biology and Applications, p. 47-64. *In* T. Satyanarayana, and G. Kunze (ed.), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer, Dordrecht.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., and Boekhout, T. 2011. Definition, classification and nomenclature of the yeasts, p. 3-5. *In* C. P. Kurtzman, J. W. Fell, and T. Boekhout (ed.), *The Yeasts*, 5th ed. Elsevier, London.
- Kurtzman, C. P., Mateo, R. Q., Kolecka, A., Theelen, B., Robert, V., and Boekhout, T. (2015). Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. *FEMS Yeast Res* 15, 10.1093/femsyr/fov050.
- Kurtzman, C. P., and Piškur, J. (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts, p. 29-46. *In* P. Sunnerhagen, and J. Piškur (ed.), *Comparative Genomics. Topics in Current Genetics*, vol.15. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., ... Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- Le Thanh, H., and Hoffmann, F. (2005). Optimized production of active alpha-glucosidase by recombinant *Escherichia coli*. Evaluation of processes using in vivo reactivation from inclusion bodies. *Biotechnol Prog* 21: 1053–1061.
- Lee, M. G., and Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 327: 31–35.
- Leifso, K. R., Williams, D., and Hintz, W. E. (2007). Heterologous expression of cyan and yellow fluorescent proteins from the *Kluyveromyces lactis* KIMAL21–KIMAL22 bi-directional promoter. *Biotechnol Lett* 29: 1233–1241.
- Liiv, L., Pärn, P., and Alamäe, T. (2001). Cloning of maltase gene from a methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. *Gene* 265: 77–85.
- Limtong, S., Kaewwichian, R., Yongmanitchai, W., and Kawasaki, H. (2014). Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World J Microbiol Biotechnol* 30: 1785–1796.
- Limtong, S., Srisuk, N., Yongmanitchai, W., Yurimoto, H., and Nakase, T. (2008). *Ogataea chonburiensis* sp. nov. and *Ogataea nakhonphanomensis* sp. nov., thermotolerant, methylotrophic yeast species

- isolated in Thailand, and transfer of *Pichia siamensis* and *Pichia thermomethanolica* to the genus *Ogataea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 302–307.
- Lockhart, S. R., Messer, S. A., Pfaller, M. A., and Diekema, D. J. (2008). *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. *J Clin Microbiol* 46: 374–376.
- Lodder, J., and Kreger-van Rij, N. J. W. 2010. *Lipomyces*, p. 545-560. *In* C. P. Kurtzman, J. W. Fell and T. Boekhout (ed.), *The Yeasts: a taxonomic study*, 5th ed., vol.1. Elsevier, London.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42: D490–D495.
- Lovering, A. L., Lee, S. S., Kim, Y.-W., Withers, S. G., and Strynadka, N. C. J. (2005). Mechanistic and structural analysis of a family 31 α -glycosidase and its glycosyl-enzyme intermediate. *J Biol Chem* 280: 2105–2115.
- MacGregor, E. A., Janeček, Š., and Svensson, B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol* 1546: 1–20.
- Malak, A., Baronian, K., and Kunze, G. (2016). *Blastobotrys (Arxula) adenivorans*: a promising alternative yeast for biotechnology and basic research. *Yeast* 33: 535–547.
- Mangas-Sánchez, J., and Adlercreutz, P. (2015). Enzymatic preparation of oligosaccharides by transglycosylation: A comparative study of glucosidases. *J Mol Catal B Enzym* 122: 51–55.
- Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W., and Kakudo, M. (1984). Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J Biochem (Tokyo)* 95: 697–702.
- Meurer, M., Chevyreva, V., Cerulus, B., and Knop, M. (2017). The regulatable *MAL32* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*: characteristics and tools to facilitate its use. *Yeast Chichester Engl* 34: 39–49.
- Middelhoven, W. J., Hoogkamer-Te Niet, M. C., and Kreger-Van Rij, N. J. W. (1984). *Trichosporon adenivorans* sp. nov., a yeast species utilizing adenine, xanthine, uric acid, putrescine and primary n-alkylamines as the sole source of carbon, nitrogen and energy. *Antonie Van Leeuwenhoek* 50: 369–378.
- Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., and Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem Biophys Rep* 10: 52–61.
- Morais, P. B., Teixeira, L. C., Bowles, J. M., Lachance, M.-A., and Rosa, C. A. (2004). *Ogataea falcaomoraisii* sp. nov., a sporogenous methylotrophic yeast from tree exudates. *FEMS Yeast Res* 5: 81–85.
- Morel, G., Sterck, L., Swennen, D., ... Casaregola, S. (2015). Differential gene retention as an evolutionary mechanism to generate biodiversity and adaptation in yeasts. *Sci Rep* 5, 10.1038/srep11571.
- Moriya, K., Iefuji, H., Shimoi, H., Sato, S.-I., and Tadenuma, M. (1990). Treatment of distillery wastewater discharged from beet molasses-spirits production using yeast. *J Ferment Bioeng* 69: 138–140.

- Mukisa, I. M., Porcellato, D., Byaruhanga, Y. B., Muyanja, C. M., Rudi, K., Langsrud, T., and Narvhus, J. A. (2012). The dominant microbial community associated with fermentation of Obushera (sorghum and millet beverages) determined by culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* 160: 1–10.
- Nagy, L. G., Ohm, R. A., Kovács, G. M., ... Hibbett, D. S. (2014). Latent homology and convergent regulatory evolution underlies the repeated emergence of yeasts. *Nat Commun* 5, 10.1038/ncomms5471.
- Naumoff, D. G., and Naumov, G. I. (2010). Discovery of a novel family of α -glucosidase *IMA* genes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Dokl Biochem Biophys* 432: 114–116.
- Needleman, R. (1991). Control of maltase synthesis in yeast. *Mol Microbiol* 5: 2079–2084.
- Needleman, R. B., Federoff, H. J., Eccleshall, T. R., Buchferer, B., and Marmur, J. (1978). Purification and characterization of an α -glucosidase from *Saccharomyces carlsbergensis*. 17: 4657–4661.
- Ngiwsara, L., Iwai, G., Tagami, T., Sato, N., Nakai, H., Okuyama, M., Mori, H., and Kimura, A. (2012). Amino acids in conserved region II are crucial to substrate specificity, reaction velocity, and regioselectivity in the transglucosylation of honeybee GH-13 α -glucosidases. *Biosci Biotechnol Biochem* 76: 1967–1974.
- Nguyen, N. H., Suh, S.-O., Marshall, C. J., and Blackwell, M. (2006). Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. *Mycol Res* 110: 1232–1241.
- Nichols, B. L., Eldering, J., Avery, S., Hahn, D., Quaroni, A., and Sterchi, E. (1998). Human small intestinal maltase-glucoamylase cDNA cloning homology to sucrase-isomaltase. *J Biol Chem* 273: 3076–3081.
- Nijland, J. G., Shin, H. Y., Boender, L. G. M., de Waal, P. P., Klaassen, P., and Driessen, A. J. M. (2017). Improved xylose metabolism by a CYC8 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Env Microbiol* 83, e00095-17.
- Nützmann, H.-W., and Osbourn, A. (2015). Regulation of metabolic gene clusters in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 205: 503–510.
- Nützmann, H.-W., Scazzocchio, C., and Osbourn, A. (2018). Metabolic gene clusters in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 52: 159–183.
- Nyanga, L. K., Nout, M. J. R., Gadaga, T. H., Theelen, B., Boekhout, T., and Zwietering, M. H. (2007). Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. *Int J Food Microbiol* 120: 159–166.
- Ochangco, H. S., Gamero, A., Smith, I. M., Christensen, J. E., Jespersen, L., and Arneborg, N. (2016). *In vitro* investigation of *Debaryomyces hansenii* strains for potential probiotic properties. *World J Microbiol Biotechnol* 32, 10.1007/s11274-016-2109-1.
- Omasits, U., Ahrens, C. H., Müller, S., and Wollscheid, B. (2014). Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 30: 884–886.
- OpenStax College (2013). Organic Compounds Essential to Human Functioning. *In* OpenStax CNX. *Anatomy & Physiology* (veebipõhine õpik).
- Papon, N., Savini, V., Lanoue, A., Simkin, A. J., Crèche, J., Giglioli-Guivarc'h, N., Clastre, M., Courdavault, V., and Sibirny, A. A. (2013). *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for

- biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Curr Genet* 59: 73–90.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605–1612.
- Phaff, H. J., Miller, M. W., Recca, J. A., Shifrine, M., and Mrak, E. M. (1956). Yeasts found in the alimentary canal of *Drosophila*. *Ecology* 37: 533–538.
- Põšnograjeva, K. (2017). *Ogataea polymorpha* maltaas: valgu ja selle mutantide iseloomustamine ja mikroplaadipõhise aktiivsuse analüüsi meetodi väljatöötamine. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Prista, C., Loureirodias, M., Montiel, V., and Ramos, J. (2006). Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 5: 693–701.
- Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., and Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast* 33: 523–533.
- Ravin, N. V., Eldarov, M. A., Kadnikov, V. V., ... Skryabin, K. G. (2013). Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *BMC Genomics* 14, 10.1186/1471-2164-14-837.
- Reinders, A., Romano, I., Wiemken, A., and De Virgilio, C. (1999). The thermophilic yeast *Hansenula polymorpha* does not require trehalose synthesis for growth at high temperatures but does for normal acquisition of thermotolerance. *J Bacteriol* 181: 4665–4668.
- Riley, R., Haridas, S., Wolfe, K. H., ... Jeffries, T. W. (2016). Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 9882–9887.
- de las Rivas, B., Curiel, J. A., Miguel Mancheño, J., and Muñoz, R. (2007). Expression vectors for enzyme restriction- and ligation-independent cloning for producing recombinant His-fusion proteins. *Biotechnol Prog* 23: 680–686.
- Rokas, A., Wisecaver, J. H., and Lind, A. L. (2018). The birth, evolution and death of metabolic gene clusters in fungi. *Nat Rev Microbiol* 16: 731–744.
- Sainz-Polo, M. A., Ramírez-Escudero, M., Lafraya, A., González, B., Marín-Navarro, J., Polaina, J., and Sanz-Aparicio, J. (2013). Three-dimensional structure of *Saccharomyces* invertase: role of a non-catalytic domain in oligomerization and substrate specificity. *J Biol Chem* 288: 9755–9766.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
- Saldanha-da-Gama, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (1997). Characterization of yeasts associated with Portuguese pork-based products. *Int J Food Microbiol* 37: 201–207.
- Salusjärvi, L., Kaunisto, S., Holmström, S., Vehkomäki, M.-L., Koivuranta, K., Pitkänen, J.-P., and Ruohonen, L. (2013). Overexpression of NADH-dependent fumarate reductase improves D-xylose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 40: 1383–1392.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, p. A8.40-4. *In* J. Argentine, N. Irwin *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Savini, V., Catavittello, C., Onofrillo, D., Masciarelli, G., Astolfi, D., Balbinot, A., Febbo, F., D'Amario, C., and D'Antonio, D. (2011). What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses* 54: 434–441.
- Sawale, P. D., Shendurse, A. M., Mohan, M. S., and Patil, G. R. (2017). Isomaltulose (palatinose) – an emerging carbohydrate. *Food Biosci* 18: 46–52.
- Schumann, W., and Ferreira, L. C. S. (2004). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genet Mol Biol* 27: 442–453.
- Seiler, H., and Busse, M. (1990). The yeasts of cheese brines. *Int J Food Microbiol* 11: 289–303.
- Sherman, D. J., Martin, T., Nikolski, M., Cayla, C., Souciet, J.-L., and Durrens, P. (2009). Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Res* 37: D550–D554.
- Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol* 1, 10.1186/gb-2000-1-2-reviews1011.
- Siverio, J. M. (2002). Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 26: 277–284.
- Slot, J. C., and Rokas, A. (2010). Multiple *GAL* pathway gene clusters evolved independently and by different mechanisms in fungi. *Proc Natl Acad Sci* 107: 10136–10141.
- Spencer-Martins, I., and Uden, N. (1977). Yields of yeast growth on starch. *Eur J Appl Microbiol* 4: 29–35.
- Stanley, D., Rejzek, M., Naested, H., ... Smith, A. M. (2011). The role of α -glucosidase in germinating barley grains. *PLANT Physiol* 155: 932–943.
- Stefanini, I. (2018). Yeast-insect associations: It takes guts. *Yeast Chichester Engl* 35: 315–330.
- Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces* species in the production of beer. *Beverages* 2, 10.3390/beverages2040034
- Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113–130.
- Suh, S.-O., Marshall, C. J., Mchugh, J. V., and Blackwell, M. (2003). Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. *Mol Ecol* 12: 3137–3145.
- Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PNAS* 101: 11030–11035.
- Teste, M.-A., Francois, J. M., and Parrou, J.-L. (2010). Characterization of a new multigene family encoding isomaltases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the *IMA* family. *J Biol Chem* 285: 26815–26824.
- The MHC sequencing consortium (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 401: 921–923.
- Toivola, A., Yarrow, D., van den Bosch, E., van Dijken, J. P., and Scheffers, W. A. (1984). Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Appl Environ Microbiol* 47: 1221–1223.

- Trichez, D., Knychala, M. M., Figueiredo, C. M., Alves, S. L., da Silva, M. A., Miletti, L. C., de Araujo, P. S., and Stambuk, B. U. (2019). Key amino acid residues of the AGT1 permease required for maltotriose consumption and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* 126: 580–594.
- Van Leeuwen, C. C., Weusthuis, R. A., Postma, E., Van den Broek, P. J., and Van Dijken, J. P. (1992). Maltose/proton co-transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparative study with cells and plasma membrane vesicles. *Biochem J* 284 (Pt 2): 441–445.
- Veras, H. C. T., Parachin, N. S., and Almeida, J. R. M. (2017). Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. *Microb Cell Factories* 16, 10.1186/s12934-017-0766-x.
- Viigand, K., and Alamäe, T. (2007). Further study of the *Hansenula polymorpha* MAL locus: characterization of the α -glucoside permease encoded by the *HpMAL2* gene. *FEMS Yeast Res* 7: 1134–1144.
- Viigand, K., Põšnograjeva, K., Visnapuu, T., and Alamäe, T. (2018). Genome mining of non-conventional yeasts: search and analysis of MAL clusters and proteins. *Genes* 9, 10.3390/genes9070354.
- Viigand, K., Tammus, K., and Alamäe, T. (2005). Clustering of MAL genes in *Hansenula polymorpha*: cloning of the maltose permease gene and expression from the divergent intergenic region between the maltose permease and maltase genes. *FEMS Yeast Res* 5: 1019–1028.
- Viigand, K., Visnapuu, T., Mardo, K., Aasamets, A., and Alamäe, T. (2016). Maltase protein of *Ogataea (Hansenula) polymorpha* is a counterpart to the resurrected ancestor protein ancMALS of yeast maltases and isomaltases. *Yeast* 33: 415–432.
- Voordeckers, K., Brown, C. A., Vanneste, K., van der Zande, E., Voet, A., Maere, S., and Verstrepen, K. J. (2012). Reconstruction of ancestral metabolic enzymes reveals molecular mechanisms underlying evolutionary innovation through gene duplication. *PLoS Biol* 10, e1001446.
- Walton, J. D. (2000). Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. *Fungal Genet Biol* 30: 167–171.
- Wartmann, T., Erdmann, J., Kunze, I., and Kunze, G. (2000). Morphology-related effects on gene expression and protein accumulation of the yeast *Arxula adenivorans* LS3. *Arch Microbiol* 173: 253–261.
- Winter, H., and Huber, S. C. (2000). Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35: 253–289.
- Wisecaver, J. H., and Rokas, A. (2015). Fungal metabolic gene clusters-caravans traveling across genomes and environments. *Front Microbiol* 6, 10.3389/fmicb.2015.00161.
- Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C., and Chalutz, E. (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiol Mol Plant Pathol* 39: 245–258.
- Wohlbach, D. J., Kuo, A., Sato, T. K., ... Gasch, A. P. (2011). Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *Proc Natl Acad Sci* 108: 13212–13217.
- Wolfe, D., Dudek, S., Ritchie, M. D., and Pendergrass, S. A. (2013). Visualizing genomic information across chromosomes with PhenoGram. *BioData Min* 6, 10.1186/1756-0381-6-18.
- Wong, S., and Wolfe, K. H. (2005). Birth of a metabolic gene cluster in yeast by adaptive gene relocation. *Nat Genet* 37: 777–782.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A. ... Nurse, P. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415: 871–880.

Yamamoto, K., Miyake, H., Kusunoki, M., and Osaki, S. (2010). Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose: Crystal structure of isomaltase. *FEBS J* 277: 4205–4214.

Yamamoto, K., Miyake, H., Kusunoki, M., and Osaki, S. (2011). Steric hindrance by 2 amino acid residues determines the substrate specificity of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 112: 545–550.

Yamamoto, K., Nakayama, A., Yamamoto, Y., and Tabata, S. (2004). Val216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 271: 3414–3420.

Yamasaki, Y., and Suzuki, Y. (1980). Two forms of α -glucosidase from sugar-beet seeds. *Planta* 148: 354–361.

Zakalskiy, A. E., Zakalska, O. M., Rzhetskiy, Y. A., Potocka, N., Stasyk, O. V., Horak, D., and Gonchar, M. V. (2012). Overexpression of (His)₆-tagged human arginase I in *Saccharomyces cerevisiae* and enzyme purification using metal affinity chromatography. *Protein Expr Purif* 81: 63–68.

Zeng, W.-Y., Tang, Y.-Q., Gou, M., Sun, Z.-Y., Xia, Z.-Y., and Kida, K. (2017). Comparative transcriptomes reveal novel evolutionary strategies adopted by *Saccharomyces cerevisiae* with improved xylose utilization capability. *Appl Microbiol Biotechnol* 101: 1753–1767.

Zimmermann, F. K., Kaufmann, I., Rasenberger, H., and Haußmann, P. (1977). Genetics of carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: genes involved in the derepression process. *Mol Gen Genet* 151: 95–103.

Kasutatud veebiaadressid

Blast veebipõhine programm:	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
CAZy andmebaas:	http://www.cazy.org/
CBS kultuurikollektsioon:	http://www.westerdijkinstituut.nl/
European Nucleotide Archive andmebaas:	https://www.ebi.ac.uk/ena
ExpASY andmebaas:	https://www.expasy.org/
GenBank andmebaas:	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
Mycocosm andmebaas:	https://genome.jgi.doe.gov/mycocosm/home
Nobeli preemia koduleht:	https://www.nobelprize.org
OpenStax veebipõhine õpik:	https://cnx.org/contents/FPtK1zmh@6.27:Z3NTbD77@4/Organic-Compounds-Essential-to-Human-Functioning
PhenoGram veebipõhine programm:	http://visualization.ritchielab.org/phenograms/plot
Pubchem andmebaas:	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
UniProt andmebaas:	http://www.uniprot.org

Lisad

Lisa 1

Käesoleva töö andmed on esitatud publikatsioonis „Genome mining of non-conventional yeasts: search and analysis of *MAL* clusters and proteins“ ajakirjas *Genes* (2018). Täispikkuses artikkel on köidetud töö lõppu.



Article

Genome Mining of Non-Conventional Yeasts: Search and Analysis of *MAL* Clusters and Proteins

Katrin Viigand [†], Kristina Põšnograjeva [†], Triinu Visnapuu ^{id} and Tiina Alamäe ^{* id}

Department of Genetics, Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Riia 23, 51010 Tartu, Estonia; katrin.viigand@ut.ee (K.V.); kristina.poshnograjeva@gmail.com (K.P.); triinu.visnapuu@ut.ee (T.V.)

* Correspondence: tiina@alamae.eu; Tel.: +372-737-5013

[†] These authors contributed equally to this work.


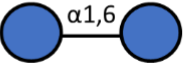
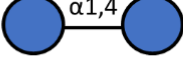

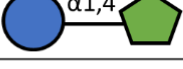




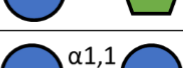

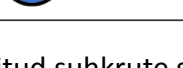
Received: 30 May 2018; Accepted: 12 July 2018; Published: 16 July 2018






Abstract: Genomic clustering of functionally related genes is rare in yeasts and other eukaryotes with only few examples available. Here, we summarize our data on a nontelomeric *MAL* cluster of a non-conventional methylotrophic yeast *Ogataea (Hansenula) polymorpha* containing genes for α -glucosidase *MAL1*, α -glucoside permease *MAL2* and two hypothetical transcriptional activators. Using genome mining, we detected *MAL* clusters of varied number, position and composition in many other maltose-assimilating non-conventional yeasts from different phylogenetic groups. The highest number of *MAL* clusters was detected in *Lipomyces starkeyi* while no *MAL* clusters were found in *Schizosaccharomyces pombe* and *Blastobotrys adenivorans*. Phylograms of α -glucosidases and α -glucoside transporters of yeasts agreed with phylogenesis of the respective yeast species. Substrate specificity of unstudied α -glucosidases was predicted from protein sequence analysis. Specific activities of *Scheffersomyces stipitis* α -glucosidases *MAL7*, *MAL8*, and *MAL9* heterologously expressed in *Escherichia coli* confirmed the correctness of the prediction—these proteins were verified promiscuous maltase-isomaltases. α -Glucosidases of earlier diverged yeasts *L. starkeyi*, *B. adenivorans* and *S. pombe* showed sequence relatedness with α -glucosidases of filamentous fungi and bacilli.

Keywords: α -glucosidase; maltase; isomaltase; α -glucoside permease; gene cluster; protein evolution; methylotrophic yeast; *MAL*-locus

Lisa 2

Suhkru nimetus	Suhkru ehitus
α -MG	
Isomaltoos	
Maltoos	
Maltotrioois	
Maltuloos	
Meletsitoos	
Palatinoos	
PNPG	
Rafinoos	
Sahharoos	
Trehaloos	
Turanoos	

 Glükoos
 Fruktoos
 Galaktoos

Joonis 16. Töös kasutatud või mainitud suhkrute struktuur. Joonise koostamisel kasutati PubChem andmebaasi (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Lisa 3

Tabel 4. Töös kasutatud pärmitüved. Pärmide genoom on kättesaadav andmebaasis MycoCosm, va *C. fabianii* genoom, mille uurimiseks kasutati andmebaasi European Nucleotide Archive (ENA).

Pärmiliik	Kultuurikollektsioonide numbrid	Viide
<i>Ogataea polymorpha</i> leu1.1	NCYC 495; ATCC MYA-335; CBS 1976, NRRL Y-1789	(Riley <i>et al.</i> , 2016)
<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	ATCC 26012; CBS 12304; NRRL Y-7560	(Ravin <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	NRRL Y-11557; ATCC 58680; CBS 1807	(Riley <i>et al.</i> , 2016)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS 767; ATCC 36239	(Dujon <i>et al.</i> , 2004; Sherman <i>et al.</i> , 2009)
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CBS 566; ATCC 6260	(Butler <i>et al.</i> , 2009; Papon <i>et al.</i> , 2013)
<i>Scheffersomyces (Pichia) stipitis</i>	CBS 6054	(Jeffries <i>et al.</i> , 2007)
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	NRRL YB-4239; CBS 2605; ATCC 11503	(Butler <i>et al.</i> , 2009)
<i>Blastobotrys (Arxula) adenivorans</i> LS3	CBS 8244	(Sherman <i>et al.</i> , 2009; Kunze <i>et al.</i> , 2014)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ATCC 24843, CBS 10395	(Wood <i>et al.</i> , 2002)
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	YJS4271	(Freel <i>et al.</i> , 2014)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	CBS 1146	(Gordon <i>et al.</i> , 2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	CBS 8803; ATCC 204508	(Goffeau <i>et al.</i> , 1996)
<i>Yamadazyma (Candida) tenuis</i>	NRRL Y-1498; CBS 615; ATCC 10573	(Wohlbach <i>et al.</i> , 2011)
<i>Spathaspora passalidarum</i>	NRRL Y-27907; CBS 10155	(Wohlbach <i>et al.</i> , 2011)
<i>Peterozyma (Pichia) xylosa</i>	NRRL Y-12939; CBS 2286; NCYC 555	(Krassowski <i>et al.</i> , 2018)

Tabel 5. Töös kasutatud α -glükosidaasid (AG'd).

Pärmiliik	α -Glükosidaasi akronüüm	Mycocosm'i tunnusnumber	GenBank tunnusnumber
<i>Blastobotrys adenivorans</i>	AG1	rna_ARAD1C14212g	Pole saadaval
	AG2	rna_ARAD1D20130g	Pole saadaval
<i>Lipomyces starkeyi</i>	AG1	gm1.3262_g	ODQ72902
	AG2	fgenesh1_kg.8_#_10_#_Locus10580v1r pkm1.26	ODQ71836.1
	AG3	fgenesh1_kg.21_#_1_#_Locus3996v1r km38.55	ODQ68842
	AG4	CE77125_4419	ODQ69382.1
	AG5	fgenesh1_kg.10_#_105_#_Locus4759v1 rpkm25.91	ODQ71069.1
	AG6	fgenesh1_kg.6_#_581_#_Locus4531v6r pkm0.18_PRE	ODQ73295.1
	AG7	estExt_Genemark1.C_170108	ODQ69164.1
	AG8	gm1.6616_g	ODQ69958.1
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	AG1.1	Pole saadaval	CDR39670.1
	AG1.2	Pole saadaval	CDR39674.1
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	AG1	PGUG_01643T0	EDK37545.2
	AG2	PGUG_05731T0	XP_001481968.1
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	AG1	TDEL_OD06530	XP_003681448.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MAL32	YBR299W	NP_009858.3
	IMA1	YGR287C	NP_011803.3
<i>Ogataea polymorpha</i>	MAL1	fgenesh1_kg.1_#_333_#_isotig01325	XP_018213389.1
<i>Ogataea parapolyomorpha</i>	AG1	HPODL_02607T0	XP_013932394
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	AGL1	e_gww1.6.1.354.1	XP_001385341.1
	MAL6	e_gwh1.2.1.484.1	XP_001382912.2
	MAL7	e_gww1.5.1.399.1	XP_001384657.2
	MAL8	estExt_genewise1_worm.C_chr_6.1033 6	XP_001385796.1
	MAL9	fgenesh1_pg.C_chr_1.2000465	XP_001387228.2
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	AG1	LELG_01359T0	XP_001526531.1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	AG1	Pole saadaval	XP_459350.2
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Mal1	mal1	NP_595063.1
<i>Yamadazyma tenuis</i>	AG1	gwp2.e_gw0.00006.1096.1	XP_006684833.1
<i>Spathaspora passalidarum</i>	MAL6	fgenesh1_kg.1_#_129_#_isotig02250	XP_007372140.1
<i>Peterozyma xylosa</i>	AG1	snap_masked-flattened_line_2- processed-gene-0.47-mRNA-1	Pole saadaval

Tabel 6. Töös kasutatud α -glükosiidide transporterid (AGT'd).

Pärmiliik	α -Glükosiidi transporter akronüüm	Mycocosm tunnusnumber	GenBank tunnusnumber
<i>Blastobotrys adenivorans</i>	AGT1	rna_ARAD1D09658g	Pole saadaval
<i>Lipomyces starkeyi</i>	AGT1	estExt_Genewise1.C_6_t10076	ODQ72903
	AGT2.1	gm1.4217_g	ODQ71837.1
	AGT2.2	estExt_Genewise1.C_8_t10022	ODQ71838.1
	AGT3	estExt_Genemark1.C_210003	ODQ68844
	AGT4	fgenes1_kg.16_#_243_#_Locus11337v1r pkm1.02	ODQ69380.1
	AGT5	gm1.5097_g	ODQ71068.1
	AGT6	gm1.3625_g	ODQ73296.1
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	AGT1	Pole saadaval	CDR39675.1
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	AGT1.1	PGUG_01640T0	EDK37542.2
	AGT1.2	PGUG_01641T0	EDK37543.2
	AGT1.3	PGUG_01642T0	XP_001485971.1
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	AGT1	TDEL_0D06520	XP_003681447.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MAL61*	Pole saadaval	P15685.1
	AGT1	YGR289C	NP_011805.3
	MPH2	YDL247W	POCD99.1
	MPH3	YJR160C	POCE00.1
<i>Ogataea polymorpha</i>	MAL2	fgenes1_kg.1_#_334_#_isotig00883	XP_018213391.1
<i>Ogataea polymorpha</i>	MAL2	fgenes1_kg.1_#_334_#_isotig00883	XP_018213391.1
<i>Ogataea parapolyomorpha</i>	AGT1	HPODL_02606T0	XP_013932393
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	MAL1	fgenes1_pg.C_chr_2.1000315	XP_001382383.1
	MAL2	fgenes1_pg.C_chr_5.1000002	XP_001385023.1
	MAL3	e_gwh1.6.1.324.1	XP_001385693.1
	MAL4	e_gwh1.6.1.358.1	XP_001385456.1
	MAL5	fgenes1_pg.C_chr_6.1000012	XP_001385340.2
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	AGT1	LELG_01361T0	XP_001526533.1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	AGT1	DEHA2E00550g	XP_459351.2
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Sut1	sut1	NP_001342860.1
<i>Yamadazyma tenuis</i>	AGT1	gwp2.e_gw0.00006.296.1	XP_006684836.1
<i>Spathaspora passalidarum</i>	MAL1	genewise1plus.e_gw0.1.702.1	XP_007372139.1
<i>Peterozyma xylosa</i>	AGT1	snap_masked-flattened_line_2- processed-gene-0.64-mRNA-1	Pole saadaval

* Tüvi CB11

Lisa 4

Tabel 7. Konstrueeritud vektoritega transformeeritud bakterirakkude kolooniates α -glükosidaasi kodeeriva geeni olemasolu kontrollimiseks kasutatud praimerid. pURI3Cter vektoritesse inserteeritud geeni kontrollimiseks sekveneerimisega kasutati samu praimereid, mida kasutati pURI3Cter puhul transformeeritud bakterirakkude kolooniates α -glükosidaasi kodeeriva geeni olemasolu kontrollimiseks (vt ptk 2.2.4).

Plasmiid	I praimer	I praimeri järjestus 5' → 3' suunaga	II praimer	II praimeri järjestus 5' → 3' suunaga
Sc MAL62 pJET1.2	MAL62PURIC ter_Fw	TAACCTTAAGAAGGAGAT ATACATATGACTATTTCTG ATCATCCAGAA	MAL62PURIC ter_Rev	GCTATTAATGATGATGATG ATGATGTTTGACGAGGTA GATTCTACCTTC
Sc MAL62 pURI3Cter	Ampsaba	CTGAGATAGGTGCCTCAC	T7	TAATACGACTCACTATAGG G
Ss AGL1 pJET1.2	Ss_AGL1_Fw	AACATCGTTCCCAAGCTGC TAAG	pJET1.2_Rev	AAGAACATCGATTTTCCAT GGCAG
Ss AGL1 pURI3Cter	Ss_AGL1_Fw	AACATCGTTCCCAAGCTGC TAAG	Ampsaba	CTGAGATAGGTGCCTCAC
Ss MAL6 pJET1.2	Ss_MAL6_Fw	AAGCACACATCAAAGTCT GC	pJET1.2_Fw	CGACTCACTATAGGGAGA GCGGC
Ss MAL6 pURI3Cter	Ss_MAL6_Fw	AAGCACACATCAAAGTCT GC	Ampsaba	CTGAGATAGGTGCCTCAC
Ss MAL7 pJET1.2	Ss_MAL7_Fw	AGTACGCTTCACAGTCTG	pJET1.2_Fw	CGACTCACTATAGGGAGA GCGGC
Ss MAL7 pURI3Cter	Ss_MAL7_Fw	AGTACGCTTCACAGTCTG	Ampsaba	CTGAGATAGGTGCCTCAC
Ss MAL8 pJET1.2	Ss_MAL8_Fw	TAAGTACCGTAACGAATCT GC	pJET1.2_Rev	AAGAACATCGATTTTCCAT GGCAG
Ss MAL8 pURI3Cter	Ss_MAL8_Fw	TAAGTACCGTAACGAATCT GC	Ampsaba	CTGAGATAGGTGCCTCAC
Ss MAL9 pJET1.2	Ss_MAL9_Fw	CGACTCTCCAGAGTTCAGA GTTC	pJET1.2_Fw	CGACTCACTATAGGGAGA GCGGC
Ss MAL9 pURI3Cter	Ss_MAL9_Fw	CGACTCTCCAGAGTTCAGA GTTC	Ampsaba	CTGAGATAGGTGCCTCAC

Lisa 5

Tabel 8. CTG koodonite (DNA koodonid, mis vastavad mRNA's CUG koodonitele) arv ja koodonile vastava aminohappe positsioon *S. stipitis*'e α -glükosidaaside geenides.

Geen	CTG koodonite arv	Aminohappe positsioon
MAL6	2	238
		559
MAL8	0	
MAL7	1	559
MAL9	2	227
		421
AGL1	0	

Nukleotiidide positsioonid joonduses: 306-312

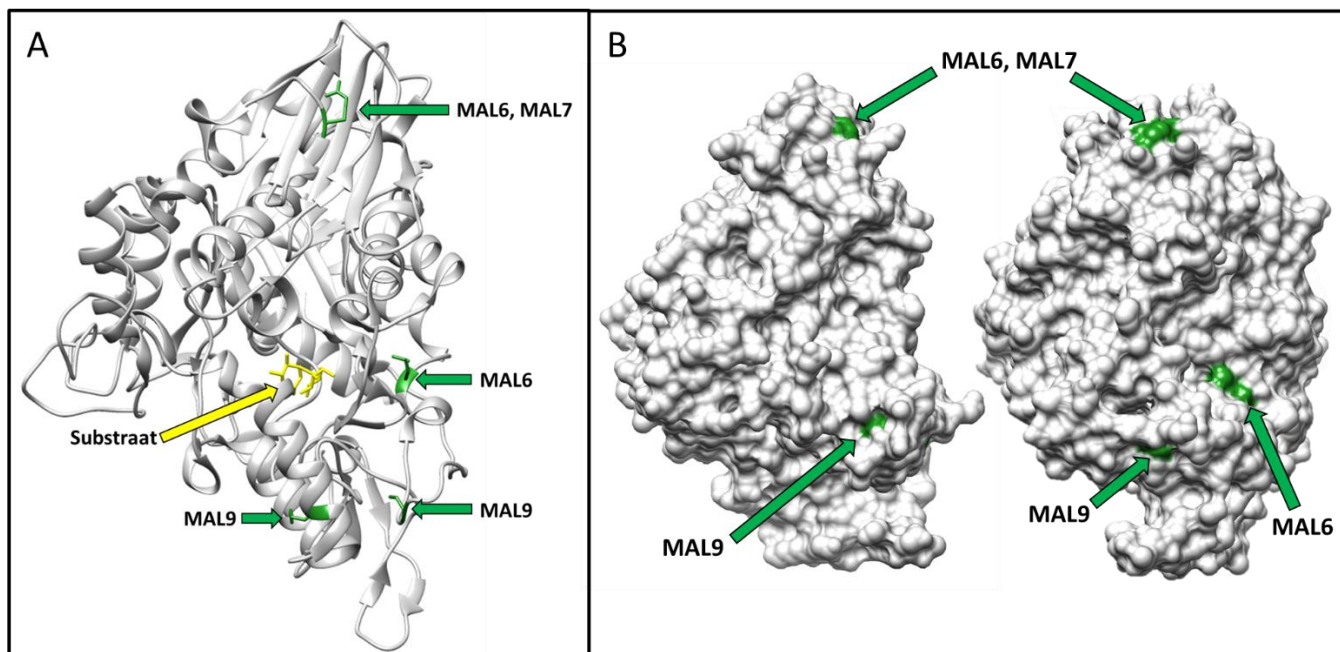
316-324

517-524

671-679

1. <i>S. cerevisiae</i> _MAL32	D K T S K L Q	W G S H N G P R I	- S K E M K D F	S S R V L K P W E
2. <i>S. cerevisiae</i> _IMA1	D K N S T W Q	P Y T L N G P R I	- S E E M K K F	S S R T L K P W E
3. <i>S. cerevisiae</i> _IMA2	D E N S K W Q	P F T M N G P R I	- S K E M K R F	S S R T L K P W E
4. <i>S. cerevisiae</i> _IMA3	D E N S K W Q	P F T M N G P R I	- S K E M K R F	S S R T L K P W E
5. <i>S. cerevisiae</i> _IMA4	D E N S K W Q	P F T M N G P R I	- S K E M K R F	S S R T L K P W E
6. <i>S. cerevisiae</i> _IMA5	D P T V P Y Q	E F F I N G P R I	- S E K M K K F	- S R T L Q P W E
7. <i>S. stipitis</i> _AGL1	F P E E E F Q	L Y S Q N G P R I	F K E K E E K L	N E Q K L S P F E
8. <i>S. stipitis</i> _MAL6	Y P D E E F Q	K Y S S N G P R I	F K E K E E K L	D E S T L S P Y E
9. <i>S. stipitis</i> _MAL7	C P D E E F Q	Q N T N N G P R I	F K E K E E K L	D E S I L S P Y E
10. <i>S. stipitis</i> _MAL8	F P D L E Y Q	K Y A H N G P R I	Y K E K E E K L	E E S T L S P Y E
11. <i>S. stipitis</i> _MAL9	F P E S E F Q	M F H Q H G P R I	F K E K S N K L	K E G I L T P Y E
12. <i>L. starkeyi</i> _AG1	D P S N F I Q	H L Y C N G P R I	- - T R K E R I	Q P E T L Q P F E
13. <i>L. starkeyi</i> _AG2	V P S S K Y Q	M F Y S M G P R L	- Q E T L N T A	T E M V V R P Y E
14. <i>L. starkeyi</i> _AG3	Q T E R E F Q	E H F A C G P R L	- R E L Q R I T	G A V S L H P F E
15. <i>L. starkeyi</i> _AG4	I P S A K F Q	I H Y A N G P R L	- E E I L Q V V	P V I T I R P F E
16. <i>L. starkeyi</i> _AG5	V P S S K Y Q	R Y Y A M G P R L	- Q D A M D I A	A E L A L R P Y E
17. <i>L. starkeyi</i> _AG6	Q P R E E T Q	K Y F T N G P R I	- - T A L S K A	P M D Q L G P Y E
18. <i>L. starkeyi</i> _AG7	D P S V T Y Q	M Y Y A T G P R L	- K E V L D T V	- V I V L L P Y E
19. <i>L. starkeyi</i> _AG8	N P A S V Y Q	V Y Y A T G P H L	- N E V L D S I	- E V V L R P F E
20. <i>B. adenivorans</i> _AG1	I P G S K Y Q	K Y Y A N G P R L	- E D E K D Q F	G K L V L K P F Q
21. <i>B. adenivorans</i> _AG2	V P G Q K L Q	I I V E T G P Q L	- - E A L K Q A	Q S G S L Q P L E
22. <i>D. hansenii</i> _AG1	H P N A K Y Q	P Y F A C G P R L	- P E I L K A A	P S V E L K P Y E
23. <i>L. elongisporus</i> _AG1	Y K D Q Y Y Q	M Y T N N G P R I	Y A E K E K K L	V E D R L S P F E
24. <i>O. parapolyomorpha</i> _AG1	F P G E K Y Q	P L I N S G P R I	- - E E K A E L	I T G K L Q P Y E
25. <i>O. polymorpha</i> _MAL1	F P G E K Y Q	P L I N S G P R I	- - E E K A E L	I T G K L Q P Y E
26. <i>S. pombe</i> _Mal1	D D R Y E Y Q	Q Y Y A N G P R I	- Q E E I E K T	S P V T L N P Y Q
27. <i>T. delbrueckii</i> _AG1	D K G S P W Q	P Y C L N G P R I	- S Q E M K D F	A S K T L K P W E
28. <i>C. fabianii</i> _AG1.2	F P G E K Y Q	G L S N T G P R I	- - E E R A L L	I S G K L Q P Y E
29. <i>C. fabianii</i> _AG1.1	I P G A P Y Q	E M C V N G P R I	- - E E K Q K R	L Q G K L Q P Y E
30. <i>M. guilliermondii</i> _AG1	D H T Q K W Q	S L C S N G P R I	- K E K L E K L	S D S H L A P Y E
31. <i>M. guilliermondii</i> _AG2	I P D F E H Q	L Y H Q N G P R I	- K A K M D K L	- E A T L G P Y E

Joonis 17. CUG koodoni kodeeritud seriinide positsioonid *S. stipitis*'e α -glükosidaasides on joonduses teiste pärmide α -glükosidaasidega tähistatud kollase taustaga. Ekspresseerides neid valke heteroloogsetl *E. coli*'s, transleeritakse need koodonid mitte seriinide vaid leutsiinidena. Musta taustaga on tähistatud aminohapped, mis on vähemalt 50% valkudest konserveerunud. Ükski *S. stipitis*'e α -glükosidaasi CUG koodoni kodeeritud aminohape ei paikne valkude konserveerunud alas.



Joonis 18. Paneelil A on *S. cerevisiae* IMA1 ruumilisel struktuuril (Yamamoto *et al.*, 2010; seostunud substraadiks on isomaltoos) näidatud rohelisena ja noolega aminohapped, millele vastavas positsioonis on *S. stipitis*'e α -glükosidaasides CUG koodoni kodeeritud aminohapped ja mida transleeritakse valesti heteroloogsel ekspresseerimisel *E. coli*'s. Ükski positsioon ei asu substraadi seondumistasku lähedal, kus asuvad aminohapped mõjutavad α -glükosidaasi substraadivalikut. Paneel B näitab sama valgu pinna struktuuri kahe veidi erineva nurga alt. CUG koodonile vastavad aminohapped ulatuvad *S. stipitis*'el tõenäoliselt valgu pinnale. Joonise koostamiseks kasutati programmi Chimera.

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristina Põšnograjeva,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Pärmide *MAL* klastrid ja valgud põhirõhuga *Scheffersomyces stipitis*'e α -glükosidaasidel“, mille juhendajad on Tiina Alamäe ja Katrin Viigand, 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 3.0, 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 lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kristina Põšnograjeva

30.05.2019