

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

MAIA-LIISA ANTON

**HISTOONI H4 N-TERMINAALSETE MUTATSIOONIDE
MÕJU TRANSKRIPTSIOONIST SÕLTUVALE
NUKLEOSOOMIDE DÜNAAMIKALE PAGARIPÄRMIS
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Magistritöö

Juhendaja: Arnold Kristjuhan, *PhD*

TARTU 2010

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
Kromatiini struktuur.....	7
Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid.....	12
Histoonide ubikvitinüleerimine	14
Histoonide metüleerimine	14
H4K20 metüleerimine.....	15
Histoonide atsetüleerimine.....	16
Histooni H4 K5, K8 ja K12 atsetüleerimine	17
Histooni H4 K16 atsetüleerimine.....	18
H4 K16 atsetüleerimise mõju kromatiini struktuurile	19
H4 K16 atsetüleerimise seos heterokromatiiniga	20
H4K20 atsetüleerimine	20
Kromatiini remodelleerijad.....	21
Valke kodeerivate geenide transkriptsiooni initsiatsioon ja elongatsioon.....	23
Nukleosoomide dünaamika transkriptsiooni elongatsioonis	25
TÖÖ EESMÄRGID	29
MATERJALID JA MEETODID	30
Söötmed	30
Antikehad.....	30
Kasutatud oligonukleotiidid.....	31
Kasutatud pärmitüved ja nende saamine.....	32
Kromatiini Immunosadestamine (ChIP).....	34
Pärmi rakuekstrakti valmistamine.....	34
Kasutamiseks geeni induktsiooni uurimisel.....	34
Kasutamiseks geeni transkriptsiooni repressiooni uurimisel.....	35
Immunosadestamine (IP)	36
qPCR.....	37

TULEMUSED	39
Histooni H4 mutatsioonide mõju RNA polümeraas II hulgale indutseeritud geeni kodeerivas alas.....	39
Histooni H4 mutatsioonide mõju nukleosoomide eemaldamisele indutseeritud geeni kodeerivalt alalt.....	41
Histooni H4 mutatsioonide mõju nukleosoomse struktuuri taastumisele pärast geeni induktsiooni lõppemist.....	50
ARUTELU.....	55
KOKKUVÕTE	58
SUMMARY	59
KIRJANDUSE LOETELU	60
LISA 1. Kromatiini immunosadestamise puhvrid.	68
TÄNUAVALDUSED	70

KASUTATUD LÜHENDID

ADE – adeniin

AdoMet – S-adenosüül-L-metioniin

ap - aluspaar

Asf1 – *antisilencing function 1* (vaigistamise vastane funktsioon)

BSA – *bovine serum albumin* (veise seerumalbumiin)

CAF1 – *chromatin assembly factor 1* (kromatiini assambleeriv faktor 1)

ChIP – kromatiini immunosadestamine

CTD – karboksü-terminaalne domeen

FACT – *facilitates chromatin transcription* (vahendab kromatiini transkriptsiooni)

GTF – *general transcription factor*, üldine transkriptsioonifaktor

HAT – histoonide atsetüültransferaas

HDAC – histoonide deatsetülaas

HDM – histoonide demetülaas

HFD – *histone fold domain*, histooni voldi domään

Hir1 – *histone regulation 1* (histooni reguleerija)

His – histidiin

HMT – histoonide metüültransferaas

H2A – histoon 2A

H2B – histoon 2B

H3 – histoon 3

H4 – histoon 4

LEU – leutsiin

LYS – lüsiin

OD – optiline tihedus

PBS – *phosphate buffered saline* (fosfaatpuhvriga soolalahus)

PIC – preinitsiatsioonikompleks

Pol II – RNA polümeraas II kompleks

PRMT – *protein arginine methyltransferase* (histooni arginiini metüültransferaas)

RC – *replication coupled* (replikatsioonist sõltuv)

RI – *replication independent* (replikatsioonist sõltumatu)

qPCR – *real-time PCR*

SAGA – Spt6-Ada-Gcn5-atsetüültransferaas
 SET – *Su(var)*, *Enhancer of zeste*, *trithorax*
 Sir – *silent information regulator* (vaigistava informatsiooni regulaator)
 Snf 1 (2) – *Sucrose non-fermented 1(2) kinase*
 SRI – *Set2 Rpb1 interacting domain* (Set2 Rpb1 interakteeruv domeen)
 SWI/SNF - *switching defective/sucrose nonfermenting*
 TBP – *TATA – box binding protein* (TATA regiooniga seonduv valk)
 TF – transkriptsioonifaktor
 TFIID – Transkriptsioonifaktor II D
 TFIIH – transkriptsioonifaktor II H
 TRP – trüptofaan
 TSS – *transcription start site*, transkriptsiooni alguskoht
 URA – uratsiil
 YPD – *Yeast extract, peptone, dextrose*
 YNB – *yeast nitrogen base*
 WCE – *whole cell extract*, kogu raku ekstrakt
 5 – FOA – *5-fluoroorotic acid*
 4HB – *4 helix bundle*, 4 heeliksi pundar struktuur

SISSEJUHATUS

Eukarüootsetes rakkudes ei ole DNA vabalt, vaid on pakitud kromatiini, mis on DNA, histoonide ja teiste seondunud valkude kompleks. Kromatiini kõige väiksemaks korduvaks struktuuriüksuseks on nukleosoom, mis moodustub 8 histoonist (2 koopiat H2A, H2B, H3 ja H4), mille ümber on keerdunud 146 aluspaari DNA-d. Nukleosoomid moodustavad erineva kokkupakkimisastmega kõrgemaid struktuure, mis tipneb mitoosis metafaasi kromosoomide moodustumisega.

Kõik rakus aset leidvad DNA-ga seotud protsessid nagu DNA replikatsioon, transkriptsioon, rekombinatsioon, kahjustuste parandamine toimuvad kromatiini kontekstis. Kromatiini struktuur tagab DNA pakkimise, kuid samal ajal takistab rakulistes protsessides osalevate valkude ligipääsu DNA-le. Nukleosoomse struktuuri muutmine on mitmetahuline protsess, mis on reguleeritud paljude faktorite poolt. Selles protsessis on tähtis roll histoonidel toimuvatel post-translatsioonilistel modifikatsioonidel nagu metüleerimine, atsetüleerimine jt. Kromatiini struktuuri muutmisel osalevad mitmed valkude kompleksid, mis on seotud histoonide post-translatsiooniliste modifikatsioonide lisamise või eemaldamisega, nukleosoomide liigutamise, eemaldamise ja tagasipanemisega.

Valku kodeerivate geenide ekspressiooni esimeseks etapiks on transkriptsioon RNA polümeraasi II poolt. Transkribeerivate komplekside moodustumiseks on vajalik promootoritelt nukleosoomide eemaldamine ning polümeraasi elongeerumiseks on vaja mööda pääseda kodeerivat ala katvatest nukleosoomidest. Histoonide modifikatsioonidel on oluline roll transkriptsioonis. Varem on näidatud polümeraasi hulga suurenemist ning nukleosoomide vähenemist geenide kodeerivas alas transkriptsiooni käigus, kuid nukleosoomide eemaldamise ulatus, dünaamika ajas ja geeni erinevates piirkondades ei ole teada.

Käesoleva töö teoreetilises osas antakse ülevaade kromatiini struktuurist, histoonide modifikatsioonidest ning transkriptsioonist kromatiini kontekstis. Töö eksperimentaalses osas uuriti pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* nukleosoomide eemaldamise dünaamikat transkriptsiooni indutseerimise ning represseerimise käigus. Lisaks on uuritud histooni H4 N-terminuse positsioonide lüsiin 5, 8, 12 ja 16 muteerimise mõju sellele dünaamikale.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Kromatiini struktuur

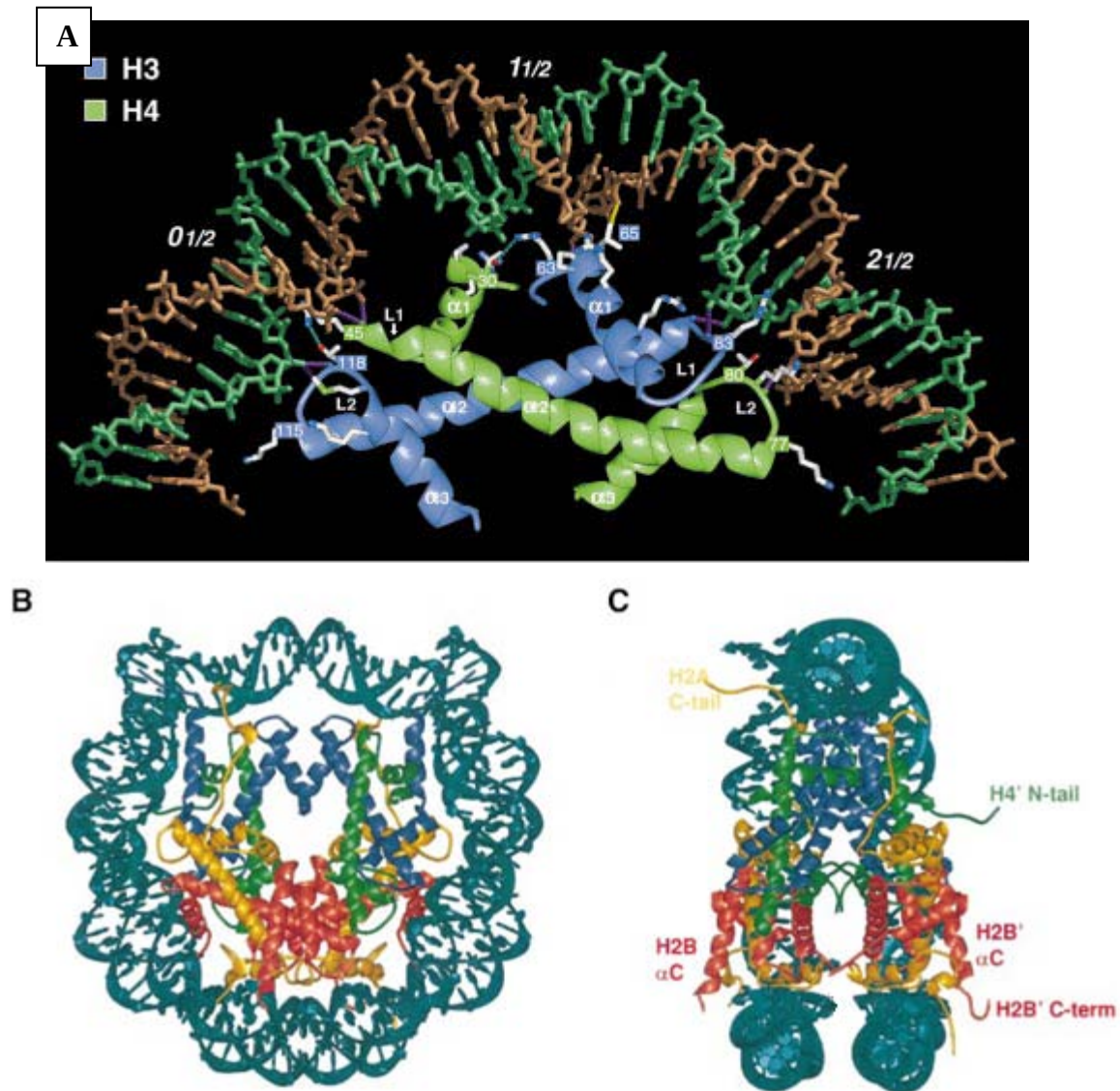
Eukariootsete organismide genoomid on väga erinevas suurusega: pagaripärmil *Saccharomyces cerevisiae* 12×10^6 aluspaari, inimesel 6×10^9 aluspaari ja aafrika kopskalal (*Protopterus aethiopicus*) 13×10^{10} aluspaari. DNA ahela pikkuseks on pärmis 4 mm ja inimesel umbes 2 m. Eukariootsetes rakkudes ei ole DNA vabalt, vaid on osa kromatiinist – keerukast kompleksist, mis koosneb DNA-st, histoonidest ja teistest nendega seondunud valkudest.

Raku genoomi moodustavad pikad DNA ahelad pakitakse rakkudes, mille läbimõõt on ligikaudu 0,01mm, histoonide abil nukleosoomidesse (Joonis 1) ning edasi kromatiini kõrgematesse struktuuridesse (30 nm kiud jt). Sellise pakkimise tulemusena on inimese mitoosi M-faasis olevates rakkudes 4m pikkune DNA pakitud kromosoomidesse, mille kogupikkus on 120 μm .

Nukleiinhapetega (sel ajal kasutati terminit nukliin) seotud valgud (histoonid) avastas 1884. aastal saksa teadlane Albrecht Kossel. Algselt arvati, et histoonidel on ainult struktuurne roll. Järgneva 50 aasta jooksul uuriti histoonide biokeemilisi omadusi väga põhjalikult ja 1950 a. esitasid Stedman ja Stedman esmakordselt hüpoteesi, et histoonid võivad inhibeerida nukleiinhapetega seotud protsesse nagu DNA replikatsioon ja RNA süntees (Stedman, 1950). Suures osas varases histoonide-alases kirjanduses märgiti, et nad puhastuvad paljudes väga sarnastes vormides. Leiti, et need vormid erinevad põhiliselt histoonide kõrvalahelate modifikatsioonide, nagu fosforüleerimine, atsetüleerimine ja metüleerimine, poolest. Histoonide modifikatsioonide võimaliku bioloogilise rolli hüpoteesi esitasid Allfrey ja Mirsky 1964 aastal, kui nad näitasid, et histoonide atsetüleeritus korreleerub RNA sünteesi kõrgema määraga (Allfrey & Mirsky, 1964).

1970-ndatel aastatel tehti mitmeid olulisi avastusi kromatiini struktuuri osas. R. Kornbergi, A. ja D. Olinsi, P.Oudet jpt avastuste põhjal selgitati lõpuks nukleosoomi põhiline struktuur – u. 200 ap DNA-d moodustavad kompleksi 4 histoonipaariga. Avaldati ka elektronmikrokoskoopia pildid “helmed ketil” (“beads on a string”) struktuuri kohta (Oudet et al, 1975). 1984. aastal avaldati nukleosoomi südamiku röntgenstruktuuranalüüs $7 \text{ \AA}$ lahutusega (Richmond et al, 1984), 1997. aastal $2,8 \text{ \AA}$ lahutusega (Luger et al, 1997) ning tänaseks on jõutud nukleosoomi südamiku DNA struktuuri uurimisel juba $1,9 \text{ \AA}$ lahutuseni

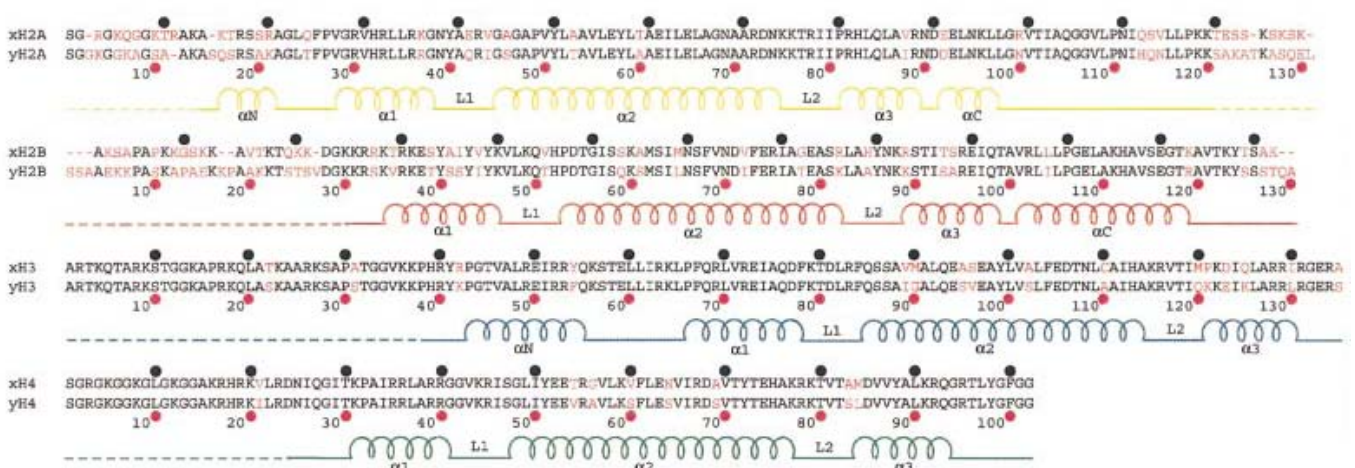
(Richmond & Davey, 2003). Kromatiini uurimise ajaloost täpsemalt annab hea ülevaate (Olins & Olins, 2003).



Joonis 1. Histoonide ja DNA struktuur nukleosoomis. (A) H3/H4 dimeeri ja sellega seotud DNA struktuur konna nukleosoomis. Struktuursed elemendid $\alpha 1$ -L1- $\alpha 2$ -L2- $\alpha 3$ on välja toodud. (Luger et al, 1997) (B) Pärsi tuumiknukleosoomi kristallstruktuur vaadates piki DNA superheeliksi telge ja (C) risti DNA superheeliksi teljega. Histoon H2A on kollane, H2B punane, H3 sinine ja H4 roheline, DNA on tumeroheline. Histoonide α -heeliksite ning N- ja C-terminaalsete sabade paigutus on näidatud (White et al, 2001).

Histoonid on füsioloogilise pH juures tugeva positiivse laenguga eukariootsete rakkude tuumades olevad valgud, mille ümber pakitakse DNA. DNA ja valkude kompleksi, mille moodustab histoonide oktameer (2 koopiat iga histooni molekuli H2A, H2B, H3 ja H4), mille ümber pakitakse 1,65 keerdu (145-147 aluspaari) DNA-d, nimetatakse nukleosoomi

südamikuks (*nucleosome core particle*) (joonis 1 B ja C). Nukleosoomi südamiku läbimõõt on 11 nm ja kõrgus 5,5 nm. Iga histoon koosneb kahest, funktsionaalselt erinevast osast: histooni "kehas" ja histooni "sabades" (N – terminaalne ja C – terminaalne). Kõik histoonid sisaldavad ühist struktuuri elementi – histooni "kehas" paiknevat histooni voldi domääni (*histone fold domain*, HFD), mis koosneb kolmest α -heeliksist ($\alpha 1$, $\alpha 2$ ja $\alpha 3$), mida eraldavad 2 lingu (L1 ja L2) (joonised 1a ja 2) (Arents & Moudrianakis, 1995). HFD-i sisaldavad ka arhede histoonid ja mõned eukariootsed transkriptsioonifaktorid (TFIID subühikud p42 ja p62) (Arents & Moudrianakis, 1995). Histoonide „sabad“ on vabama struktuuriga ja sisaldavad palju aminohappeid, mida post-translatsiooniliselt modifitseeritakse. Histoonide sabade struktuuri kohta on vähe teada, kuna nendest ei ole suudetud saada selgeid elektrontiheduse kaarte nukleosoomi kristallstruktuuri uurimisel.



Joonis 2. Konna (ülemine rida) ja pagaripärmi (alumine rida) histoonide järjestuse võrdlus. Liikide vahel erinevad aminohapped on värvitud roosaks. Iga kümnes aminohape on märgitud musta ringiga (*X.laevis*) või roosa ringiga (*S.cerevisiae*). Struktureeritud regioonides asetsevad α -heeliksist ja lingud on näidatud spiraalina ja histoonide painduvad sabad katkendjoonena. (White et al, 2001).

Histoonid paiknevad nukleosoomis antiparalleelsete dimeeridena – H3/H4 (Joonis 1A) ja H2A/H2B. Eukariootse nukleosoomi moodustumine algab 2 H3/H4 dimeeri ühinemisega tetrameeriks, mida hoiab koos tugev nelja heeliksi pundar (*4-helix-bundle*, 4HB) struktuur, mille moodustavad mõlema dimeeri H3 molekulid. 2 H2A/H2B dimeeri lisanduvad H2A-H4 heeliksistest tekkiva 4HB struktuuri kaudu ja sellega tekib histoonide oktameer, mille ümber keerdub 147 ap DNA-d vasakpidise heeliksina. HFD- piirkonnad seovad 121 ap DNA-d – iga HFD paar (pool H3/H4 tetrameerist või H2A/H2B dimeer) on seondunud 27-28 ap DNA-ga, mille vahel on 4 ap pikkused linkerid. Põhiliseks kompleksi kooshoidvaks jõuks on vesiniksidemed DNA selgroo ja histoonide HFD regioonide vahel, histoonide „sabad“, mis ulatuvad DNA vagude vahelt läbi nukleosoomist välja, ei oma olulist rolli kompleksi

stabiliseerimisel mononukleosoomis. Histooni H4 N-terminaalne ala (aminohapped 1-25) seondub teise nukleosoomi H2A/H2B dimeeri pinnal oleva happelise piirkonnaga. See interaktsioon on arvatavasti seotud DNA kõrgemate struktuuride moodustumisega (Luger et al, 1997). DNA ahela ja histoonide oktameeri vahelised interaktsioonid teevad nukleosoomist ühe kõige stabiilsema valk – DNA kompleksi. Nukleosoom on põhiline DNA ligipääsetavuse determinant rakus. Tänu stabiilsusele on nukleosoom hästi sobiv DNA pakkimiseks, kuid lisaks staatilisele funktsioonile omab ta ka funktsionaalset rolli.

Lisaks „kanoonilistele” histoonidele, mille geenid paiknevad genoomis järjestkordustena ja mille ekspressioon on tihedalt seotud DNA replikatsiooniga, esineb ka pea kõigis eukarüootides histoonide alternatiivseid variante, mis on enamasti genoomis üksikute, konstitutiivselt ekspresseeritud geenidena. Sellised variandid on H3 teisendid tsentromeerne histooni variant H3 (CenH3, inimeses CENP-A, pagaripärmis Cse4) ja H3.3 ning H2A variandid H2A.Z (Htz1 pagaripärmis) ja H2A.X. Htz1-d sisaldavad nukleosoomid asuvad mõlemal pool nukleosoomivaba piirkonda paljudes promootorites (Pokholok et al, 2005). Tsentromeeri spetsiifilised histooniteisendid CenH3, millel on palju erinevaid variante erinevates liikides, on vajalikud kinetohoori moodustumiseks rakkude jagunemisel (Dawson et al, 2007). Erinevad CenH3 variandid jagavad HFD motiivis 50-60% ulatuses järjestust H3-ga, kuid N-terminaalses sabas sarnasusi ei ole (Malik & Henikoff, 2003). Arvatavasti on DNA pakitud ümber tsentromeersete histoonide parempidiste pööretega ning selletõttu on kondenseerumine kanoonilistesse kromatiini pakkimisstruktuuridesse takistatud. Nii tekib muutunud sümmeetriaga nukleosoomide tasapind, millele saab assambleeruda kinetohoori kompleks. Suuremad või väiksemad erinevused kanooniliste histoonide primaarjärjestusega võrreldes võimaldavad histoonide teisendite abil muuta nukleosoomide kuju ja kromatiini kõrgemate struktuuride moodustumist ning seoses sellega mängivad histoonide variandid erinevaid rolle paljudes protsessides, nende seas DNA parandamises, meiootilises rekombinatsioonis, kromosoomide segregatsioonis, transkriptsiooni initsiatsioonis ja terminatsioonis, sugukromosoomide kondenseerumises ja spermi kromatiini pakkimises (Talbert & Henikoff, 2010).

Histoonide oktameerist ja DNAs-st koosnevad nukleosoomi südamikud esinevad 160-240 ap vahega kõigis eukarüootsetes genoomides. Nukleosoomi südamike vahelist DNA-d nimetatakse linkerDNA ja selle pikkus on 8-114 ap olenevalt liigist, rakutüübist ja/või kromosoomi piirkonnast. Kõrgemates eukarüootides on linkerDNAGA seotud histoon H1, mis

moodustab koos nukleosoomi südamiku ja linkerDNA-ga kromatiini põhilise kordusühiku – nukleosoomi.

Pagaripärmi ja kõrgemate eukarüootide genoomid on väga erinevad. Pärm on ainurakne organism, mille genoom on väike ning sisaldab väga vähe mittekodeerivat DNA-d. Erinevalt väikesest protsendist aktiivselt transkribeeritavatest geenidest kõrgemates eukarüootides on suur osa pärmi genoomist pidevalt transkriptsioonile avatud. Pärmis on nukleosoomide tihedus suurem – kordusühiku pikkuseks on 156-172 ap (Horz & Zachau, 1980), mille tõttu on linkerDNA ainult 15-30 ap. Pärmis on leitud geen *HHO1* (Landsman, 1996), mis kodeerib linkerhistoonide homoloogi Hho1p, kuid selle funktsioonid *in vivo* ei ole selged. On näidatud, et *HHO1* deleteerimine ei ole letaalne ning see ei põhjusta kasvu- või paaritumise defekte ning ei muuda telomeerset vaigistamist, basaalselt transkriptsiooni repressiooni ega suurenda kromatiini kordusühiku pikkust (Patterton et al, 1998).

Histooni oktameeri üldine struktuur ja DNA-valgu interaktsioonidega seotud aminohappejäägid on kõrgelt konserveerunud eukarüootide hulgas, kuigi erinevusi primaarjärjestuses erineb (Joonis 2). Pagaripärmi ja konna histoonide primaarjärjestuste erinevused on kõige suuremad histoonide H2A ja H2B „sabade” vahel, samas erinevused H3 ja H4 „sabade” vahel on üksikutes positsioonides (White et al, 2001). Suurimaks erinevuseks kristallstruktuuris on konnas esineva kahe nukleosoomi vahel H4 N-terminaalse piirkonna ja H2A/H2B dimeeri happelise pinna vahelise interaktsiooni puudumine pärmis. Kuna H4 N-terminaalse piirkonna järjestus on kõrgelt konserveerunud konna ja pagaripärmi vahel erinevalt H2A ja H2B N-terminaalsest alast, siis on H4 ja H2A/H2B vahelise interaktsiooni puudumise põhjuseks väikesed muutused H2A/H2B dimeeride vahelises asetuses. Pärmis nukleosoomide omavaheline asetus kristallides ja kristallide stabiilsus erineb konna nukleosoomide kristallidega võrreldes ja see võib peegeldada nukleosoomide erinevusi *in vivo*, mis võib tuleneda genoomide organisatsiooni ja transkribeeritava ala paigutuse erinevustest organismide vahel (White et al, 2001).

Histoonide paigutamine DNA-le toimub kahel viisil – DNA replikatsioonist sõltuvalt (*replication dependent* – RD) või sõltumatult (*replication independent* – RI). Uued histoonide valgud sünteesitakse rakutsüklis S-faasi ajal kui toimub DNA replikatsioon. Histoonide paigutamine DNA-le ja nukleosoomide moodustumine on kontrollitud protsess, mida viivad läbi histoonide chaperonid. Pärast sünteesi atsetüleeritakse histoonid kiirelt histoonide atsetüültransferaaside (HAT) poolt, mis katalüüsivad atsetüülgrupi ülekannet atsetüül-

koensüüm A-lt lüsiini ϵ -aminorühmale histoonides. Kohe pärast DNA-le paigutamist histoonid deatsetüleeritakse histoonide deatsetülaaside (HDAC) poolt ning hiljem nad reatsetüleeritakse uute mustritega tagamaks histoonide vahendatud funktsioonide korrektset realiseerumist (Shahbazian & Grunstein, 2007). Replikatsioonist sõltumatu histoonide paigutamine DNA-le toimub pidevalt raku elutsükli käigus. See on vajalik näiteks kromatiini struktuuri taastamiseks pärast histoonide eemaldamist transkriptsiooni käigus või histoonide teiseid sisaldavate nukleosoomide paigutamiseks DNA-le.

Kromatiini struktuuril on 2 põhilist funktsiooni: DNA pakkimine ning DNA ligipääsetavuse reguleerimise platvormiks olemine.

Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid

Võimaldamaks paljude protsesside reguleerimist histoonide poolt, modifitseeritakse neid post-translatsiooniliselt väga mitmel moel – on leitud atsetüleerimist, metüleerimist, fosforüleerimist, ubikvitinüleerimist, sumoüleerimist, ADP ribosüleerimist, deiminatsiooni ja proliini isomerisatsiooni (Kouzarides, 2007) (Joonis 3). Modifikatsioone viivad läbi spetsiifilised ensüümid: histoonide metüültransferaasid (HMT), histoonide demetülaasid (HDM), histoonide atsetüültransferaasid (HAT), histoonide deatsetülaasid (HDAC), ubikvitilaasid ja fosforülaasid (Lee & Young, 2000).

Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid (PTM) mõjutavad väga paljusid rakulisi protsesse kromatiini struktuuri muutmise ning erinevate kromatiiniga seonduvate valkude seondumise reguleerimise kaudu. Histoonide PTM-id muudavad nukleosoomide laengut (metüleerimine välja arvatud), mis võib nõrgendada DNA-histoonide interaktsioone või nukleosoomide vahelisi interaktsioone.

On näidatud, et atsetüleeritud histoonide eemaldamine DNA-lt kromatiini modifitseerijate poolt on lihtsam nii *in vitro* (Ito et al, 2000) (Chandy et al, 2006) kui *in vivo* (Reinke & Horz, 2003) (Zhao et al, 2005). Histoonide modifikatsioone (üksikuid või nendest moodustunud mustreid) tunnevad ära teised valgud, mis mõjutavad kromatiini dünaamikat ja funktsioone (Kouzarides, 2007). Konkreetse modifikatsiooni mõju võib olla erinev ja sõltuda efektorist ja äratundmise kontekstist.

Uurides võrdlevalt histoonide H3 ja H4 PTM-de mustrit pagaripärmi, *T. thermophila*, hiire ja inimese rakkudes leidsid Garcia jt, et H3 sisaldab keerulisemat PTM mustrit nii

[illegible]

Mõned modifikatsioonid mõjutavad otseselt kromatiini kõrgemate struktuuride moodustumist. Näiteks H4K16 atsetüleerimine takistab nukleosoomide kompaktsit kokkupakkimist ning 30 nm kiu (*fiber*) sarnase struktuuri moodustumist *in vitro* (Shogren-Knaak et al, 2006). Samas on leitud ka, et H4K16 atsetüleeritus aeglustab histooni *chaperon* ACF vahendatud nukleosoomide liigutamist DNA-l *in vitro*. Seega võib üks histooni modifikatsioon mõjutada ühte ja sama protsessi mitmel erineval moel.

13

positsioonide modifitseerimist *cis* ehk samal histoonil või *trans* ehk mõnel teisel histoonil. *Trans*-toimiva raja näiteks on 2 histooni H3 positsiooni metüleerimine erinevate ensüümide poolt, mis mõlemad vajavad seondumist H4 N-terminusega. HMT Set2 vajab seondumist H4 N-terminaalse piirkonnaga (seondumiseks oluline on K44 atsetüleeritus), et tagada histooni H3 K36 metüleerimine, mis on oluline modifikatsioon transkriptsiooni elongatsioonis (Du et al, 2008). Katsed HMT Dot1-ga näitasid, et H3K79 edukaks metüleerimiseks ning telomeerseks vaigistamiseks on vajalik Dot1 seondumine H4 N-terminaalse aluselise piirkonnaga 16-20 (Fingerman et al, 2007).

Histoonide ubikvitinüleerimine

Ubikvitiini lisamine sihtmärkvalgule võib viia väga erinevate võimalike tagajärgedeni. Neist kõige paremini iseloomustatud on lagundamine 26S proteasoomi poolt, mis tunneb ära polüubikvitiin ahelaid ning lagundab proteolüütiliselt seda märgist kandva valgu. Vastupidiselt polüubikvitinüleerimisele on ühe ubikvitiini lisamine signaaliks, mis viib sihtmärkvalgu funktsiooni, transpordi ja/või protsessimise reguleerimiseni (Pickart, 2001).

Histooni H2B monoubikvitinüleerimine pagaripärmis positsioonis K123 (K120 imetajates) on transkriptsiooni aktivatsiooni üldine märg ja see on levinud nii geenide promootoris kui kodeerivas piirkonnas (Kao et al, 2004). H2B ubikvitinüleerimise promootoril ja kodeerivas regioonil viib läbi Rad6/Bre1/Lge1 kompleks ning selleks on vajalik PAF kompleks ning teiste elongatsioonifaktorite ning Pol II olemasolu. Kõrgemates eukarüootides toimub monoubikvitinüleerimine ka histooni H2A positsioonis K119 ja esineb transkriptsiooniliselt represseritud geenide promootorpiirkondades (Weake & Workman, 2008).

Histoonide metüleerimine

Histoonides esineb lüsiinide ja arginiinide metüleerimist. Arginiinile saab lisada ühe või kaks metüülrühma. Lüsiinile saab lisada ühe, kaks või kolm metüülrühma ning need erinevad metüleerituse astmed võivad omada erinevaid funktsioone. Arvatakse, et histooni metüleerimisel ei ole olulist struktuurilist rolli, vaid pigem on see seondumiskohaks

valkudele, mis sisaldavad metüülgruppe siduvaid domeene (näiteks kromodeenid, PHD (*plant homodomain*) ja tudor domeenid) (Daniel et al, 2005).

Punguvas pärmis on leitud metüülühmi ainult vähestes positsioonides: H3K4, H3K36 ja H3K79. Poolduvas pärmis ja kõrgemates eukarüootides on leitud mitmeid teisi metüleeritud aminohappejääke nagu H3K9, H3K27 ja H4K20. Positsioonide H3K4, H3K36 ja H3K79 metüleerimist seostatakse aktiivse transkriptsiooniga (Liu et al, 2005). Metüleeritud H3K9 poolduvas pärmis ning H3K27 kõrgemates eukarüootides on seotud geenide vaigistamise ja heterokromatiini moodustumisega (Fuchs et al, 2009). Lüsiinide metüültransferaasid on kõrge spetsiifikaga – igaüks neist metüleerib vaid ühte kindlat sihtmärklüsiini. Selle põhjuseks võib olla vajadus metüleerimist täpsemalt reguleerida, kuna metüüllüsiinid on paljude seonduvate valkude äratundmismotiiviks ning seetõttu on metüleerimisreaktsiooni täpne kontroll vajalik. Metüülühmi eemaldavad histoonidelt lüsiinide demetülaasid (HDM).

H4K20 metüleerimine

Histooni H4 lüsiini 20 (H4K20) metüleerimine oli üks esimesi histoonide posttranslatsioonilisi modifikatsioone, mis on avastatud (Murray, 1964). H4K20 võib olla mono-, di- või trimetüleeritud *in vivo* ning kõik kolm metüleeritud vormi on evolutsiooniliselt konserveernud *Schizosaccharomyces pombe*'st kuni inimeseni (Yang & Mizzen, 2009). Mass-spektromeetria uuringuga leiti vähesel määral H4K20 mono- ja dimetüleerimist ka pagaripärmis, kuid H4K20me puudub *Tetrahymena thermophila*'s (Garcia et al, 2007). *Schizosaccharomyces pombe*'s viib H4K20 metüleerimist läbi Set9/KMT5 (mono-, di- ja trimetüleeritus esineb võrdsel hulgal) ning H4K20me on seotud DNA kahjustusele reageerimisega (Sanders et al, 2004). Kõrgemates eukarüootides esineb mitmeid ensüüme, mis on seotud H4K20 erineva metüleerimisega ning mono-, di- ja trimetüleeritud H4K20 omab erinevaid levikumustreid genoomis ning võimalikke erinevaid funktsioone. Sarnaselt pärmile on H4K20me2 seotud DNA kahjustuste parandamisega, olles parandamisega seotud valgu 53PB1 seondumiskohaks (Yang et al, 2008). H4K20me3 esineb nukleosoomides koos H3K9 trimetüleerimisega ning on seotud peritsentromeerse heterokromatiini leviku ja säilitamisega (Schotta et al, 2004). H4K20me1 rollid on vähem selged, kuid on teada, et selle märke või seda läbiviiva ensüümi PR-Set7/Set8/KMT5a puudumine põhjustab DNA kahjustusi, kromatiini kondenseerumise ja kromosoomide segregatsiooni defekte ning varast

embrüonaalset letaalsust enne 8-rakulist staadiumi (Oda et al, 2009). Uurides H4K20me1 paiknemist inimese 21. ja 22. kromosoomis leiti selle märke esinemist paljudes erineva ekspressioonitasemega geenides (põhiliselt geeni esimeses pooles). H4K20 monometüleerimist läbiviiv PR-Set7 deleteerimise järel tõusis nende geenide transkriptsiooni tase 2 korda sõltumata geeni algsest ekspressioonitasemest. Selgus, et kloneerides H4K20me1-ga seotud DNA järjestusi reportervektoris vähenes reporteri ekspressioon 2 korda (Congdon et al, 2010). Seega on võimalik, et H4K20me1 kaudu võib toimuda geeni doosi reguleerimine, kus üks alleel on represseritud H4K20me1-ga seotud mehhanismi abil. On leitud, et H4K20 metüleerimise puudumine on mitmete vähkkasvajate tunnuseks (Fraga et al, 2005).

Histoonide atsetüleerimine

Histoonide atsetüleerimist seostatakse üldiselt transkriptsiooni aktiveerimisega. Lüsiini atsetüleerimine muudab selle aminohappe keemilisi omadusi (positiivse laenguga aluseline lüsiin muudetakse laenguta atsetüüllüsiiniks). Kromatiini kontekstis on näidatud, et atsetüleerimine vähendab nii histoon-DNA (Lee et al, 1993) kui nukleosoomide vahelisi kontakte (Wang & Hayes, 2008). Destabiliseeritud nukleosoomidega kromatiin on sihtmärgiks nii kromatiini remodelleerijatele kui paljudele DNA või atsetüleeritud histoonidega seonduvatele valkudele, mis on seotud transkriptsiooni, DNA parandamise ja teiste protsessidega. Histoonides ja teistes valkudes esinevaid atsetüleeritud lüsiine tunneb ära bromodomeen.

Geenide regulatsioonis toimub histoonide atsetüleerimine kahel viisil. Esiteks toimub HAT-de ja HDAC-e värbamine geenide regulaatorsetele piirkondadele transkriptsiooni aktivaatorite ja repressorite poolt. Teiseks toimub HAT-de ja HDAC-de poolt pidev histoonide atsetüleerimine ja deatsetüleerimine globaalsel ja reguleerimata viisil üle kogu genoomi, kus nende lokalisatsioon ja aktiivsus ei ole täpselt kontrollitud teiste valkude poolt. Nii sihipärane kui globaalne atsetüleerimine/deatsetüleerimine reguleerivad geenide aktiivsust (Shahbazian & Grunstein, 2007).

Histoonide atsetüültransferaasid võivad olla väga kitsa või laia substraadispetsiifikaga – näiteks Gcn5(Kat2) atsetüleerib histooni H3 lüsiine K9, K14, K18, K27 ja K36 (Grant et al, 1999). HAT ja HDAC ensüümid ei tööta tavaliselt üksi, vaid kuuluvad suurematesse

valgukompleksidesse, mis on seotud kromatiini modifitseerimise ja transkriptsiooni reguleerimisega. Kaks enam uuritud HAT-aktiivsusega kompleksi pärmis on näiteks SAGA (Grant et al, 1997) ja NuA4 kompleksid (Galarneau et al, 2000). Teised kompleksi kuuluvad valgud mõjutavad HAT ja HDAC substraadi spetsiifikat ja sihtmärk lüsiini positsiooni, mis lõpptulemusena mõjutab nende ensüümide efekti rakulistele protsessidele.

Histooni H4 K5, K8 ja K12 atsetüleerimine

Paljudes eukarüootides (*tetrahymena*, äädikakärbses ja inimeses) on vast-sünteesitud histoonis H4 atsetüleeritud lüsiinid positsioonides H4K5 ja H4K12 (Sobel et al, 1995). Pärast DNA-le paigutamist toimub kiiresti H4K20 monometüleerimine, mis on vajalikuks eeltingimuseks kiirele H4 saba deatsetüleerimisele (Scharf et al, 2009).

Pärmis on kromatiini moodustumiseks vajalik histoonide atsetülatsiooni muster suure ülekattega – ükski modifikatsioon ei ole kriitilise tähtsusega, vaid on asendatav mõne teise modifikatsiooni poolt. Nukleosoomi moodustumine *in vitro* või *in vivo* toimub ka juhul kui H3 või H4 saba puudub. Lisaks ei ole ükski H4 terminaalne lüsiin hädavajalik - ka juhul kui K5 ja K12, mis on atsetüleeritud nukleosoomi moodustumisel paljudes eukarüootides, on muteeritud ja H3 saba puudub, toimub nukleosoomi moodustumine edukalt. Vaid kõigi kolme N-terminaalse lüsiini (K5, K8, K12) muteerimine takistab nukleosoomi moodustumist. See näitab, et ka K8 võib olla vajalik K5 ja K12 puudumisel. Huvitav on asjaolu, et H4K16 atsetüleerimine ei asenda K5, K8 ja K12 puudumist. Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et K16 ei ole atsetüleeritud uutes histoonides ning ei ole uusi histoone nukleosoomiks assambleeriva chaperoni äratundmismotiivi osaks (Ma et al, 1998). On näidatud, et K12 atsetüleerimine on vajalik K5 efektiivseks atsetüleerimiseks ning K5 atsetüleerimine väheneb järsult mitoosi ajal (Sasaki et al, 2009).

Histoonide hüperatsetüleerimine mõjutab individuaalse nukleosoomi omadusi väga vähe, kuid suurendab proportsionaalselt atsetüleeritud lüsiinide arvuga RNA polümeraasi transkriptsiooni ja takistab kromatiini organiseerumist 30 nm kiu struktuuri *in vitro* (Tse et al, 1998). Histoonide sabad, milles enamik lisatud atsetüülrühmi paikneb, seonduvad eelistatult linker DNAGA kui nukleosomaalse DNA-ga ning see seondumine nõrgeneb atsetüleerimise mõjul (Angelov et al, 2001) (Mutskov et al, 1998). Seega viib atsetüleerimine kromatiini kiu

avanemisele arvatavasti nukleosoomide vahelisi kontakte ja histoonide sabade ning linkerDNA vahelisi kontakte vähendades.

H4 K5, K8 ja K12 rolli kohta transkriptsioonis ei ole teada väga palju. Uurides H4 K8 ja K12 atsetülatsiooni tasemeid erinevates genoomi lookustes pagaripärmis, selgus, et K8 ja K12 on atsetüleeritud samal määral paljudes genoomipiirkondades, nii kodeerivas alas kui geenidevahelises alas (Kurdistani et al, 2004). Uurides geenikiibi abil geeniekspressiooni muutumist tüvedes, kus olid muteeritud lüsiin 5, K8, K12 arginiiniks või kasutati nende mutatsioonide kombinatsioone, selgus, et üksikute mutatsioonide mõju on väga sarnane – geenid, mille ekspressiooni taset mõjutas K5 muteerimine, olid sarnaselt mõjutatud ka K8 või K12 muteerimise poolt (Dion et al, 2005).

Histooni H4 K16 atsetüleerimine

H4 K16 atsetüleerimine on levinud post-translatsiooniline modifikatsioon, mida seostatakse transkriptsiooniliselt aktiivse kromatiiniga. Pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* on üle 80% histoonidest atsetüleeritud selles positsioonis (Smith et al, 2003) ja eukromatiinsetes piirkondades on see märge suure sagedusega (Suka et al, 2002) (Kimura et al, 2002). Pärmis on H4 K16 atsetülatsiooni vahendajaks põhiliselt HAT Sas2 (Kimura et al, 2002), kuid ka HAT Esa1 omab teatavat rolli (Suka et al, 2002). H4 K16 deatsetüleerib Sir2 (Imai et al, 2000).

Kõrgemates eukarüootides ei ole H4 K16 atsetüleerimine sama valdav kui pärmis, kuid võib esineda suure tihedusega kindlates regioonides. Puuviljakärbses *Drosophila melanogaster* on meesisendite X kromosoomi histoonid väga tugevalt atsetüleeritud selles positsioonis (Turner et al, 1992). Selle modifikatsiooni viib läbi H4K16 spetsiifiline ja Sas2-ga homoloogne HAT MOF ning selle ensüümi aktiivsus on vajalik isaste kärbsede X kromosoomi geenide transkriptsiooni kahekordistamiseks doosi kompensatsiooni käigus (Hilfiker et al, 1997) (Akhtar & Becker, 2000). Üheski inimese kromosoomis ei ole H4K16 nii ulatuslikult atsetüleeritud. Inimese organismis leiduv MOF-i homoloog hMOF on põhiliselt vastutav H4K16 atsetüleerimise eest (Smith et al, 2005). On näidatud, et H4K16 atsetüleerimismärgise tugev vähenemine või puudumine on mitmete vähivormide (leukeemia, lümfoom, käärsoole adenokartsinoom jt) tunnuseks (Fraga et al, 2005).

H4K16 atsetüleerimine takistab kromatiini modelleerimist ISWI kompleksi poolt nii *in vitro* kui *in vivo* (Corona et al, 2002). Nukleosoomi äratundmiseks ISWI poolt on vajalik H4 saba, eriti hüdrofiilne piirkond R17H18R19, mis seondub DNA-ga. H4K12 ja H4K16 atsetüleerimine muudab ISWI äratundmise motiivi struktuuri ning seetõttu vähendab ISWI seondumise efektiivsust ning kromatiini modelleerimist (Clapier et al, 2002). See mehhanism on üks kahest osast isaste äädikakärbest X-kromosoomi doosikompensatsioonis. Nimelt on seal tegemist keerulise tasakaaluga, kus ühelt poolt H4K16 atsetüleerimine soodustab transkriptsiooni takistades kromatiini tihedalt pakitud kiudude moodustumist ning kromatiini modelleerimist ISWI poolt, teisalt on ISWI osaline funktsioneerimine vajalik X-kromosoomi katastroofilise dekontenseerumise vältimiseks.

H4 K16 atsetüleerimise mõju kromatiini struktuurile

Histooni H4 aminotermine atsetüleerimine on tähtis faktor, mis oluliselt mõjutab kromatiini võimet kõrgema struktuure moodustada *in vitro*. Nukleosoomi kristallstruktuurist on näha, et histooni H4 N-terminaalses sabas on aluseliste aminohappejääkide rikas piirkond (positsioonides 16-25), mis moodustab palju vesiniksidemeid ja polaarseid interaktsioone kõrvaloleva nukleosoomi H2A/H2B dimeeril oleva happelise piirkonnaga (Luger et al, 1997). On näidatud, et histoonide tugev atsetüleeritus muudab nukleosoomide temperatuur-sõltuva denaturatsiooni profiili ning selle efekti saavutamiseks piisab ainult H4 atsetüleerimisest (Siino et al, 2003).

Uurides nukleosoomide võimet *in vitro* iseeneslikult moodustada tihedamalt pakitud struktuure leiti, et histoonide sabadest ainuke olulise tähtsusega on H4 N-terminus ning kriitilise tähtsusega selle piirkond 14-19 (Dorigo et al, 2003). H4K16 atsetüleerimine põhjustab H4 terve saba deleteerimisele sarnast efekti nukleosoomide kokkupakkumisel. Lisaks takistab H4K16 atsetüleerimine kromatiini 30 nm kiu sarnase struktuuri moodustumist *in vitro* (Shogren-Knaak et al, 2006). Seega on H4K16 atsetüleeritus kromatiini *in vitro* kokkupakkimise kriitiline determinant.

Histoonide atsetüleerimine omab mitmetahulist rolli kromatiini kondenseerumise regulatsioonis. Atsetüleerimine soodustab avatumat kromatiini konfiguratsiooni nukleosoomide vahelisi interaktsioone vähendades, soodustades linkerDNA vabanemist

histoonide sabade küljest ning kromatiini kiudude vahelisi seondumisi nõrgendades. Olgugi et H4K16 atsetüleerimisel on tugev mõju kromatiini struktuurile *in vitro*, ei ole protsessi reguleerivaid histooni modifikatsioone *in vivo* kindlaks määratud.

H4 K16 atsetüleerimise seos heterokromatiiniga

Heterokromatiinne geenide vaigistamine toimub *S. cerevisiae*-s mitmes piirkonnas: ribosomaalse DNA lookustes, paardumistüübi lookustes (*HMR* ja *HML*) ning telomeersetes piirkondades (Rusche et al, 2003). Igas heterokromatiinses piirkonnas on unikaalne järjestus, millest vaigistamine algab ning levib sellest edasi kogu regiooni. Pärmi telomeerides määrab eukromatiini ja heterokromatiini piiri histoonide atsetüleerimise ja deatsetüleerimise tasakaal (Kimura et al, 2002) (Suka et al, 2002). Heterokromatiinse struktuuri levimiseks on vajalikud Sir (*Silent information regulator*)-valgud, mis seonduvad vaigistavatele järjestustele paardumistüübi lookustes ning telomeeride otstes. H4K16 atsetüleerimine Sas2 poolt takistab Sir2 seondumist ning sellele järgnevat mitmete lüsiinide deatsetüleerimist histoonides H4 ja H3 ning vaigistatud struktuuri levikut. H4K16 muteerimine arginiiniks või Sas2 deleteerimine soodustavad heterokromatiinse struktuuri levikut tavalistest piiridest kaugemale kodeerivasse järjestusse ning seal asuvate geenide vaigistamist. Vastupidiselt eukromatiinsetele geenidele ei toimu heterokromatiinis asuvate geenide vaigistamine ainult „upstream“ regulaatorjärjestustele seonduvate faktorite poolt, vaid ka nende geenide piirkonnas tekkiv spetsiifiline kromatiini struktuur on transkriptsiooni tugevalt takistav (Chen & Widom, 2004).

H4K20 atsetüleerimine

H4K20 atsetüleerimist on vähesel määral leitud histoonide uurimisel mass-spektromeetria abil, kuid selle funktsioonidest ei ole midagi teada (Garcia et al, 2007).

Kromatiini remodelleerijad

Kromatiini remodelleerijad valkude kompleksid, mis kasutavad ATP hüdroolüüsi energiat kromatiini struktuuri muutmiseks nukleosoomide liigutades, eemaldades või restruktureerides. Modelleerijad tegutsevad koos teiste kromatiiniga seotud faktoritega kontrollimaks kromatiini kokku ja lahtipakkimist, et kindlustada reguleeritud ligipääs kromosomaalsete protsessidega seotud DNA elementidele (enhanserid, promootorid, replikatsiooni alguspunktid), mis on vajalik paljudes raku elutegevusega seotud protsessides nagu geenide transkriptsioon, DNA replikatsioon, parandamine ja rekombinatsioon.

Remodelleerijad on vajalikud genoomi täielikuks pakkimiseks, kromatiini regioonide spetsialiseerimiseks ja reguleeritud DNA ligipääsu tagamiseks tihedalt pakitud piirkondades.

Remodelleerijatel on kolm põhilist funktsiooni:

- 1) Kromatiini organiseerimine (nukleosoomide ühtlane paigutamine DNA-l)
- 2) Kromatiini ligipääsu reguleerimine (nukleosoomide liigutamine DNA-l või nukleosoomide eemaldamine)
- 3) Kromatiini restruktureerimine (histooni teisendite paigutamine kromatiini regioonide spetsialiseerimiseks)

Geenide ekspressiooni aktiveerimisel on modelleerijate rolliks nukleosoomide liigutamine, restruktureerimine või eemaldamine DNA avamiseks, et võimaldada reguleerivate faktorite seondumist upstream enhanseritele või lihtsustada transkriptsioonifaktorite seondumist promootoritele nukleosoomi vaba piirkonna suurendamise kaudu.

Kromatiini modelleerivate kompleksid kasutavad ATP hüdroolüüsi energiat histoonide ja DNA vaheliste kontaktide muutmiseks ning nende komplekside ATPaas-i subühikud kuuluvad SWI/SNF perekonda, mis on osa helikaaside ja translokaaside superperekonnast SF2. Kromatiini modelleerijad jagunevad 4 gruppi: SWI/SNF, ISWI, CHD ja INO80 (Clapier & Cairns, 2009).

Kõigil remodelleerijatel on 5 ühist omadust: (a) afiinsus nukleosoomse struktuuri, mitte ainult DNA suhtes; (b) histoonide modifikatsiooni äratundvad domeenid; (c) ATPaas-i domeen, mis on vajalik remodelleerimiseks ja toimib DNA-d translokeeriva mootorina histoon-DNA kontaktide; (d) domeenid ja/või valgud, mis reguleerivad ATPaas-I domeeni;

(e) domeenid ja/või valgud seonduvad teiste kromatiini või transkriptsioonifaktoritega. (Cairns, 2009).

Remodelleerijad on DNA translokaasid, mis seonduvad histooni oktameerile ning liigutavad DNA-d lingude kaupa ümber nukleosoomi, muutes nii histooni oktameeri asukohta DNA-l.

Remodelleerijate kompleksides olevad mittekatalüütilised subühikud võivad reguleerida ATPaasset aktiivsust ja/või mõjutada remodelleerimise reaktsiooni japrodukte. ISWI perekonna remodelleerijad sisaldavad tihti subühikut, mis reguleerib ATPaasset aktiivsust linker DNA-ga seondumise kaudu, ning võib sel viisil võimendada ja laiendada ISWI-perekonna modelleerijate iseloomulikku võimet nukleosoomide vahekaugusi muuta ning selle kaudu kromatiini kõrgemate struktuuride moodustumist mõjutada. Teised subühikud võivad näiteks parandada remodelleerijate DNAGA seondumise efektiivsust ja selle kaudu suurendada nukleosoomide nihutamist.

Kromatiini reguleerijad on seotud paljude rakuliste protsessidega. Pärms on SWI/SNF perekonda kuuluv RSC kompleks seotud tsentromeeri piirkonna nukleosoomidega ning edendab kinetohoori moodustumist ning kromosoomide lahknemist (Hsu et al, 2003). Hulkraksetes organismides mõjutavad kromatiini remodelleerijad kehapooluste kujunemist, kudede diferentseerumist ja organite arengut. Geenid, mis vastavad või saadavad embrüogeneesi ajal morfogeenseid signaale erinevates piirkondades, vajavad remodelleerijad regulatsiooni täpseks kontrolliks (Clapier & Cairns, 2009; Yuan et al, 2005).

Üldiselt on repressiivsete remodelleerijate ülesandeks kromatiini piirkondade kõrgemate struktuuride moodustumise soodustamine ning selle kaudu DNA ligipääsetavuse vähendamine, DNA-ga seotud faktorite eemaldamine ja repressiooniga seotud kromatiini modifitseerijate kaasamine. Pagaripärms kaasab repressiivse modelleerija ISW2 paljudele promootoritele yUme6 repressor ja nukleosoomide organiseerija Ssn6-Tup1 (Goldmark et al, 2000) ning on kaasatud transkriptsiooni repressiooni koos HDAC valguga RPD3 (Burgio et al, 2008). Samal ajal aitab kromatiini organiseerimine ISW2 poolt ennetada *antisense* transkriptsiooni geenivahelistes piirkondades ning takistab initsiatsiooni krüptilisest initsiatsiooni kohtadest (Whitehouse et al, 2007). Hiire NoRC kompleks on seotud rDNA geenide ekspressiooni regulatsiooniga. NoRC kaasab rDNA promootorile DNA metüültransferaasi ja histoonide modifitseerivad valgud, mille tagajärjel toimub DNA metüleerimine, histoonide deatsetüleerimine ja sellele järgnev histooni metüleerimine positsioonis H3K9, ning selle kaudu soodustab heterokromatiinse struktuuri teket (Santoro et al, 2002). Lisaks on näidatud, et NoRC kompleks omab lisaks valkude kaasamisele ka selget

kromatiini modelleerivat rolli – NoRC liigutab promotooril aktivatsiooniks kriitilise tähtsusega nukleosoomi vastavalt transkriptsiooni takistavasse või soodustavasse asukohta ning selle mehhanismi kaudu otseselt mõjutab geeni transkriptsiooni aktiivsust (Li et al, 2006).

Valke kodeerivate geenide transkriptsiooni initsiatsioon ja elongatsioon

Eukariootides transkribeerib valke kodeerivaid geene RNA polümeraas II (Pol II) kompleks, mille molekulmass ületab 500 kDa ning mis koosneb 12 subühikust. Pol II aktiivsus erinevatel geenidel on täpselt reguleeritud ja see on vajalik rakkude elutegevuseks ning hulkraksete organismide koordineeritud arenguks. Pol II regulatsiooni täpsus on tagatud paljude erinevate transkriptsioonifaktorite (TF) omavaheliste interaktsioonidega ning TF-de ja DNA järjestuse vaheliste interaktsioonidega konkreetsel geenil. Rakkudes esinevad üldised transkriptsioonifaktorid (*general transcription factor*, GTF), mis on vajalikud Pol II kompleksi moodustumiseks ning transkriptsiooniks kõigil promotooritel ning spetsiifilised transkriptsioonifaktorid, mis reguleerivad millal, kuidas ja kui palju konkreetselt geenilt transkribeeritakse.

Eukariootides esinevad promootorid on võimalik jagada kaheks – fokuseeritud (alustatakse ühelt kindlalt nukleotiidilt, enamasti reguleeritud geenid) ja hajutatud promootorid (alustatakse mitmelt nõrgalt alguskohalt 50-100 ap pikkuses alas, enamasti pidevalt ekspresseeritavad geenid). Võib olla ka kombineeritud promootoreid, kus mitme hajutatud alguskoha hulgas on üks tugev alguskoht. Fokuseeritud initsiatsioon toimub kõigis organismides ning on põhiline või ainuke initsiatsiooni viis lihtsamates organismides. Selgroogsetes on umbes 70% geenidest hajutatud promootorid. Fokuseeritud promootorid sisaldavad ühte või mitut DNA järjestusmotiividest nagu TATA box, BREu (*upstream TFIIB recognition element*), Inr (*Initiator*), MTE (*Motif ten element*) jt, millega seonduvad basaalsed transkriptsioonifaktorid. Hajutatud promootorites enamasti ei esine TATA, BRE, DPE ja MTE motiive. Erinevates geenides võib promootor olla nukleosoomidega kaetud või esineb nukleosoomidest vaba piirkond (*nucleosome free region* - NFR). NFR piirkonnas on DNA järjestus AT-rikas ja seetõttu nukleosoomide moodustamine takistatud (Segal et al, 2006). Pärmis esineb paljudes konstitutiivsetes geenides promootori piirkonnas enne

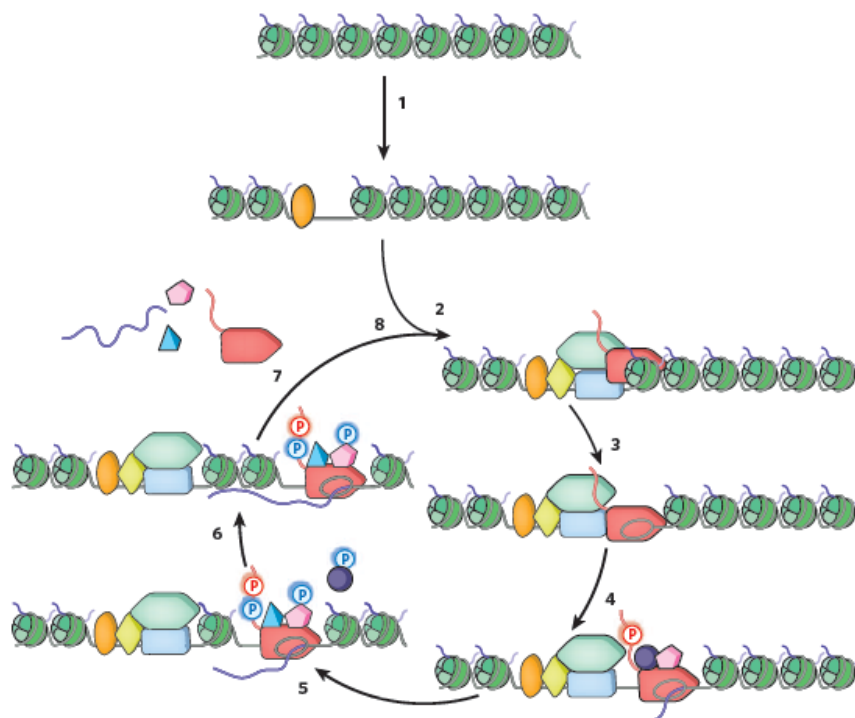
transkriptsiooni alguspunkti (*transcription start site* - TSS) u. 100-200 ap pikkune NFR, millest mõlemal pool asuvad nukleosoomid sisaldavad histooni teisendit Htz.1. Arvatakse, et NFR TSS-i juures võimaldab pre-initsiatsiooni kompleksi (PIC) moodustumist hoolimata geeni transkribeerimise staatusest ning geenide väga kiiret ekspressiooni vastusena keskkonnamuudatustele (Juven-Gershon & Kadonaga, 2010). Paljud NFR-d sisaldavad TF seondumisjärjestusi ning paljudele promootoritele (eriti kõrgemates eukarüootides) on Pol II seondunud (Campos & Reinberg, 2009). Promootori aktiveerumise järel suureneb histoonide atsetüleerimine, toimub nukleosoomide kadu TSS ümbruses ning oluline nukleosoomide liigutamine nii promootoralas kui kodeerivates regioonides (Boeger et al, 2003).

Transkriptsioonitsüklitel (joonis 4) algab aktivaatori seondumisega promootorile ning vajadusel seonduvad aktivaatoriga kromatiini remodelleerijad, mis eemaldavad promootorilt nukleosoomid. Sama või mõne teise aktivaatori seundumine algatab GTF seundumise, koaktivaatorite seundumise ning preinitsiatsioonikompleksi (PIC) moodustumise. Järgneb Pol II seundumine PIC-iga. Seejärel toimub DNA ahelate lahtikeerdumine ning avatud kompleksi moodustumine ja Pol II alustab transkriptsiooni. Pol II eemaldub promootoriga seotud faktoritest, sünteesib 20-50 ap RNA-d ning jääb peatuma promootori lähedal (*promoter proximal pausing*). Pol II peatumises on oluline roll Spt4-Spt6 valkudel ning NELF (*Negative Elongation Factor*) kompleksil (Lee et al, 2008). Kõrgemates eukarüootides on P-TEFb (*Positive transcription elongation factor b*) põhiline Pol II C-terminaalse domääni (CTD) seriin-kinaas, millel on kriitiline roll Pol II kompleksi vabanemisel promootori lähedastest pausist (Ni et al, 2008). Pärast Pol II CTD kordusjärjestuste fosforüleerimist toimub Pol II vabanemine pausist üleminekuga edukale elongatsioonile või termineerumise tõttu. Eduka elongatsiooni ajal toimub pidev nukleosoomide eemaldamine Pol II eest ja nende tagasi asetamine Pol II taha mitmete kromatiini remodelleerijate ja chaperonide poolt. Pärast Pol II kompleksi jõudmist geeni lõppu toimub terminatsioon, RNA vabanemine ja kompleksi lagunemine. Kompleksis osalevad valgud on valmis uueks transkriptsioonitsükliks (Fuda et al, 2009).

Transkriptsiooni jõudmine initsiatsioonist terminatsioonini on väga väikese efektiivsusega protsess – ainult 1% Pol II ja geeni vahelistest interaktsioonidest lõpeb täispika mRNA sünteesiga (Darzacq et al, 2007).

Transkriptsiooni elongatsiooniga on seotud palju valke. Basaalsed elongatsioonifaktorid nagu TFIIF, Elongin ja ELL on vajalikud Pol II edasiliikumiseks, peatunud Pol II lahtipäästmiseks,

sünteesitud RNA järjestuse kontrollimiseks (Selth et al, 2010). Üldine transkriptsioonifaktor TFIIS stimuleerib Pol II endonukleasest aktiivsust, mis on vajalik RNA-st ebakorrektselt sisestatud nukleotiidide eemaldamiseks (Izban & Luse, 1992).



Joonis 4. Transkriptsioonitsüklil on mitmeastmeline protsess. 1 - kromatiini avamine. Mitteaktiivne geen ja selle regulaatorpiirkond on pakitud nukleosoomidesse (rohelistes). Aktivaator (oranž ovaal) seondub ja värbab kromatiini remodelleerijad promootorit vabastama. 2 – PIC moodustumine. Teine aktivaator (kollane romb) seondub, soodustab GTF-de (sinine ristkülik) seondumist ja värbab koaktivaatorid (roheline kuusnurk), soodustades Pol II (punane viit) sisenemist PIC-i. 3 – initsiatsioon. DNA keeratakse lahti (ovaal Pol II sees) TSS-s ja moodustub avatud kompleks. 4 – promootorilt eemaldumine. Pol II katkestab kontaktid promootoriga seotud faktoritega, transkribeerib 20-50 aluspaari TSS-st eemale, sünteesib RNA (lilla joon) ja peatub. Selleks on olulised SPT4-SPT5 (roosa hulknurk) *Drosophila*-s ning negatiivne elongatsioonifaktori (NELF) kompleks. Pol II C-terminuses (CTD) olevad kordusjärjestused fosforüleeritakse positsioonis 5 (Ser 5 – punane P) selles etapis. 5 – pausist pääsemine. P-TEFb (sinine püramiid) värvatakse koaktivaatori poolt otseselt või kaudselt ning see fosforüleerib Ser 2 Pol II CTD-s (sinine P). NELF dissotsieerub kompleksist. Pol II pääseb pausist sisenedes elongatsiooni või termineerudes. 6 – edukas elongatsioon. Nukleosoomide de- ja reassembleeritakse kui Pol II kompleks transkribeerib piki geeni. 7 – terminatsioon. Pärast geeni transkribeerimist eemaldatakse Pol II kompleks DNA-lt ning RNA vabaneb. 8 – ümbertöötlemine. Kompleksist vabanenud faktorid võivad osaleda uues transkriptsioonitsüklis. (Fuda et al, 2009).

Nukleosoomide dünaamika transkriptsiooni elongatsioonis

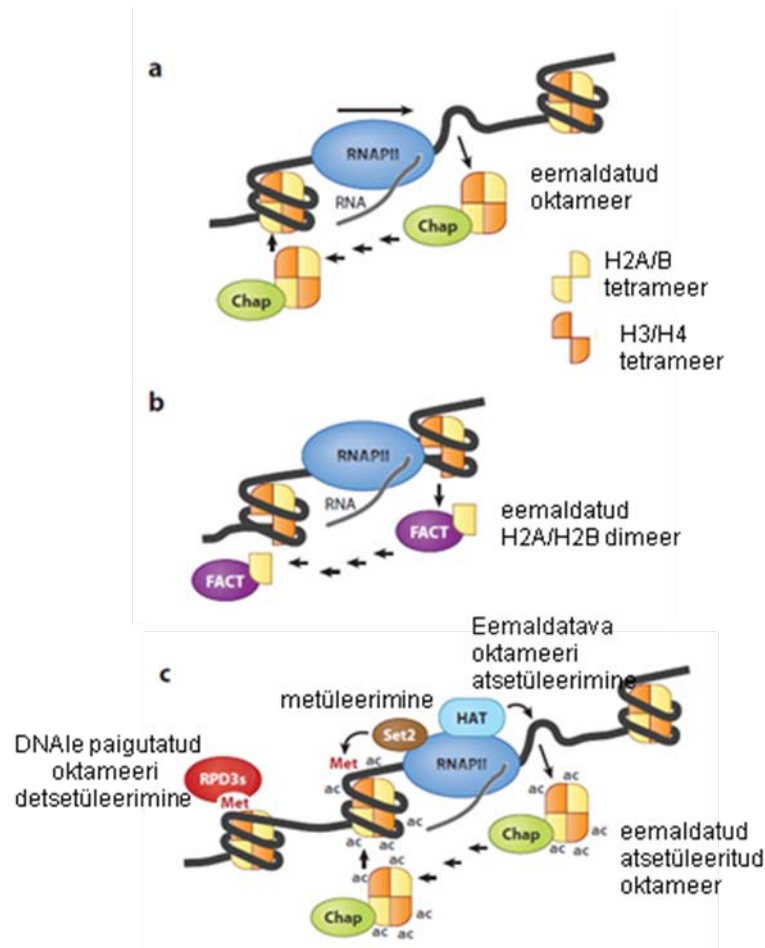
DNA pakkimine nukleosoomidesse takistab Pol II transkriptsiooni tugevalt. Samas ei saa transkriptsiooni elongatsiooni lihtsustamiseks transkribeeritavast piirkonnast nukleosoomide

täielikult eemaldada, sest vabalt DNA-lt toimuks siis valimatu geenisisene initsiatsioon. Võimaldamaks transkriptsiooniks vajalikele valkudele juurdepääs DNA-le ning seeläbi transkriptsiooni edukaks toimumiseks on vajalik kromatiini modifitseerimine, kas histoonide kovalentsete modifikatsioonide abil, kromatiini remodelleerijate abil (Katsani et al, 2003) või histoonide eemaldamise ja ümberpaigutamise teel. Kromatiini struktuuri muutused transkriptsiooni aktivatsioonis viivad nukleosoomide täieliku eemaldamiseni promootoralast (Boeger et al, 2003) ning kõrgelt transkribeeritud geenide kodeerivatest regioonidest (Lee et al, 2004; Schwabish & Struhl, 2004). Nukleosoomide eemaldamine esineb aktiivsematel geenidel ning on proportsionaalne geeni transkribeerimise määraga (Yuan et al, 2005).

Elongeeriva Pol II-ga on seotud mitmed faktorid, mille ülesandeks on DNA kättesaadavamaks muutmine. Praeguse mudeli järgi (Joonis 5) toimub kromatiini modelleerijate ja modifitseerijate koostöös Pol II ees nukleosoomi atsetüleerimine, histoonide oktameeri osaline (ainult H2A/H2B dimeerid) või täielik DNA-lt eemaldamine ning seondumine chaperoniga. Pärast Pol II möödumist paigutatakse histoonide oktameer DNA-le tagasi ning toimub histoonide modifikatsioonimustri muutmine. Transkriptsiooni ajal elongeeruva polümeraasiga kaasa liikuvad HAT-id atsetüleerivad nukleosoomi polümeraasi ees. See põhjustab nukleosoomide osalise või täieliku vabanemise. Histoonid viiakse chaperonidele, mis reassembleerivad nukleosoomid koheselt polümeraasi taga. Elongeeruva polümeraasiga on kaasas ka HMT, mis viib nüüd läbi H3 metüleerimise. Metüleeritud histoonid tunnevad ära histoonide deatsetülaasid, millede töö tulemusena toimub nukleosoomide algse seisundi taastamine (Selth et al, 2010).

Nukleosoomide eemaldamine toimub ebaühtlaselt ja on mõjutatav mitmete faktorite poolt. Histoonide H2A/H2B ning H3/H4 eemaldamine toimub aktiivselt transkriptsiooni ajal, kuid erineva kineetikaga. H2A/H2B eemaldamine toimub sagedamini ning kergemalt. Kuna nukleosoomi moodustumine on astmeline protsess ja esmalt asetatakse DNA-le H3/H4 tetrameer ning seejärel kaks H2A/H2B dimeeri, siis moodustub struktuur, kus H2A/H2B dimeer on kergemini ligipääsetav ning seega ka kergemini eemaldatav (Kimura & Cook, 2001). H2A/H2B eemaldamine toimub polümeraas II-ga kaasa liikuva *chaperoni* FACT (*facilitates chromatin transcription*) abil, mis seondub H2A/H2B dimeeridega ning eemaldab need DNA-lt (Kireeva et al, 2002). H3/H4 eemaldamine on vahendatud *chaperonide* Asf1 (*antisilencing function 1*) ja Hir1 (*histone regulation 1*) poolt. Samuti on olulised *chaperonid* CAF1 (*chromatin assembly factor 1*) (Kim et al, 2007) ja Spt6. Viimane vahendab nukleosoomi reassembleerumist elongatsioonis (Bortvin & Winston, 1996). Transkriptsiooni

lõppedes paigutatakse uued histoonid DNA-le replikatsioonist sõltumatult (Schwabish & Struhl, 2004; Varv et al, 2007). Seda protsessi vahendab histoonide *chaperon* Spt6 ning see protsess on vajalik transkriptsiooni repressiooniks (Adkins & Tyler, 2006).



Joonis 5. Elongatsioon läbi nukleosoomide. (a) Transkriptsioon läbi nukleosoomi viib histoonide eemaldamisele DNA-lt ning nende seondumiseni histoonide chaperonidega (Chap). (b) Transkriptsiooni käigus eemaldatakse suure tõenäosusega ainult H2A/H2B dimeer(id). FACT ja teised chaperonid võivad seonduda vabanenud dimeeriga ning need hiljem nukleosoomi lisada (c) Kotranskriptsiooniline histoonide modifitseerimine. HAT-d, nagu Gcn5 atsetüleerivad histoonid kui Pol II liigub läbi kromatiini. Atsetüleerimine soodustab nukleosoomide eemaldumist DNA-lt ning histoonide juhatamisega chaperonide poolt. Pärast oktaameeri tagasipanemist DNA-le metüleeritakse atsetüleeritud histoonid Set2 poolt, mis on seotud elongeeruva Pol II fosforüleeritud CTD-ga. Metüleerimine viib HDAC kompleksi Rpd3 värbamiseni, mis algse, deatsetüleeritud seisundi taastamisele. Ac – atsetüülrühm, Met-metüülrühm (Selth et al, 2010).

On näidatud paljude kromatiini modelleerivate komplekside (näiteks Chd1) asumist transkribeeritavates piirkondades ning mitmeid funktsionaalseid ning füüsilisi seoseid elongatsioonifaktoritega (Simic et al, 2003). Pol II kompleksiga kaasa liikuv FACT kompleks on vajalik histoonide DNA-le tagasipanemiseks pärast transkriptsiooni lõppu (Schwabish &

Struhl, 2004). *In vitro* on näidatud, et RSC aitab Pol II läbida mononukleosoomiga DNA-d ning RSC efektiivsust suurendavad HAT-d SAGA ja NuA4 (Carey et al, 2006).

Vastusena keskkonnamuutustele või muudele signaalidele toimub vajalike reguleeritud geenide transkriptsiooni kiire aktivatsioon. Selle tulemusena toimub ühe geeni transkribeerimine mitme Pol II kompleksi poolt üheaegselt. Arvatakse, et galaktoosiga kasvukeskkonnas toimub GAL-geenidelt transkriptsiooni initsiatsioon iga 6-8 sekundi tagant (Iyer & Struhl, 1996). Arvestades, et Pol II keskmine RNA sünteesimise kiirus on keskmiselt 20-30 nukleotiidi sekundis, on kahe järjestikuse Pol II kompleksi vahe 120-180 nukleotiidi. See võib olla ka põhjuseks, miks GAL-reguleeritud geenid (ja ka teised kõrgelt ekspresseeritud geenid) on peaaegu nukleosoomidest vabad aktiivse transkriptsiooni ajal (Kristjuhan & Svejstrup, 2004) (Schwabish & Struhl, 2004). Mitme Pol II samaaegse transkriptsiooni ja sellest tulenevate võimalike probleemide (polümeraaside kokku põrkamine, takerdunud polümeraasi lahti päästmine jne) täpsematest mehhanismidest ei ole väga palju teada. Huvitavaks teevad selle keerulise probleemi avastused, mis näitavad, et elongeeruv polümeraas ei liigu ühtlase kiirusega, vaid võib tihti peatuda (Chubb et al, 2006) või liikuda keskmisest oluliselt kiiremini – kuni 70 nukleotiidi sekundis (Darzacq et al, 2007).

On näidatud paljude kromatiini modelleerivate komplekside (näiteks Chd1) asumist transkribeeritavates piirkondades ning mitmeid funktsionaalseid ning füüsilisi seoseid elongatsioonifaktoritega (Simic et al, 2003). Pol II kompleksiga kaasa liikuv FACT kompleks on vajalik histoonide DNA-le tagasipanemiseks pärast transkriptsiooni lõppu (Schwabish & Struhl, 2004). *In vitro* on näidatud, et RSC aitab Pol II läbida mononukleosoomiga DNA-d ning RSC efektiivsust suurendavad HAT-d SAGA ja NuA4 (Carey et al, 2006).

TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida histooni H4 N-terminaalsete modifikatsioonide rolli:

- RNA polümeraas II hulgale transkribeerivas regioonis
- transkriptsioonist sõltuva nukleosoomide eemaldamise efektiivsusele
- transkriptsioonist sõltuva nukleosoomide eemaldamise dünaamikale
- transkriptsiooni repressioonile järgneva nukleosoomse struktuuri taastamise kiirusele geeni kodeerivas alas

MATERJALID JA MEETODID

Söötmed

Modifikatsiooni sisaldavate tüvede konstrueerimisel kasvatati pärmi transformeerunud rakkude selekteerimiseks –His söötmega tassidel [YNB (*Yeast nitrogen base*, *Applichem*) 6,7 g/l, glükoos 2% (*Medipharma*), agar 2% (*LAB MTM*), aminohapped ja nukleotiidid – Adeniin 40 µl/ml, Uratsiil 40 µl/ml, Leutsiin 80 µl/ml, Trüptofaan 40 µl/ml, Lüsiin 80 µl/ml (*Serva*)]. URA3 selektsioonimarkeriga plasmidi puudumist kontrolliti 5 – FOA-d (*5-Fluorootic Acid*) sisaldaval söötmel [5 – FOA 1 mg/ml (*Toronto Research Chemicals Inc.*), YNB 6,7 mg/ml, glükoos 2%, agar 2%, aminohapped ja nukleotiidid – ADE 40 µl/ml, URA 40 µl/ml, LEU 80 µl/ml, TRP 40 µl/ml, LYS 80 µl/ml).

Saccharomyces cerevisiae modifitseeritud tüvesid kasvatati YPD (*yeast extract*, **peptone**, **dextrose**) tard- [agar 20 g/l, glükoos 20 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l (*LAB MTM*), pärmiekstrakt 10 g/l (*LAB MTM*)] ja vedelsöötmes [mükoloogiline peptoon 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, glükoos või galaktoos 200 g/l (*Applichem*)]. Vedelkultuure aereeriti loksutil 30° C juures.

Antikehad

Immunosadestamisel kasutati histoonide detekteerimiseks kommertsiaalseid antikehasid 1E2, 5E11 ja 3F12 (*Quattromed*). Antikeha 1E2 on IgG₁ tüüpi hiire monoklonaalne antikeha E4Tag-i vastu (epitooptähtsus TTGHYSVRD), algse kontsentratsiooniga 1 mg/ml.

Antikehad 5E11 (epitooptähtsus SSTSSDFRDR) ja 3F12 (epitooptähtsus GVSSTSSDFRDR) on IgG₁ tüüpi hiire monoklonaalsed antikehad E2Tag-i vastu. Töös kasutatud tüved ja plasmiidid sisaldavad 3F12 epitooptähtsust, mida tunnevad ära nii 3F12 kui ka 5E11 antikeha. Antikehade algkontsentratsioon 1 mg/ml.

RNA polümeraas II detekteerimiseks kasutati kommertsiaalset antikeha 4H8 (*Abcam*), mille epitooptähtsus on polümeraasi C-terminuse kordusjärjestus YSPTSPS. Antikeha algkontsentratsioon 1 mg/ml.

Kasutatud oligonukleotiidid

Kromatiini immunosadestamisel eraldatud DNA analüüsimiseks qPCR-il (*Real – Time PCR*) kasutati kommertsiaalseid 22 – 29 nukleotiidi pikkuseid oligonukleotiide (*Metabion, Proligo*). Oligonukleotiidid on sünteesitud *VPS13* geeni erinevate piirkondade amplifitseerimiseks. Töös kasutatud oligonukleotiidid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. qPCR-il kasutatud oligonukleotiidid.

Seondumispiirkond VPS13 geenil	Järjestus (5' – 3')	Pikkus/T m
Algus	F 19 50 GCTAAACCGATTGCTAGGCTCATA R 179 155 ATCCCTGATTTCACATCTATGGGTA	25/61,4 25/60,9
2,6 k	F 2573 2597 ACGTTAATTACTCTTCTGGTTCCGA R 2731 2707 AGAATGCTATTTTCGCCTGATCGAT	25/61,4 25/61,3
3,5 k	F 3516 3540 CGAAAGTGCTGTAAACAGAATGGTT R 3666 3642 AGGTGCCTTGATTACTATGTCCATT	25/61,1 25/60,9
5 k	F 4986 5011 CTTAGAGATATTCGTCTGGCGATGT R 5155 5131 CACCTAAAATCGTTGGATCCAACA	25/61,3 24/61,2
5,5 k	F 5589 5610 TCCAGGGTATCTCAGAAGCCA R 5721 5742 TCTCCAATCTTCAAATTCCCAA	21/61 22/57
6,4 k	F 6525 6548 AGGGTCAAAGACAACGAATCTTCT R 6416 6391 ACTGGAGAAAGTATGGAAGTTCATCA	24/61,9 26/61,5
8,5 k	F 8457 8479 TGAGAGACACTATACGACCCAGT R 8622 8596 TTCTTGAGGCCTATCATTTCATCATGT	23/61,9 26/61,4
9,3 k	F 9313 9338 AAACTCAAGTCTCAATCCGAATACTT R 9435 9407 TCATAGGATAGCTTCACAGTACTTATTGT	26/59,7 29/59,6

Normaliseerimiseks kasutatud oligonukleotiidid		
<i>Chr8</i>	<i>forward</i> CATAGGGTGTAATTTGGTTGATGA <i>reverse</i> CTTGGAAATTGGTCCTGAGTTT	24/58,2 22/58,7
<i>FBA1</i>	<i>forward</i> TTGCACCCAATCTCTCCAACTT <i>reverse</i> ATTTCTGGTCTCAAAGCGATGTCA	23/62,5 24/61,9

Kasutatud pärmitüved ja nende saamine

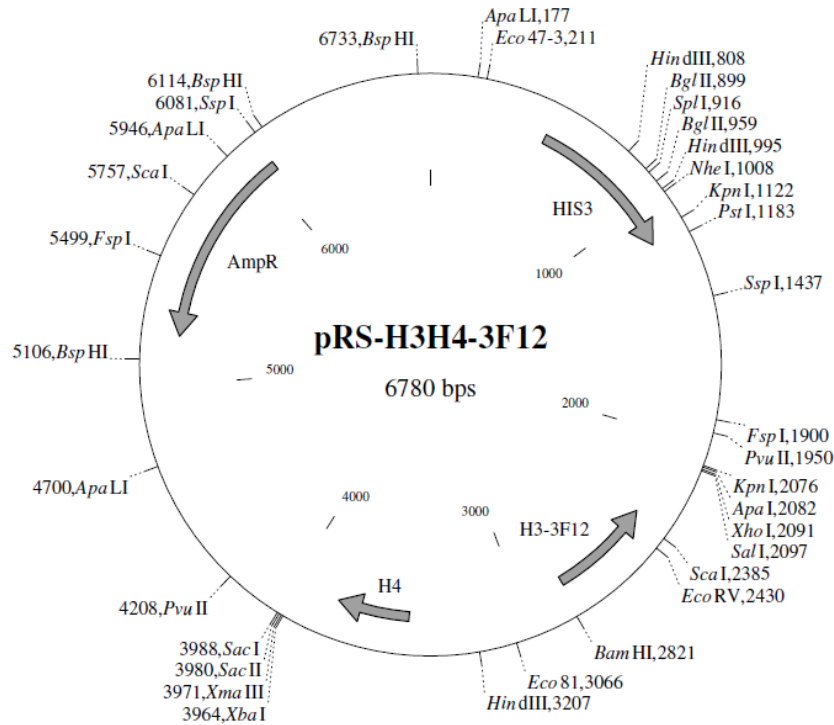
Töös kasutatud tüved konstrueeriti A. Kristjuhani töögrupi poolt (tüved AK241-AK262 konstrueeriti põhiosas töö autori poolt) ning on esitatud tabelis 2.

Tabel 2. Töös kasutatud pärmitüved ja nende saamine.

Nr	Tüvi	Genotüüp
1	W303	<i>S. cerevisiae</i> , MAT A <i>ura3 leu2-3, 112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100 lys2</i>
2	AKY 216	W303+GAL-prom-VPS13:: <i>TRP1</i> , <i>hht1-hhf1::LEU2</i> , <i>hht2-hhf2::kanMX4</i> ; + <i>YCp50:HHT2-HHF2 (URA3)</i>
3	AKY 241	AKY216+pRS413-H3H4-3F12 (<i>HIS3</i>); wt histoonid (<i>HHT2-HHF2</i>), 3F12 tag H3 C-terminuses.
4	AKY 242	AKY216+pRS413-H3H4-3F12 (<i>HIS3</i>); wt H3 + K5R mutant H4 (<i>HHT2-HHF2</i> lookus), 3F12 tag H3 C-terminuses.
5	AKY 243	AKY216+pRS413-H3H4-3F12 (<i>HIS3</i>); wt H3 + K8R mutant H4 (<i>HHT2-HHF2</i> lookus), 3F12 tag H3 C-terminuses.
6	AKY 244	AKY216+pRS413-H3H4-3F12 (<i>HIS3</i>); wt H3 + K12R mutant H4 (<i>HHT2-HHF2</i> lookus), 3F12 tag H3 C-terminuses.
7	AKY 262	AKY216+pRS413-H3H4-3F12 (<i>HIS3</i>); wt H3 + K16R mutant H4 (<i>HHT2-HHF2</i> lookus), 3F12 tag H3 C-terminuses.
8	AKY 288	AKY216+pRS413-H3H4-3F12 (<i>HIS3</i>); wt H3 + K20R mutant H4 (<i>HHT2-HHF2</i> lookus), 3F12 tag H3 C-terminuses.
13	AKY 356	AKY216+pRS413-H3H4-1E2 (<i>HIS3</i>); wt histoonid (<i>HHT2-HHF2</i>), 1E2 tag H3 C-terminuses.

Kasutatud pärmitüved AKY 241, 242, 243, 244, 262, 288 ja 356 konstrueeriti tüve AKY216 põhjal. Nimetatud tüvi sisaldas histoone H3 ja H4 kodeerivat ning URA3 selektsioonimarkerit omavat plasmidi *YCp50:HHT2 – HHF2 (URA3)*. Atsetülatsioonidefektset modifikatsiooni omavate tüvede saamiseks viidi tüvesse AKY216 plasmid pRS413(*HIS3*) (Joonis 6), mis sisaldas histooni H4 geenis modifikatsiooni ning

histooni H3 geeni C – terminuses 3F12 epitooi. AKY 241 sisaldab atsetülatsiooni suhtes metsiktüüpi histoonigeene, kuid histooni H3 C – terminusse on lisatud 3F12 epitooi kodeeriv järjestus. AKY 356 on AKY 241 analoog, kus histooni H3 C – terminuses on 3F12 epitooi kodeeriva järjestuse asemel on lisatud 1E2 epitooi kodeeriv järjestus.



Joonis 6. Plasmidi pRS413 – H3H4 – 3F12 kaart.

O.Rando saadatud plasmidi pMD11 variantidest, mis sisaldasid H4 positsioonis 5, 8, 12 või 16 lüsiini asemel arginiini, lõigati mutatsiooni sisaldav piirkond ensüümidega *Xba*I ning *Bam*HI ja soovitud modifikatsiooni sisaldav produkt viidi samad ensüümidega restrikteeritud vektorisse pRS413 – H3H4 – 3F12 (joonis 1). K20R mutatsiooni sisaldav tüvi konstrueeriti PCR-il mutatsiooni sisaldavate oligonukleotiidide abil. Plasmidi paljundati bakteris (*E. Coli* DH5 α), kontrolliti kolooniast tehtud PCR-iga plasmidi korrektsust, seejärel puhastati bakterist (*Midiprep* meetodil) ning transformeeriti pärmi tüvesse AKY216. Transformeerunud rakud selekteeriti –His söötmega tassidel (koostis toodud eespool) ning algseid histoonide geene sisaldava URA3 markeriga plasmidi eemaldamiseks 5 – FOA-d sisaldaval söötmel.

Mutantsetel tüvedel (AKY 241, 242, 243, 244, 262, 288) muudeti lüsiin arginiiniks, et imiteerida lüsiini mitteatsetüleeritud seisundit rakus. Nimetatud modifikatsioon ei muuda oluliselt valgu piirkonna struktuuri ega laengut, kuid teeb muteeritud positsioonid mittemodifitseeritavaks HAT poolt.

Kromatiini Immunosadestamine (ChIP)

Pärmi rakuekstrakti valmistamine

Kasutamiseks geeni induktsiooni uurimisel

Algsetes galaktoosiga indutseerimise katsetes eelkasvatati kõiki pärmütüvesid 4 tundi 10 ml-is glükoosi sisaldavas (2%) vedelsöötmes (YP). Rakud koguti tsentrifuugimisel (5 min, 1500 rpm, *Sigma 4K 15C*, rootor 272/F) ning pandi kasvama 25 ml-sse rafinoosi sisaldavasse söötmesse (22,5 ml YP, 2,5 ml 20% rafinoos). Üleöö kasvanud kultuuridel mõõdeti optiline tihedus ($OD_{600\text{ nm}}$) (*Ultrospec 3100 pro*) ning lahjendati kultuure nii, et $OD_{600\text{ nm}}$ oleks 0,1. Selleks lisati vajalik kogus üleöö kasvanud kultuuri värskesse söötmesse (YP, rafinoos 2%, üldmaht 65 ml). Rakkudel lasti kasvada umbes 3 tundi ning fikseeriti ajapunkt '0 min'. Ühe konkreetse ajapunkti võtmiseks koguti 10 ml rakukultuuri ning fikseerimiseks kasutati 270 µl 37 %-list formaldehüüdi (lõppkontsentratsiooniga 1%). Ülejäänud kultuurile lisati galaktoosi (lõppkontsentratsioon 2%) ning koguti ajapunktid 15 minuti ('Gal 15 min') ja 2 tunni möödudes ('Gal 120 min').

Hilisemates galaktoosiga indutseerimise katsetes eelkasvatati kõiki pärmütüvesid 4 tundi 10 ml-is glükoosi sisaldavas (2%) vedelsöötmes (YP). Rakud koguti tsentrifuugimisel (5 min, 1500 rpm, *Sigma 4K 15C*, rootor 272/F) ning pandi kasvama 40 ml-sse rafinoosi sisaldavasse söötmesse (36 ml YP, 4 ml 20% rafinoos). Üleöö kasvanud kultuuridel mõõdeti rakkude tihedus rakuloenduriga (*Z2 Coulter® Particle Count and Size analyser, Beckman Coulter™*). Rakke lahjendati tiheduseni 4×10^6 rakku/ml mahus 40 ml ning kasvatati 2 tundi. Seejärel mõõdeti kultuuri tihedus ning tõsteti iga uuritavat modifikatsiooni omav tüvi eraldi kokku metsiktüüpi tüvega (AKY 356) nii, et nii metsiktüüpi kui ka mutantse tüve oletatav tihedus oleks $3,5 \times 10^6$ rakku/ml ning kokku segatud kultuuride maht 70 ml. Koos kasvatati tüvesid veel umbes 1 tund kuni tiheduseni 1×10^7 rakku/ml. Peale metsiktüüpi- ja mutantse tüve koos kasvatamist koguti ajapunktid. Ühe konkreetse ajapunkti võtmiseks koguti 10 ml rakukultuuri ning fikseerimiseks kasutati 270 µl formaldehüüdi lõppkontsentratsiooniga 1%. Pärast 'rafinoos 0' ajapunkti võtmist koguti rakud tsentrifuugimisel [5 min 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F)] ning rafinoosi sisaldav sööde asendati eelsoojendatud, galaktoosi

sisaldava söötmega (70 ml, 2% galaktoos). Koguti ajapunktid 15 minuti ('Gal 15 min'), 30 min ('Gal 30 min'), 1 tunni ('Gal 1 h'), 2 tunni ('Gal 2 h') ja 4 tunni ('Gal 4 h') möödudes.

Kasutamiseks geeni transkriptsiooni repressiooni uurimisel

Kõiki pärmütüvesid kasvatati 10 ml glükoosi sisaldavas (2%) vedelsöötmes (YP) 12 tundi. Seejärel koguti rakud 5 minutilisel fuugimisel kiirusel 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F). Saadud rakud suspendeeriti 10 ml suhkruta söötmes ning kõik tüved jaotati järgneva skeemi alusel kaheks 2 ml rakke glükoosiga ja 8 ml rakke galaktoosiga söötmesse):

YP+glükoos üldmahuga 25 ml

2,5 ml glükoosi (20%)

21,5 ml söödet (YP)

2 ml suhkruta söötmes suspendeeritud rakke

YP+galaktoos üldmahuga 50 ml

5 ml galaktoosi (20%)

37 ml söödet (YP)

8 ml suhkruta söötmes suspendeeritud rakke

Rakke kasvatati edasi üleöö loksutil 30° C juures. Üleöö kasvanud kultuuridel mõõdeti rakkude tihedus rakuloenduriga (*Z2 Coulter® Particle Count and Size analyser, Beckman Coulter™*). Rakke lahjendati tiheduseni 4×10^6 rakku/ml mahus 40 ml ning kasvatati 2 tundi. Seejärel mõõdeti kultuuride tihedus ning tõsteti iga uuritavat modifikatsiooni omav tüvi eraldi kokku metsiktüüpi tüvega (AKY 356) nii, et nii metsiktüüpi kui ka mutantse tüve oletatav tihedus oleks $3,5 \times 10^6$ rakku/ml ning kokku segatud kultuuride maht 40 ml galaktoosis ning 10 ml glükoosis. Koos kasvatati tüvesid veel umbes 1 tund kuni tiheduseni 1×10^7 rakku/ml. Peale metsiktüüpi- ja mutantse tüve koos kasvatamist koguti ajapunktid. Ühe konkreetse ajapunkti võtmiseks koguti 10 ml rakukultuuri ning fikseerimiseks kasutati 270 µl formaldehüüdi lõppkontsentratsiooniga 1%. Glükoosis kasvanud tüvedel koguti üks ajapunkt ('Glc 0') ning galaktoosis kasvanud tüvedel ajapunktid 'Gal 0', 'Glc 2 min', 'Glc 5 min', 'Glc 10 min'. Galaktoosis koos kasvanud tüvedel, peale 'Gal 0' ajapunkti võtmist, koguti rakud tsentrifuugimisel [5 min 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F)] ning galaktoosi

sisaldav sööde asendati eelsoojendatud, glükoosi sisaldava söötmega (30 ml, 2% glükoos). Glükoosi sisaldavas söötmes lasti kultuuril kasvada ning koguti vajalikud proovid ('Glc 2 min', 'Glc 5 min', 'Glc 10 min') vastavalt 2, 5 ja 10 minuti pärast.

Rakkude fikseerimiseks lasti neil seista formaldehüüdiga 15 minutit toatemperatuuril, segades aeg-ajalt vortexil. Seejärel lisati 1 ml glütsiini (lõppkontsentratsiooniga 200 mM), lasti seista 5 minutit toatemperatuuril ning asetati siis jääle.

Rakke pesti kaks korda 10 ml 1x PBS-ga (siin ja edaspidi, lahuste koostised on toodud Lisa 1), tsentrifuugiti 5 minutit 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F). Rakud resuspendeeriti 1 ml FA-lüüsipuhvril ning viidi *Eppendorf* tuubidesse, tsentrifuugiti 12 sekundit (maksimaalse kiiruse saavutamiseni, *Eppendorf Centrifuge 5415R*, rootor F45-24-11), supernatant eemaldati ning rakud resuspendeeriti 500 µl FA-lüüsipuhvril. Rakususpensioonile lisati klaaskerakesi [0,5 mm *Glass Beads (Soda Lime) (BioSpec Products Inc.)*]. Rakke lõhuti 15 minutit klaaskerakestega 4°C juures, kasu tades masinat *Disruptor Genie™ (Scientific Industries)*. Rakulüsaadi kättesaamiseks tehti nõelaga tuubi põhja auk ning asetati 1,5 ml *Eppendorf* tuub 2 ml *Eppendorf* tuubi sisse. Tsentrifuugiti 1 min 5000 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415R*, rootor F45-24-11). Saadud lüsaati lahjendati 1 ml FA – lüüsipuhvriga ning kogu lüsaat viidi 15 ml tsentrifuugituubi. Lüsaati sonikeeriti (*Diagenode – Bioruptor™*) 3 min (6 x 30 sek sonikeerimist, 1 min pausi, 200 W, 0°C juures). Rakulüsaat viidi 1,5 ml *Eppendorf* tuubi, tsentrifuugiti 5 min 4°C juures maksimaalsel kiirusel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge 5415R*, rootor F45-24-11). Supernatant viidi uude tuubi ning korrati tsentrifuugimist 15 min 4°C juures (13 200 rpm; *Eppendorf Centrifuge 5415R*, rootor F45-24-11). Saadud supernatant on kogu raku ekstrakt (*whole cell extract*, WCE).

Immunosadestamine (IP)

150 µl WCE inkubeeriti 0,5 µl antikeha (alkkontsentratsioon 1 mg/ml, *Quattromed*) ja 150 µl FA – lüüsipuhvriga üleöö 4°C juures. IP proove tsentrifuugiti 15 min 4°C juures täiskiirusel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge 5415R*, rootor F45-24-11) ning supernatant viidi uude 1,5 ml *Eppendorf* tuubi. Proteiin – A kerakesi [*ProteinA Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare Bio – Sciences AB)*] inkubeeriti 15 minutit BSA – ga [BSA (*Bovine serum albumine*, *BioTop*, lõppkontsentratsioon 1 mg/ml) + FA – lüüsipuhver] 4°C juures. 15 µl proteiin – A kerakesi ja 30 µl puhvrit (BSA+FA – lüüsipuhver) lisati IP proovile ning inkubeeriti 1,5 h 4°C juures.

IP reaktsioone tsentrifuugiti 1 min 6000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415D, rootor F45-24-11). Proove pesti järgemööda 1 ml FA – lüüsipuhvri, FA500, LiCl ning TES pesulahusega (iga lahusega 5 min).

Antigeenid elueeriti 100 µl eluatsioonipuhvriga toatemperatuuril 10 min, segati aeg – ajalt vortexil. Elueerimise etappi korrati. Proove tsentrifuugiti 1 min 6000 rpm juures (*Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11) ning supernatant koguti. Supernatandile lisati 200 µl H₂O ning 1 µl ProteinaasK – d (kontsentratsiooniga 18,7 mg/ml, *Fermentas*) ning inkubeeriti 65° C juures 5 tundi.

DNA eraldati fenool – kloroformi töötlusel. Proovile lisati 400µl fenool – kloroformi (1:1), segati vortexil ning tsentrifuugiti 5 min maksimaalsetel pööretel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11). Vesifaas viidi uude tuubi ning fenool – kloroformile lisati 100 µl TE (10/1). Segati vortexil ja tsentrifuugiti 5 min 13200 rpm juures (*Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11). Kogu saadud vesifaasile lisati 500 µl veega küllastatud kloroformi. Segati vortexil ja tsentrifuugiti 5 min 13200 rpm juures (*Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11). Vesifaas viidi 2 ml *Eppendorf* tuubi ning lisati 50 µl NaAc (3 M), 1 µl glükogeeni (20 mg/ml) ja 1,5 ml 96% EtOH. Proovid pandi sadenema -80° C juurde (minimaalselt 20 min).

Proove tsentrifuugiti 4° C juures 15 min (13 200 rpm; *Eppendorf Centrifuge* 5415R, rootor F45-24-11). DNA sade pesti 500 µl 70% EtOH-ga ning tsentrifuugiti uuesti 4° C juures 7 min (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge* 5415R, rootor F45-24-11). DNA lahustati 50 µl MilliQ vees. qPCR-il (*real – time quantitative PCR*) kasutati 1 µl DNA-d.

qPCR

Kromatiini immunosadestamisel eraldatud DNA-d analüüsiti qPCR-il (*7900 HT Fast Real – Time PCR system, Applied Biosystems*), kasutades DNA-ga seonduvat fluorestseeruvat SYBR[®] Green värvi. qPCR analüüs viidi läbi 10 µl-s [DNA 1 µl; PCR-i segu – praimerid 0,25 µl (10 pmol/µl), kommertsiaalne PCR-i segu 2 µl (5x, HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Mix, *Solis Biodyne*), H₂O 2,75 µl]. Iga DNA proovi analüüsiti iga praimeritepaariga 3 kannus.

qPCR-il kasutati programmi: absoluutne kvantifitseerimine (*absolute quantification, standard curve*), standardrežiim (C_t väärtuse *threshold* 0,2, automaatne lähtetaseme (*baseline*) määramine). Kasutati temperatuuri profiili: 1. etapp – 95° C 15 minutit (ensüümi

aktivatsioon), 2. etapp – 95° C 15 sekundit (denaturatsioon), 60° C 1 minut (praimerite seondumine ja elongatsioon). Tsüklit korrati 40 korda (alates 2. etapist). 3. etapp (dissotsiatsioon) – 95° C 15 sekundit, 60° C 15 sekundit, 95° C 15 sekundit.

qPCR-i tulemuste analüüsimiseks kasutati programmi SDS (*Sequence Detection Systems*) versioon 2.2.2 ning arvutiprogrammi *Microsoft Excel*. 3 korduse analüüsimisel eemaldati tulemused, mille C_t erines rohkem kui 0,4 võrra.

TULEMUSED

Histooni H4 mutatsioonide mõju RNA polümeraas II hulgale indutseeritud geeni kodeerivas alas

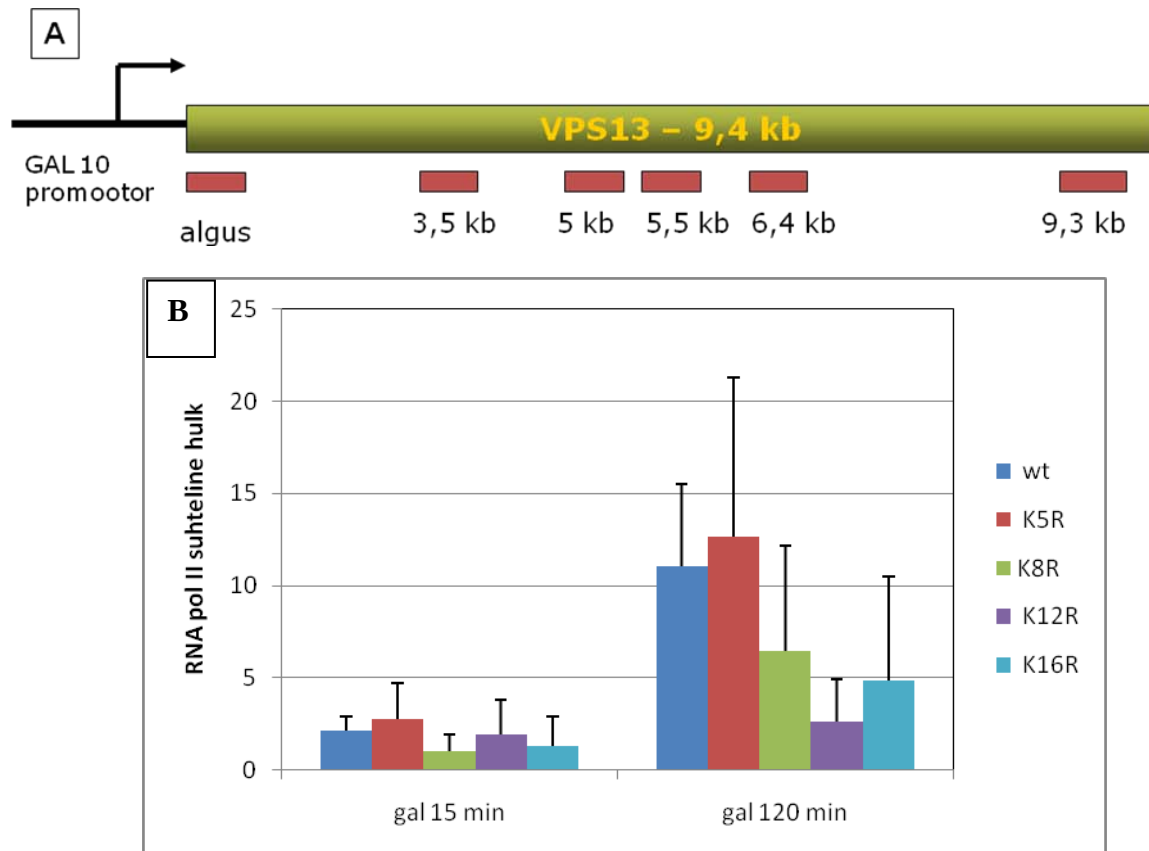
Transkriptsiooni indutseerimise ajal toimub histoonide eemaldamine ning Pol II hulga suurenemine geeni promootoril. Aktiivse elongatsiooni ajal on kõrgelt transkribeeritud geenides Pol II tase tõusnud ning nukleosoomide hulk vähenenud (Kristjuhan & Svejstrup, 2004) (Schwabish & Struhl, 2004). Transkriptsiooni indutseerimisele järgneva nukleosoomide vähenemise dünaamika kohta transkriptsiooni käigus on vähe teada.

Nukleosoomide eemaldamise efektiivsus võib mõjutada geeni transkribeeriva RNA polümeraasi hulka või edasiliikumise kiirust. Kuna on näidatud, et atsetüleeritud histoonide eemaldamine DNA-lt on lihtsam (Zhao et al, 2005), võib histoonide puudulik atsetüleeritus mõjutada nende eemaldamise dünaamikat.

Käesolevas töös kasutatavad pärmitüved omavad histooni H4 atsetüleerimise positsioonides 5, 8, 12, 16 ja 20 mutatsiooni, mille puhul on atsetüleeritav lüsiinijääk asendatud arginiinijäägiga. Seega otsustasime kontrollida, kas üksikute modifitseeritavate positsioonide mutatsioonidega histoonid mõjutavad transkribeeriva polümeraasi hulga suurenemist transkriptsiooni käigus. Katsetes kasutatakse mudelsüsteemi, kus pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* on kromosoomis XII üks pikemaid gene *VPS13* (9435ap) paigutatud GAL10 promootori kontrolli alla (joonis 7), et transkriptsioon geenilt oleks reguleeritav suhkru vahetamisega söötmes. *VPS13* kodeerib tundmatu funktsiooniga valku, mis on seotud sporuleerumisega, valkude sortimisega vakuoolis ja Golgi kompleksis. Geeni indutseerimise katsetes vahetatakse rafinoos galaktoosi vastu, sest pärm eelistab metaboliseerida galaktoosi ning seega on geeni aktivatsioon kiire. Geeni transkribeerimise lõpetamiseks vahetatakse galaktoosiga sööde glükoosi sisaldava söötme vastu.

Katseks kasvatati metsiktüüpi tüve (AKY241) ning mutantseid tüvesid H4 K5R (AKY 242), H4 K8R (AKY 243), H4 K12R (AKY 244) ja H4 K16R (AKY 262) üleöö rafinoosi sisaldavas söötmes. Üleöö rafinoosis kasvanud kultuuridel fikseeriti ajapunkt 'rafinoos 0', mis viitab nukleosoomide hulgale *VPS13* geenil, kui geeni ei transkribeerita. Seejärel vahetati

geeni *VPS13* aktiveerimiseks rafinoosi sisaldav sööde galaktoosi sisaldava söötme vastu ning koguti ajapunktid, viidi läbi IP ning tulemusi analüüsiti qPCR-il.



Joonis 7. RNA polümeraas II hulga muutumine transkriptsiooni indutseerimisel *GAL* – *VPS13* kodeerival alal. A. *GAL* – *VPS13* geeni skeem koos QPCR-il kasutatavate praimerite asukohtadega. B. RNA polümeraas II hulga muutumine transkriptsiooni indutseerimisel *GAL* – *VPS13* kodeerival alal. Glükoosis (2%) eelkasvatatud rakke kasvatati üleöö rafinoosi (2%) sisaldavas söötmes, kultuuridel fikseeriti ajapunkt 'rafinoos 0', mille tulemused võeti võrdseks ühega (nukleosoomide hulk indutseerimata olekus). Rafinoosi sisaldav sööde vahetati 2% galaktoosi sisaldava söötme vastu ning fikseeriti ajapunktid 15 minuti (gal 15 min) ja 2 tunni (gal 120 min) möödudes. Kogutud proovidest valmistatud WCE-l viidi läbi immunopretsipitatsioon 4H8 antikehaga. Tulemusi analüüsiti qPCR-il 5k ja *FBA1* oligonukleotiididega. Tulemused normaliseeriti *FBA1*-ga. Esitatud on 3 katse keskmised koos standardhälbega.

Geeni transkriptsiooni aktivatsioon galaktoosiga põhjustab Pol II hulga suurenemist *GAL* – *VPS13* geeni kodeerivas alas metsiktüüpi histoonidega tüves (Joonis 7). 15 minutit pärast geeni indutseerimist on Pol II hulk geenil vähe muutunud, kuid 2 tundi pärast geeni aktiveerimist on polümeraasi hulk metsiktüüpi tüves algtasemega võrreldes suurenenud 10 korda. Histooni H4 mutatsioonide mõju Pol II hulgale ei ole ühene ning katsetulemuste veapiirid on mutatsioonidega K5R, K8R ja K16R tüvede puhul väga laiad. H4 lüsiin 5 muteerimine ei vähenda polümeraasi hulka 2 tundi pärast geeni aktivatsiooni, küll aga on polümeraasi hulk oluliselt vähenenud ($p < 0,05$) K12R mutatsiooniga tüves metsiktüüpi tüvega

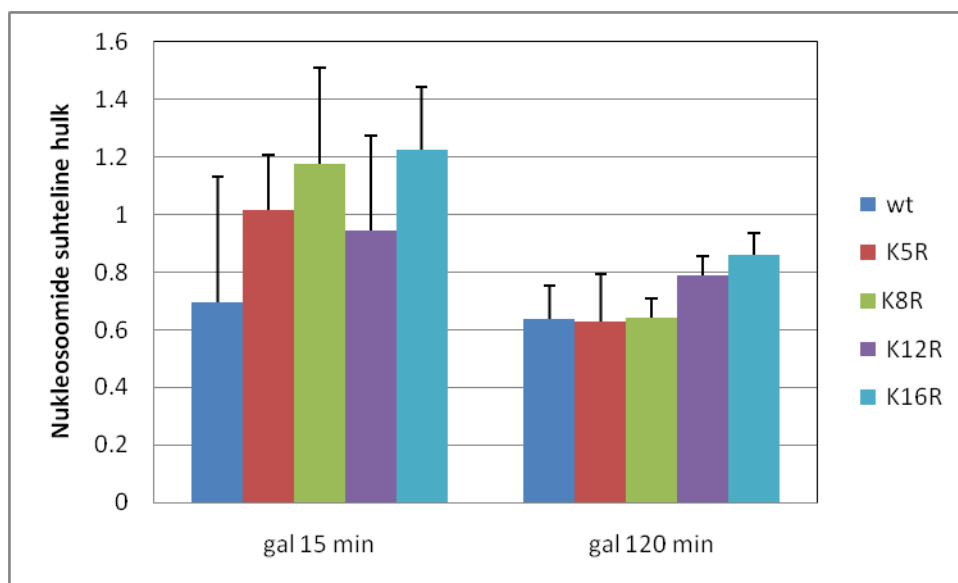
võrreldes. K8R ja K16R mutatsiooniga tüvedes on keskmine polümeraasi hulk pea poole väiksem metsiktüüpi tüvega võrreldes.

Histooni H4 mutatsioonide mõju nukleosoomide eemaldamisele indutseeritud geeni kodeerivalt alalt

Transkriptsiooni toimumiseks on vajalik kromatiini struktuuri muutumine transkribeeriva polümeraasi kompleksi läbimise võimaldamiseks indutseeritud geeni kodeerivas alas. Kirjanduse põhjal on teada, et histoonide kovalentsed modifikatsioonid omavad olulist rolli nukleosoomide eemaldamises transkriptsiooni initsiatsioonil ja elongatsioonil. Nukleosoomide eemaldamise dünaamika uurimiseks indutseerisime *GAL – VPS13* geeni transkriptsiooni galaktoosiga ning võrdlesime nukleosoomide eemaldamise kineetikat *GAL – VPS13* geeni kodeerivalt alalt H4 mutante ekspresseerivates pärmitüvedes metsiktüüpi histoone ekspresseeriva tüvega.

Katseks kasvatati metsiktüüpi tüve (AKY241) ning mutantseid tüvesid H4 K5R (AKY 242), H4 K8R (AKY 243), H4 K12R (AKY 244) ja H4 K16R (AKY 262) üleöö rafinoosi sisaldavas söötmes. Üleöö rafinoosis kasvanud kultuuridel fikseeriti ajapunkt '0 min', mis viitab nukleosoomide hulga *VPS13* geenil, kui geeni ei transkribeerita, vahetati geeni *VPS13* aktiveerimiseks rafinoosi sisaldav sööde galaktoosi sisaldava söötme vastu ning koguti ajapunktid. Histoonide hulga määramiseks viidi läbi IP ning tulemusi analüüsiti qPCR-il (Joonis 8).

Geeni aktivatsiooni galaktoosi lisamisel söötmesse toimuvad histooni H3 hulga muutused *GAL – VPS13* geeni kodeerivas alas. Kiiret histooni H3 hulga vähenemist (15 minutit peale aktivatsiooni) ei toimu üheski tüves (Joonis 8), pigem on näha väikest tõusu histoonide tasemes mutatsiooniga histoone ekspresseerivates tüvedes. See on osaliselt kooskõlas varem avaldatud tulemustega (Kristjuhan & Svejstrup, 2004), kui näidati, et *GAL*-promootoriga reguleeritud *VPS13* geeni indutseerimisel toimub histoonide hulga suurenemine 4 min pärast induktsiooni algust, histoonide hulga normaliseerumine 8 minutit pärast induktsiooni algust ning väike histoonide hulga vähenemine 15 minuti pärast. Pikemalt toimunud transkriptsiooni tulemusena (2 tundi pärast indutseerimist) on nukleosoomide hulga vähenemine täheldatav kõigis tüvedes (Joonis 8). Histoonide hulk vähenes 40% võrra metsiktüüpi tüves 2 tundi pärast induktsiooni algust. Sarnastes katsetes on kirjanduses teada erinevaid tulemusi:



Joonis 8. Histoonide eemaldamine GAL – VPS13 kodeerivalt alalt transkriptsiooni indutseerimisel. Glükoosis (2%) eelkasvatatud rakke kasvatati üleöö rafinoosi (2%) sisaldavas söötmes, kultuuridel fikseeriti ajapunkt 'rafinoos 0', mille tulemused võeti võrdseks ühega (nukleosoomide hulk indutseerimata olekus). Rafinoosi sisaldav sööde vahetati galaktoosi sisaldava (2%) söötme vastu ning fikseeriti ajapunktid 15 minuti (gal 15 min) ja 2 tunni (gal 120 min) möödudes. Kogutud proovidest valmistatud WCE-l viidi läbi immunopretsipitatsioon 3F12 antikehaga. Tulemusi analüüsiti qPCR-il 5k oligonukleotiididega. Tulemused normaliseeriti *FBA1*-ga. Esitatud on 3 katse keskmised koos standardhällbega.

histooni H3 eemaldamise ulatus võib sõltuvalt pärmitüvest ja uuritavast geenist olla 40-75%. Võrreldes metsiktüüpi tüvega on K16R modifikatsiooniga histoonide eemaldamine poole võrra väiksem ($p < 0,05$) (Joonis 8) ning ka K12R modifikatsiooniga histoonide eemaldamine on metsiktüübist väiksema efektiivsusega. Võrreldes polümeraasi hulga ja nukleosoomide eemaldamise katsete tulemusi, ei ole kokkulangevus ühene: K12R mutatsiooniga tüves on polümeraasi hulk oluliselt väiksem, kui nukleosoomide eemaldamise vähenemine ei ole sama selge, K16R mutatsiooni mõju polümeraasi hulgale on ebaselge, kuid nukleosoomide eemaldamine on oluliselt väiksem metsiktüübiga võrreldes.

Joonisel 8 on näha, et katsetes saadud tulemused on äärmiselt suure varieeruvusega ning seda eriti 15 minuti ajapunkti tulemustes, ning selle tõttu on üheste järelduste tegemine nende tulemuste põhjal raskendatud. Suurem muutlikkus esimese ajapunkti juures võib vihjata väikestele erinevustele kultuuri kasvukiiruses, tiheduses või muudes sarnastes parameetrites, mis mõjutavad esimest ajapunkti rohkem kui teist, sest võib arvata, et 2 tundi pärast induktiooni algust on platoo transkriptsiooni intensiivsuses (ning nukleosoomide eemaldamises) saavutatud. On tõenäoline, et lisaks histoonide mutatsioonidest tulenevatele muutustele nukleosoomide eemaldamise dünaamikas mõjutavad katsete tulemusi olulisel

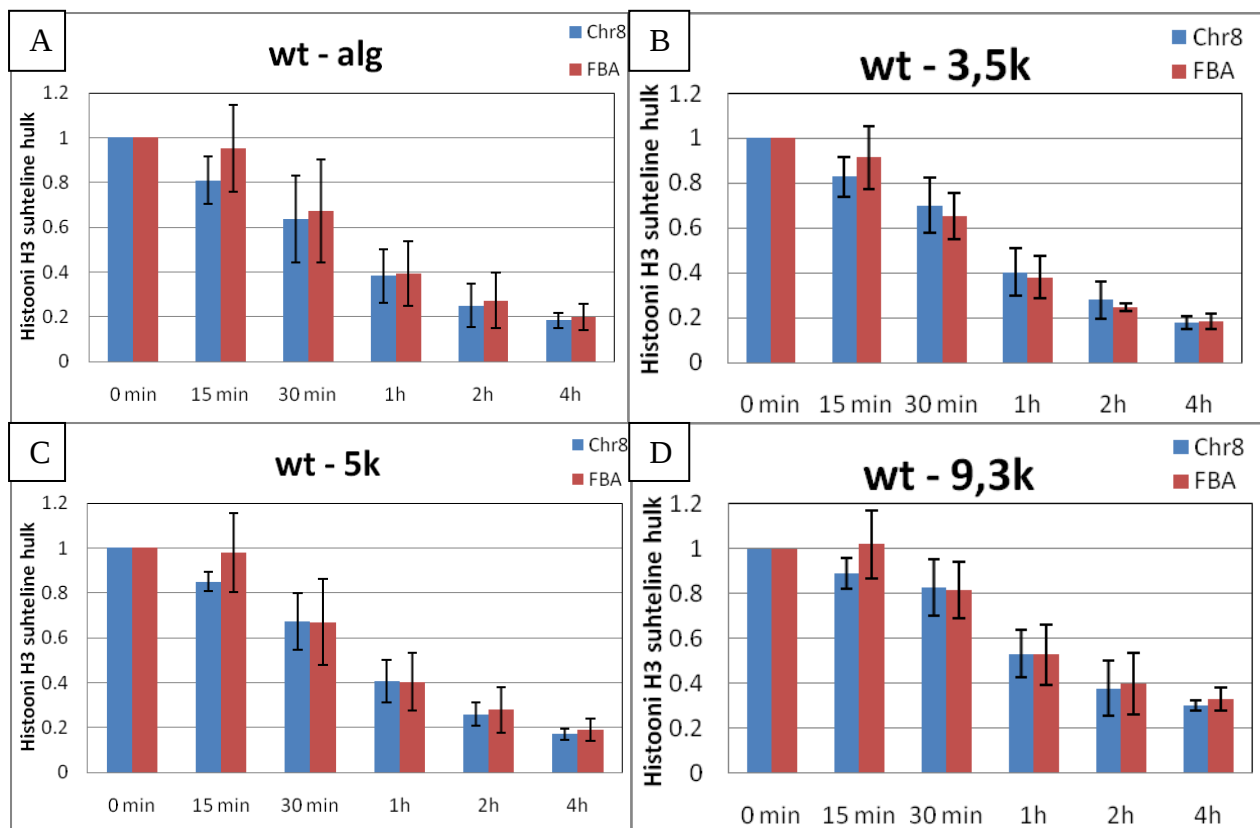
määral ka kultuuride kasvukiiruste erinevused ning katse käigus paratamatult toimuvad muudatused kasvukeskonnas (süsinikuallika vahetamine, tsentrifuugimine, väikesed temperatuuri kõikumised), mis kokkuvõtteks teevad erinevad katsed omavahel raskesti võrreldavateks.

Selgemate katsetulemuste saamiseks ning võimalike katsete vaheliste erinevuste vähendamiseks muutsime katsesüsteemi nii, et metsiktüüpi ning mutantne tüvi oleks võimalikult sarnastes tingimustes. Selleks toimub metsiktüüpi ning mutantse tüve kasvatamine enne induktsiooni koos samas kolvis ning ka induktsioon, ajapunktide võtmine ning muu on ühendatud. Sellises süsteemis on tüvede eristamiseks nukleosoomid märgistatud erinevalt - edasistes katsetes on tüvi AKY241 asendatud tüvega AKY356, milles histooni H3 C-terminuses on E2 epitoobi asemel E4 epitoop. Nukleosoomide eemaldamise dünaamika paremaks jälgimiseks on suurendatud suurendatud ajapunktide hulka ning pikendatud induktsiooni aega.

Lisaks toimus ka erinevate qPCR-il kasutatavate võrdlusgeenide sobivuse uurimine. qPCR-i tulemuste analüüsimisel on konkreetsele katsesüsteemile kontrolli leidmine olulise tähtsusega. Kontrolliti 2 erineva võrdluspiirkonna sobivust: 1) geen *FBA1*, milles asuvat piirkonda paljundab praimeritepaar *FBA1*, kodeerib glükolüüsi raja ensüümi fruktoos-1,6-bisfosfaadi aldolaas 2) *Chr8* praimerite paar paljundab osa 3,2 kb pikkusest mittetranskribeeritavast geenidevahelisest piirkonnast 8. kromosoomis. On näidatud, et suhkru vahetamisel muutub histoonide hulk selles piirkonnas samaväärselt telomeerse piirkonnaga (Värv et al, 2007).

Pidevalt ekspresseeritud geenide ning indutseeritavate geenide transkriptsiooni regulatsioon erineb nii ajaliselt kui mehhanismi poolest – seda reguleerivad faktorid on erinevad. Indutseeritava geeni aktivatsioon toimub vastusena mingile signaalile, on väga kiire ning saavutab lühikese ajaga kõrge transkriptsiooni taseme. Pidevalt ekspresseeritavate geenide transkriptsioonitase on ühtlane pikema aja jooksul ning sõltub pigem raku elutsüklis, vanusest jms teguritest. Nukleosoomide hulk on pidevalt transkribeeritavas geenis väiksem kui mittetranskribeeritud alas ning nukleosoomide hulga muutumine sõltub geeni regulatsioonist. Süsinikuallika muutumine on raku jaoks oluline sündmus ning võib mõjutada ka konstitutiivsete geenide ekspressiooni. Väikesed erinevused eksperimendi tingimustes võivad võimendada muutuvat kontrolli kasutades ning sellest võivad olla ka tingitud eelnevate katsete suured veapiirid.

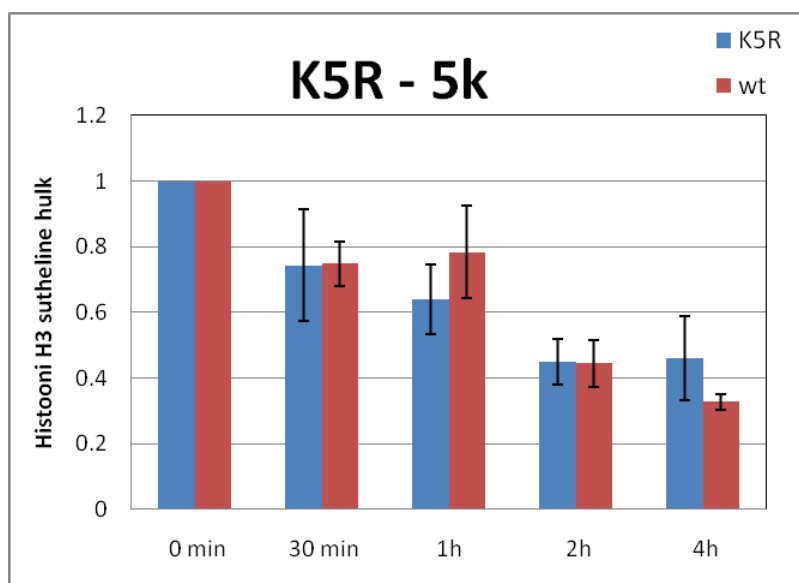
Pärmi kromatiin on avatuma struktuuriga võrreldes kõrgemate eukarüootidega, sest pärmis on intergeenseid piirkondi vähe ning need on lühikesed. Ka on enamuse pärmi genoomist transkriptsiooniliselt aktiivne. Seega peaks sobivaimaks kontrolliks olema mittetranskribeeritav geenidevaheline piirkond, mis on ajaliselt ühtlase kromatiini struktuuriga, mis ei sõltu üldisest transkriptsiooni tasemest rakus.



Joonis 9. Histoonte eemaldamine *GAL* – *VPS13* kodeerivalt alalt pärast transkriptsiooni indutseerimist tüves AK356. Glükoosis (2%) eelkasvatatud rakke kasvatati üleöö rafinoosi (2%) sisaldavas söötmes, segati mutantne ja metsiktüüpi tüvi, pärast kooskasvamist fikseeriti kultuuridel ajapunkt '0 min', mille tulemused võeti võrdseks ühega (nukleosoomide hulk indutseerimata olekus). Rafinoosi sisaldav sööde vahetati galaktoosi sisaldava (2%) söötme vastu ning fikseeriti ajapunktid 15 minuti, 30 minuti, 1 tunni, 2 tunni ja 4 tunni möödudes. Kogutud proovidest valmistatud WCE-l viidi läbi immunopretsipitatsioon antikehadega 3F12 (K5R) ja 1E2 (wt). Tulemusi analüüsiti qPCR-il alg (A), 3,5k (B), 5k (C) ja 9,3k (D) oligonukleotiididega. Tulemused normaliseeriti *Chr8*-ga või *FBA1*-ga. Esitatud on 5 katse (üks katse kooskasvatamisest iga mutandiga – K5, K8, K12, K16 või K20) keskmised koos standardhällbega

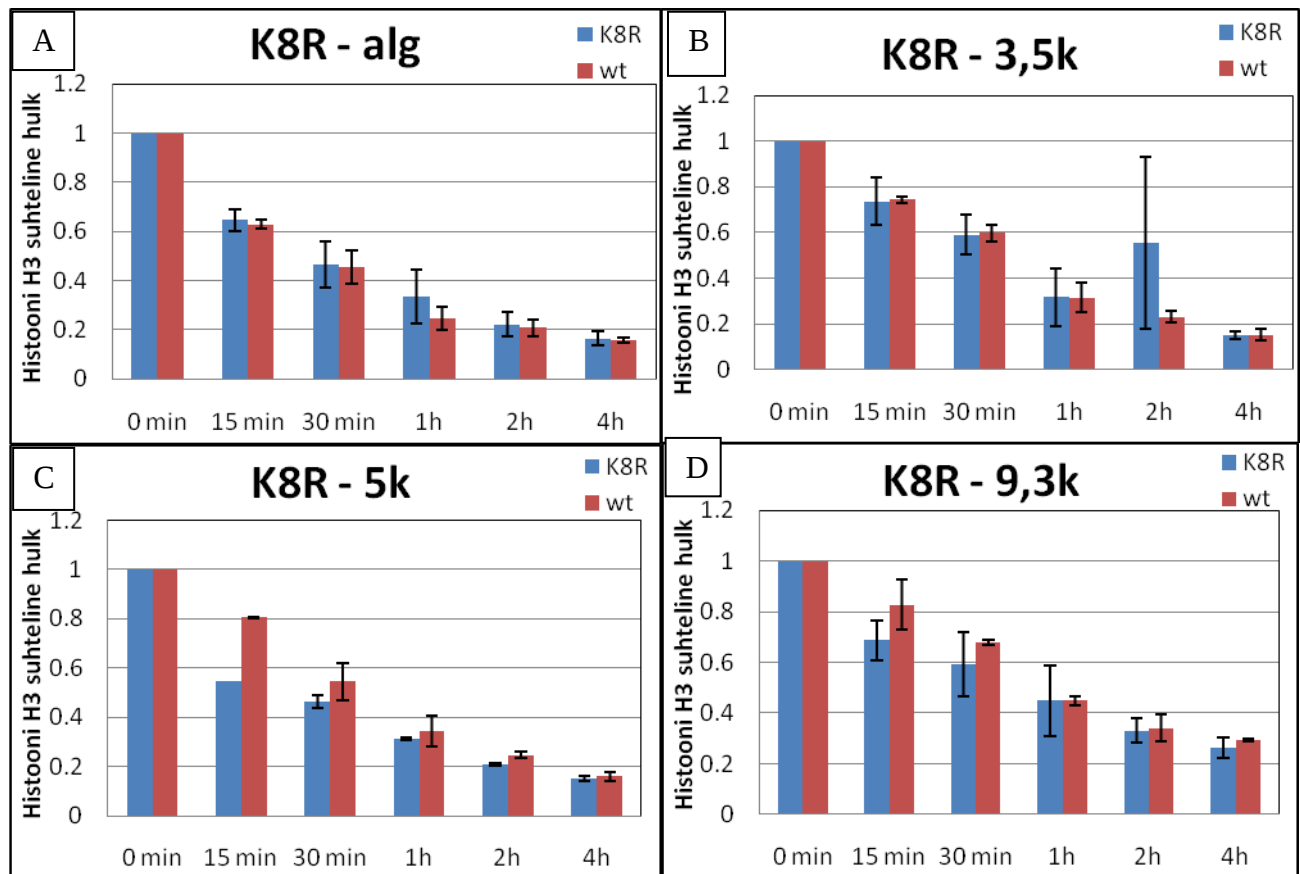
Katses kasutatav normaliseerimispiirkond mõjutab katsetulemusi (Joonis 9). *FBA1*-te normaliseerimisel kasutades enamuse praimerite ning ajapunktide puhul saadud tulemuse standardhällve suurem. See tähendab, et tulemuste hajuvus on suurem, mis kinnitab, et *Chr8* on stabiilsem võrdlusalus kui *FBA1*. Võrreldes 5 ajapunkti 4 erineva praimeriga, on

tegemist 20 erineva andmeühikuga. Nendest 20-st 17 juhul on standardhälve aritmeetilise keskmisega võrreldes suurem *FBA1*-ga saadud tulemuste puhul. Ülejäänud 3-st juhust 2 puhul on standardhälbe osakaal peaaegu sama (veidi *Chr8* kahjuks) ning vaid ühel juhul on *Chr8*-ga saadud standardhälbe osakaal selgelt suurem *FBA1*-ga saadud tulemustest. Kõik need 3 juhtu on esinevad 3,5k praimeritega saadud andmetega, kus 2h ajapunktis on *Chr8*-ga saadud tulemus selgelt suurema hälbega (Joonis 9, B). Kuna *FBA1*-ga saadud tulemuste hajuvus on suurem, siis arvestades mutatsioone sisaldavate tüvedega tehtud katsete väiksemat arvu, mida suurem hajuvus mõjutab rohkem, on edasistes katsetes kasutatud normaliseerimisel *Chr8* praimeritepaari.



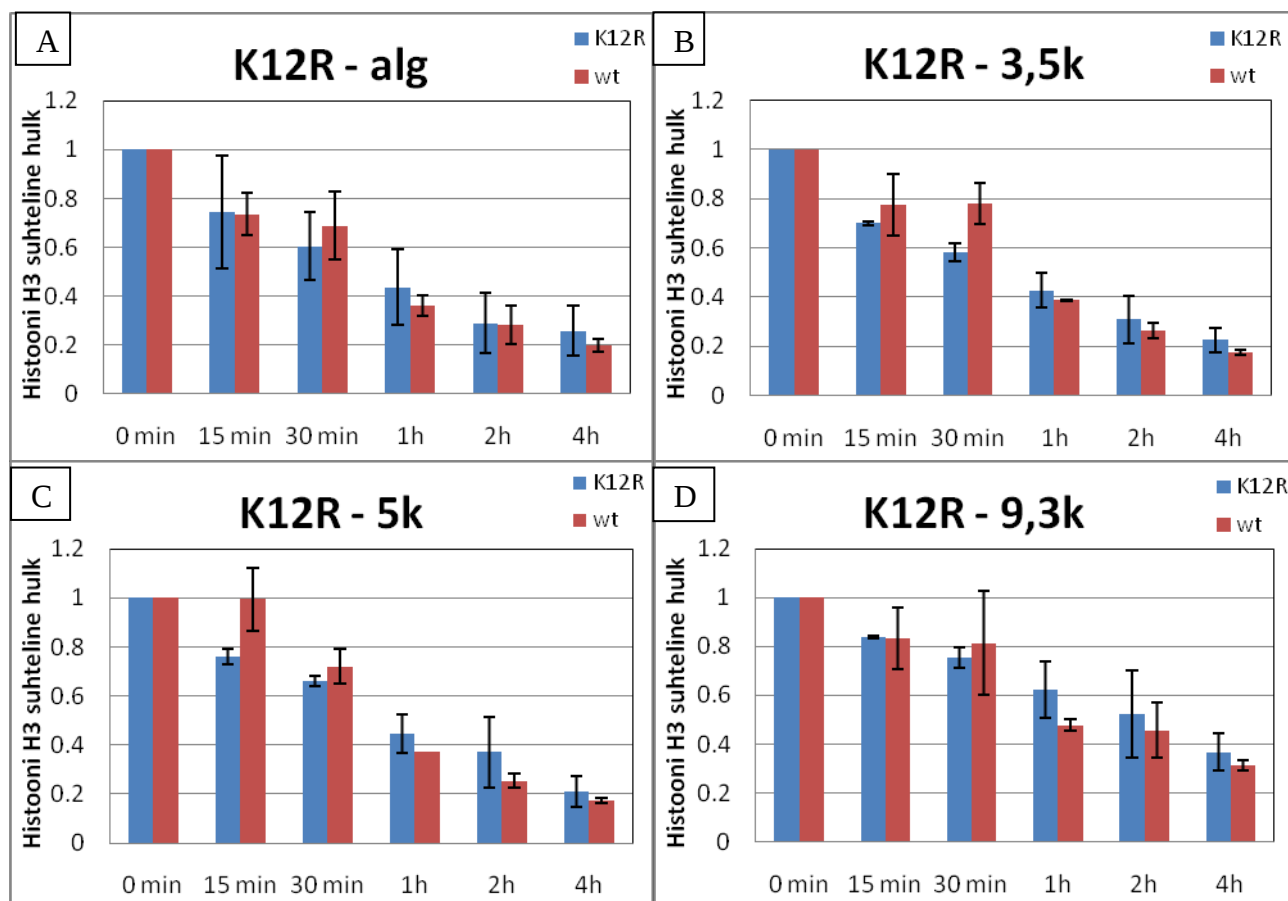
Joonis 10. Histoone eemaldamine *GAL* – *VPS13* kodeerivalt alalt tüves AK242 pärast transkriptsiooni indutseerimist. Glükoosis (2%) eelkasvatatud rakke kasvatati üleöö rafinoosis (2%) sisaldavas söötmes, segati mutantne ja metsiktüüpi tüvi, pärast kooskasvamist fikseeriti kultuuridel ajapunkt '0 min', mille tulemused võeti võrdseks ühega (nukleosoomide hulk indutseerimata olekus). Rafinoosi sisaldav sööde vahetati galaktoosi sisaldava (2%) söötme vastu ning fikseeriti ajapunktid 15 minuti, 30 minuti, 1 tunni, 2 tunni ja 4 tunni möödudes. Kogutud proovidest valmistatud WCE-l viidi läbi immunopretsipitatsioon antikehadega 3F12 (K5R) ja 1E2 (wt). Tulemusi analüüsiti qPCR-il 5k oligonukleotiididega. Tulemused normaliseeriti *Chr8*-ga. Esitatud on 3 katse keskmised koos standardhälbega.

Nukleosoomide eemaldamine geeni kodeerivalt alalt transkriptsiooni käigus on pidev protsess (Joonis 10). 30 minutit pärast induktsiooni algust on histoonide hulk vähenenud 25% ning 4 tundi pärast transkriptsiooni algust on eemaldatud 2/3 histoonidest metsiktüüpi tüves. Lüsiin 5 muteerimine arginiiniks ei kiirenda ega aeglusta nukleosoomide eemaldamist *GAL* – *VPS13* kodeerivalt alalt (Joonis 10), kuid mõjutab lõpptaset – keskmiselt eemaldatakse 50% histoonidest.



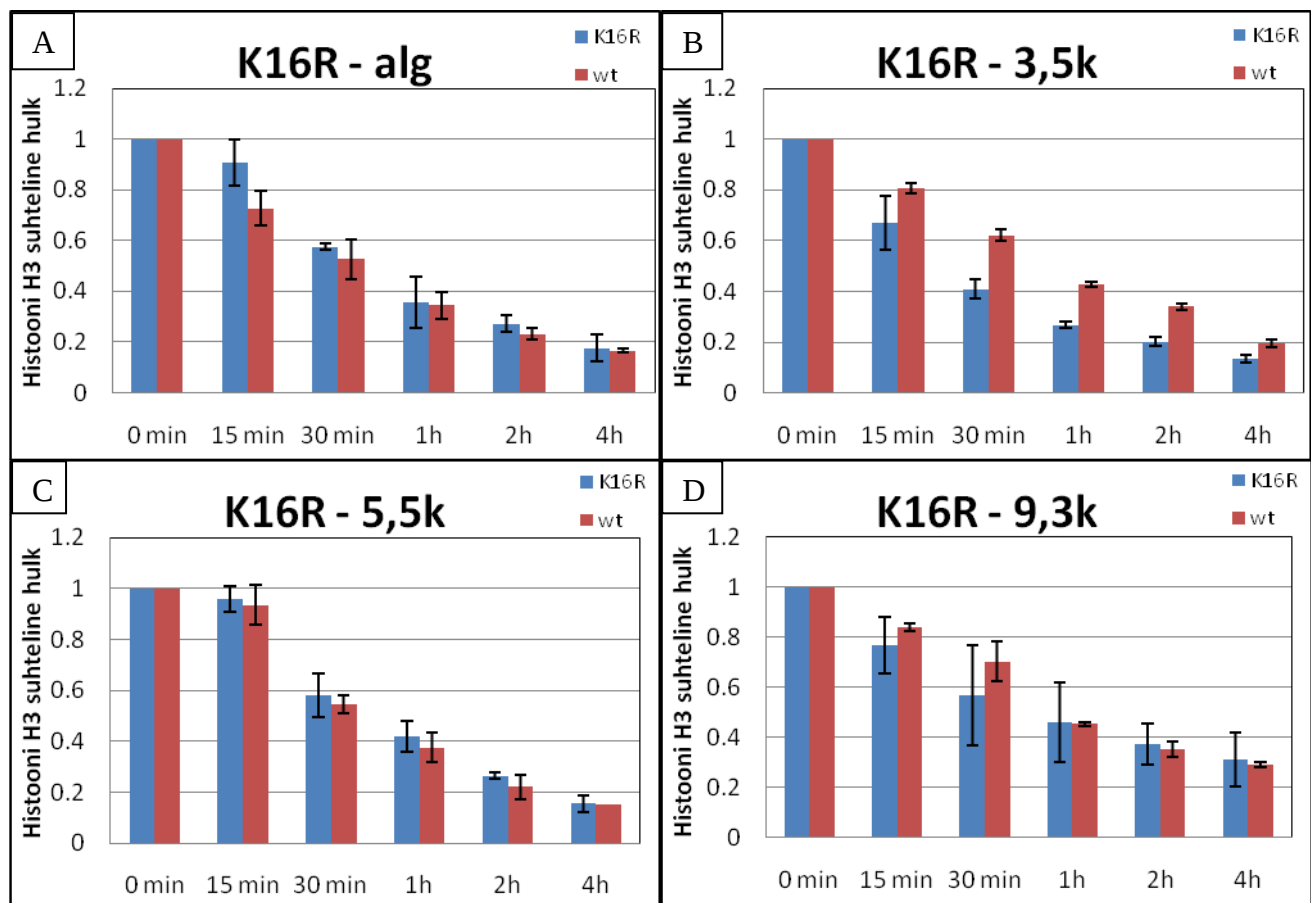
Joonis 11. Histoonte eemaldamine *GAL* – *VPS13* kodeerivalt alalt transkriptsiooni indutseerimisel tüves AK243. Glükoosis (2%) eelkasvatatud rakke kasvatati üleöö rafinoosis (2%) sisaldavas söötmes, segati mutantne ja metsiktüüpi tüvi, pärast kooskasvamist fikseeriti kultuuridel ajapunkt 0 min, mille tulemused võeti võrdseks ühega (nukleosoomide hulk indutseerimata olekus). Rafinoosis sisaldav sööde vahetati galaktoosis sisaldava (2%) söötme vastu ning fikseeriti ajapunktid 15 minuti, 30 minuti, 1 tunni, 2 tunni ja 4 tunni möödudes. Kogutud proovidest valmistatud WCE-l viidi läbi immunoprecipitatsioon antikehadega 3F12 (K8R) ja 1E2 (wt). Tulemusi analüüsiti QPCR-il alg (graafik A), 3,5k (graafik B), 5k (graafik C) ja 9,3k (graafik D) oligonukleotiididega. Tulemused normaliseeriti *Chr8*-ga. Esitatud on 2 katse keskmised koos keskmise hälbiga.

Nukleosoomide eemaldamise aeg ning ulatus *GAL* – *VPS13* kodeerivalt alalt on erinevad geeni alguses, keskel ning lõpus (joonis 11). 15 minutit pärast induktiooni algust on metsiktüüpi tüves geeni alguses eemaldatud 40% histoonidest (graafik A) kuid geeni lõpus vaid 20% (joonis 11, D). Ka histoonide eemaldamise kiirus on geeni alguses suurem – 1h pärast induktiooni on geeni alguse eemaldatud 70% histoonidest, geeni lõpus vaid 50%. Kuni geeni keskpaigani eemaldatakse üle 80% histoonidest, kuid geeni lõpus vaid 70%. Lüsiin 8 atsetüleerimatus soodustab histoonide eemaldamist geeni keskpaigas ning lõpus vahetult pärast transkriptsiooni initsiatsiooni, kuid histoonide eemaldamise ulatus on sarnane metsiktübile (joonis 11, C ja D).



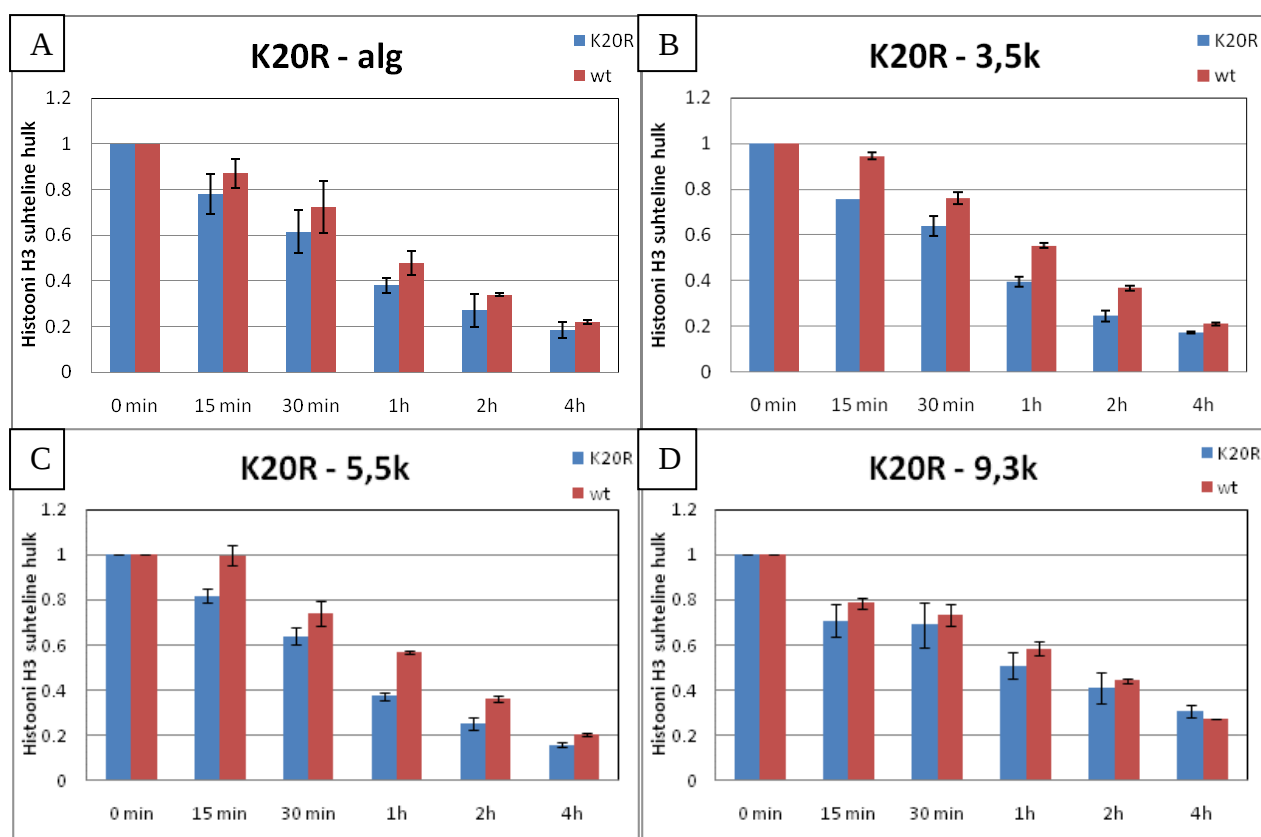
Joonis 12. Histoonide eemaldamine *GAL* – *VPS13* kodeerivalt alalt transkriptsiooni indutseerimisel tüves AK244. Glükoosis (2%) eelkasvatatud rakke kasvatati üleöö rafinoosi (2%) sisaldavas söötmes, segati mutantne ja metsiktüüpi tüvi, pärast kooskasvamist fikseeriti kultuuridel ajapunkt 0 min, mille tulemused võeti võrdseks ühega (nukleosoomide hulk indutseerimata olekus). Rafinoosi sisaldav sööde vahetati galaktoosi sisaldava (2%) söötme vastu ning fikseeriti ajapunktid 15 minuti, 30 minuti, 1 tunni, 2 tunni ja 4 tunni möödudes. Kogutud proovidest valmistatud WCE-l viidi läbi immunopretsipitatsioon antikehadega 3F12 (K12R) ja 1E2 (wt). Tulemusi analüüsiti qPCR-il alg (graafik A), 3,5k (graafik B), 5k (graafik C) ja 9,3k (graafik D) oligonukleotiididega. Tulemused normaliseeriti *Chr8*-ga. Esitatud on 2 katse keskmised koos keskmise hälbiga.

Mutatsiooni K12R efekt on sarnane K8R mõjule (joonis 12). Sõltumata mutatsiooni olemasolust on nukleosoomide eemaldamine kiirem ja ulatuslikum geeni algusest lõpu suunas. Lüsiin 12 atsetüleerimatus kiirendab histoonide eemaldamist geeni keskpäigas transkriptsiooni initsiatsiooni järel, kuid histoonide lõplik ulatus on sarnane metsiktüübile (Joonis 12, B ja C).



Joonis 13. Histoonide eemaldamine *GAL* – *VPS13* kodeerivalt alalt transkriptsiooni indutseerimisel tüves AK262. Glükoosis (2%) eelkasvatatud rakke kasvatati üleöö rafinoosi (2%) sisaldavas söötmes, segati mutantne ja metsiktüüpi tüvi, pärast kooskasvamist fikseeriti kultuuridel ajapunkt '0 min', mille tulemused võeti võrdseks ühega (nukleosoomide hulk indutseerimata olekus). Rafinoosi sisaldav sööde vahetati galaktoosi sisaldava (2%) söötme vastu ning fikseeriti ajapunktid 15 minuti, 30 minuti, 1 tunni, 2 tunni ja 4 tunni möödudes. Kogutud proovidest valmistatud WCE-l viidi läbi immunopretsipitatsioon antikehadega 3F12 (K16R) ja 1E2 (wt). Tulemusi analüüsiti qPCR-il alg (graafik A), 3,5k (graafik B), 5,5k (graafik C) ja 9,3k (graafik D) oligonukleotiididega. Tulemused normaliseeriti *Chr8*-ga. Esitatud on 2 katse keskmised koos keskmise hälbiga.

Mutatsiooni K16R efekt on sarnane K8R ja K12R mõjule (joonis 13). Nukleosoomide eemaldamine on nii metsiktüüpi kui mutantses tüves sarnane kogu geenil, kuid nukleosoomide eemaldamise tase on väiksem geeni lõpus. Võrreldes metsiktüüga on K16R mutatsiooniga nukleosoomide vähem 3,5k piirkonnas ning nende vähenemine on kiirem (Joonis 13, B), kuid nukleosoomide hulk on suurenenud 5,5k piirkonnas (Joonis 13, C). Selle põhjuseks võib olla kromatiini struktuuri tihendamine nukleosoomide libistamise teel nende vahelist linker-ala lühendades 5,5k piirkonnas.

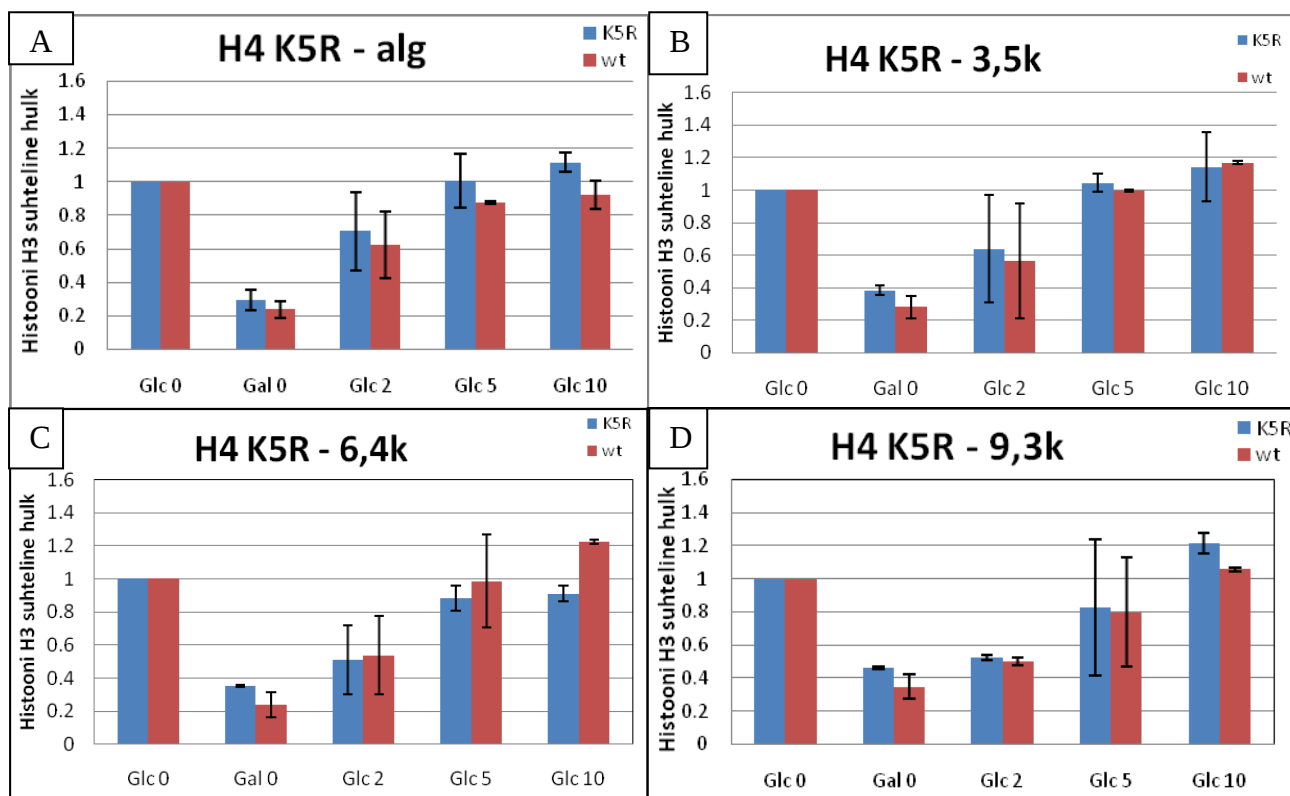


Joonis 14. Histoonide eemaldamine GAL – VPS13 kodeerivalt alalt transkriptsiooni indutseerimisel tüves AK288. Glükoosis (2%) eelkasvatatud rakke kasvatati üleöö rafinoosi (2%) sisaldavas söötmes, segati mutantne ja metsiktüüpi tüvi, pärast kooskasvamist fikseeriti kultuuridel ajapunkt 0 min, mille tulemused võeti võrdseks ühega (nukleosoomide hulk indutseerimata olekus). Rafinoosi sisaldav sööde vahetati galaktoosi sisaldava (2%) söötme vastu ning fikseeriti ajapunktid 15 minuti, 30 minuti, 1 tunni, 2 tunni ja 4 tunni möödudes. Kogutud proovidest valmistatud WCE-l viidi läbi immunopretsipitatsioon antikehadega 3F12 (K20R) ja 1E2 (wt). Tulemusi analüüsiti qPCR-il alg (graafik A), 3,5k (graafik B), 5,5k (graafik C) ja 9,3k (graafik D) oligonukleotiididega. Tulemused normaliseeriti *Chr8*-ga. Esitatud on 2 katse keskmised koos keskmise hälbega.

K20R mutatsiooniga histoonide hulga vähenemine on võrreldes metsiktüübiga kiirem geeni algusest keskpaigani ning kõige selgem 3,5k ja 5,5k piirkonnas (Joonis 14) (sama ka 5k piirkonnas, andmed pole näidatud). Lõplik histoonide tase on üsna sarnane – geeni esimeses pooles on kõigis ajapunktides mutatsiooniga nukleosoomide tase veidi võrreldes metsiktüübiga (A-C). Kui metsiktüüpi tüves on histoonide eemaldamise dünaamika üsna sarnane kogu geeni ulatuses pärast 30 min ajapunkti, siis mutantsete histoonide eemaldamine aeglustub geeni lõpuosas pärast 30 minuti möödumist induktsiooni alguses (võrdle A-C ja D K20R).

Histooni H4 mutatsioonide mõju nukleosoomse struktuuri taastumisele pärast geeni induktsiooni lõppemist

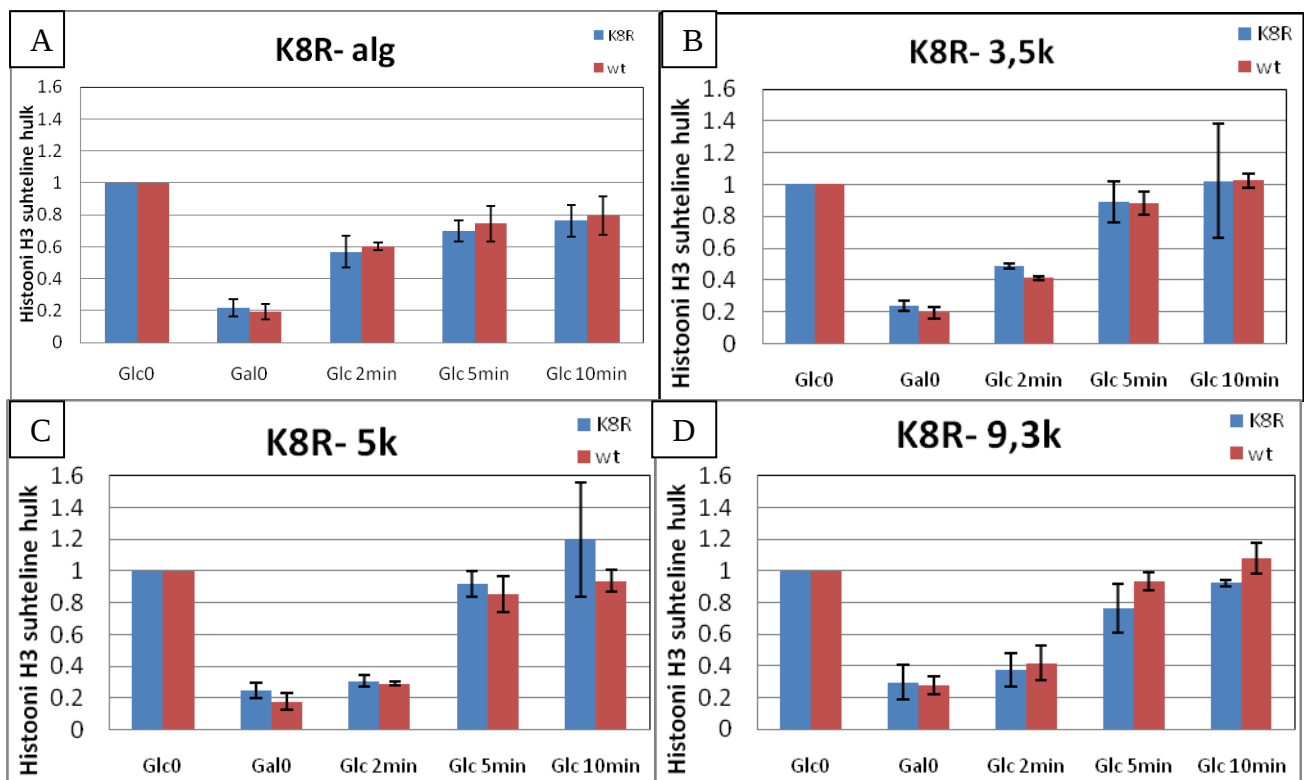
Pärast geeni transkriptsiooni aktiveeriva signaali kadumist lõpeb indutseeritava geeni aktiivne transkribeerimine. Galaktoosi vahetamine glükoosi vastu põhjustab GAL-promootoritele Pol II värbamise blokeerimise ning uusi transkribeerivaid komplekse enam promootorilt kodeerivasse alasse ei lisandu. Aktiivselt elongeeruvad kompleksid liiguvad edasi geeni lõpuni ning nende järel taastatakse nukleosoomne struktuur geenis.



Joonis 15. Nukleosoomse struktuuri taastumine GAL – VPS13 kodeerivas alas pärast geeni induktsiooni lõppemist tüves AK242. Glükoosis (2%) eelkasvatatud rakke kasvatati üleöö glükoosi (2%) ja galaktoosi (2%) sisaldavates söötmetes, segati mutantne ja metsiktüüpi tüvi mõlemas söötmes eraldi, pärast kooskasvamist fikseeriti glükoosisga kultuuril ajapunkt 'Glc 0', mille tulemused võeti võrdseks ühega (nukleosoomide hulk indutseerimata olekus) ning galaktoosisga kultuuril ajapunkt 'Gal 0' (nukleosoomide hulk indutseeritud olekus). Galaktoosi sisaldav sööde vahetati glükoosi sisaldava (2%) söötme vastu ning fikseeriti ajapunktid 2 minuti, 5 minuti ja 10 minuti möödudes. Kogutud proovidest valmistatud WCE-l viidi läbi immunoprecipitatsioon antikehadega 3F12 (K5R) ja 1E2 (wt). Tulemusi analüüsiti qPCR-il alg (graafik A), 3,5k (graafik B), 6,4k (graafik C) ja 9,3k (graafik D) oligonukleotiididega. Tulemused normaliseeriti *Chr8*-ga. Esitatud on 2 katse keskmised koos keskmise hälbiga.

Nukleosoomse struktuuri taastumine pärast transkriptsiooni lõppemist on kiire – geeni alguses toimub see umbes 2 minutit pärast galaktoosi eemaldamist söötimest (Joonis 15, A ja

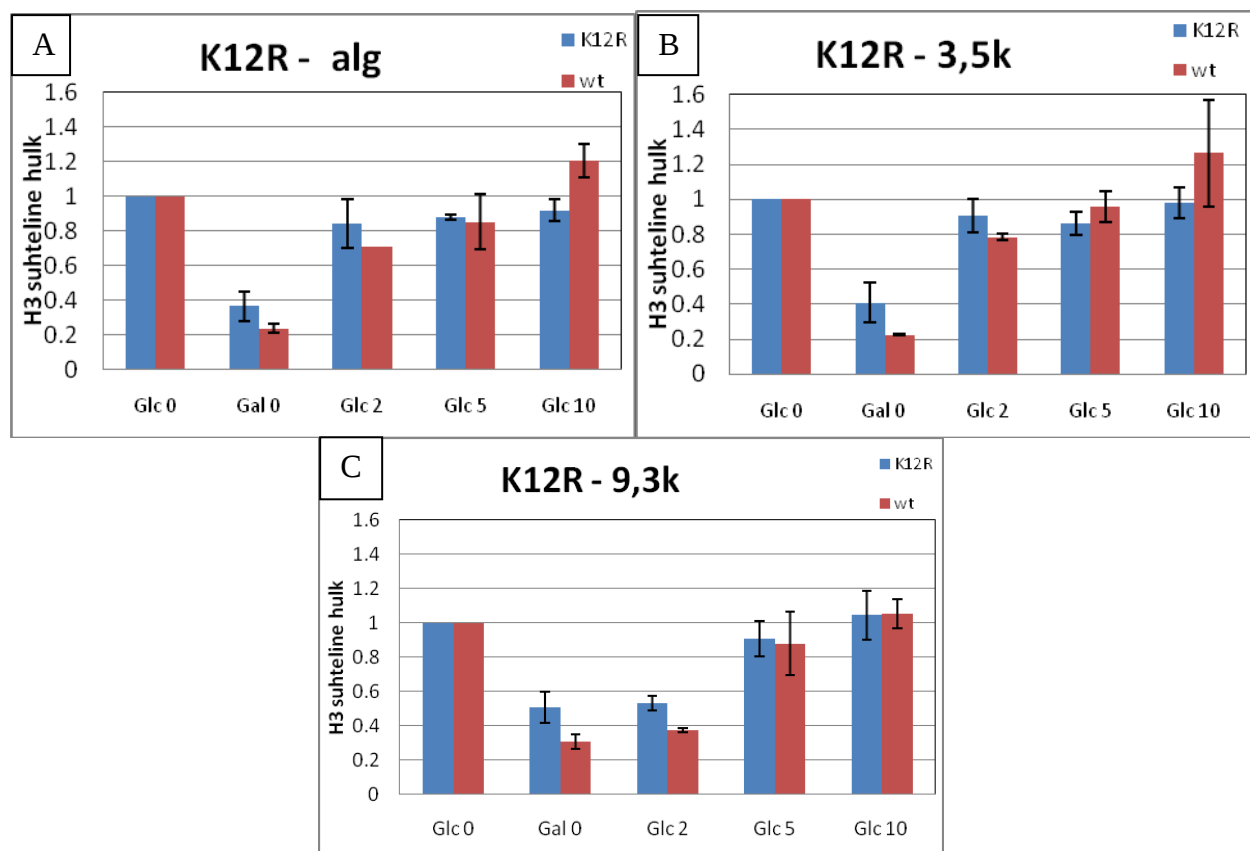
B). Geeni teises pooles on muutused aeglasemad – nukleosoomide hulk taastub 2 ja 5 minuti vahel (Joonis 15, C, 6,4k) või ligikaudu 5 minutit pärast transkriptsiooni lõppu (Joonis 15, D). Nukleosoomide hulga vähenemine geeni lõpus on väiksem kui promootori lähedal, seda just põhiliselt K5R mutatsiooniga tüves (võrdle Joonis 15, A Gal0 ja D Gal0). Muus osas mutatsioon nukleosoomide naasmist ei mõjuta.



Joonis 16. Nukleosoomse struktuuri taastumine GAL – VPS13 kodeerivas alas pärast geeni induktsiooni lõppemist tüves AK243. Glükoosis (2%) eelkasvatatud rakke kasvatati üleöö glükoosi (2%) ja galaktoosi (2%) sisaldavates söötmetes, segati mutantne ja metsiktüüpi tüvi mõlemas söötmes eraldi, pärast kooskasvamist fikseeriti glükoosis kultuuril ajapunkt 'Glc 0', mille tulemused võeti võrdseks ühega (nukleosoomide hulk indutseerimata olekus) ning galaktoosis kultuuril ajapunkt 'Gal 0' (nukleosoomide hulk indutseeritud olekus). Galaktoosi sisaldav sööde vahetati glükoosi sisaldava (2%) söötme vastu ning fikseeriti ajapunktid 2 minuti, 5 minuti ja 10 minuti möödudes. Kogutud proovidest valmistatud WCE-l viidi läbi immunoprecipitatsioon antikehadega 3F12 (K8R) ja 1E2 (wt). Tulemusi analüüsiti qPCR-il alg (graafik A), 3,5k (graafik B), 5k (graafik C) ja 9,3k (graafik D) oligonukleotiididega. Tulemused normaliseeriti *Chr8*-ga. Esitatud on 2 katse keskmised koos keskmise hälbiga.

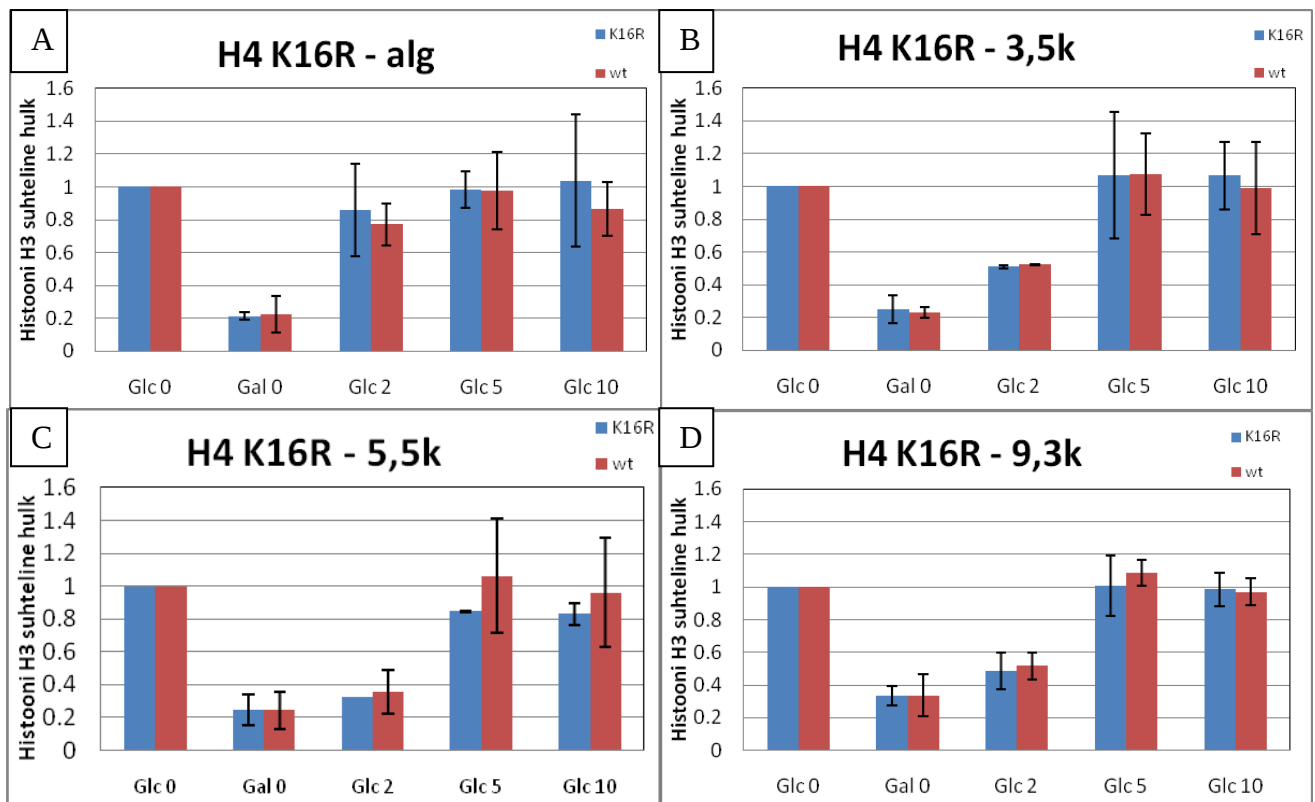
Mutatsiooniga K8R nukleosoomide hulk on veidi suurem metsiktüübiga võrreldes geeni kodeeriva ala keskosas (Joonis 16, B ja C), kuid nukleosoomse struktuuri taastamise kiirus on üldiselt sarnane. 3,5k piirkonnas on 2 minutit pärast induktsiooni lõppemist histoonide hulk olemata mutatsioonist kahekordistunud ning täielikult taastunud hiljemalt 3 minutit hiljem (Joonis 16, B). Geeni lõpus on K8R mutatsiooniga tüves 5 minutit pärast induktsiooni lõppu

histoonide hulk veidi väiksem metsiktüübiga võrreldes ning täiesti võrdset taset ei saavuta see ka 10 minutit pärast induktsiooni lõppemist (Joonis 16, D).



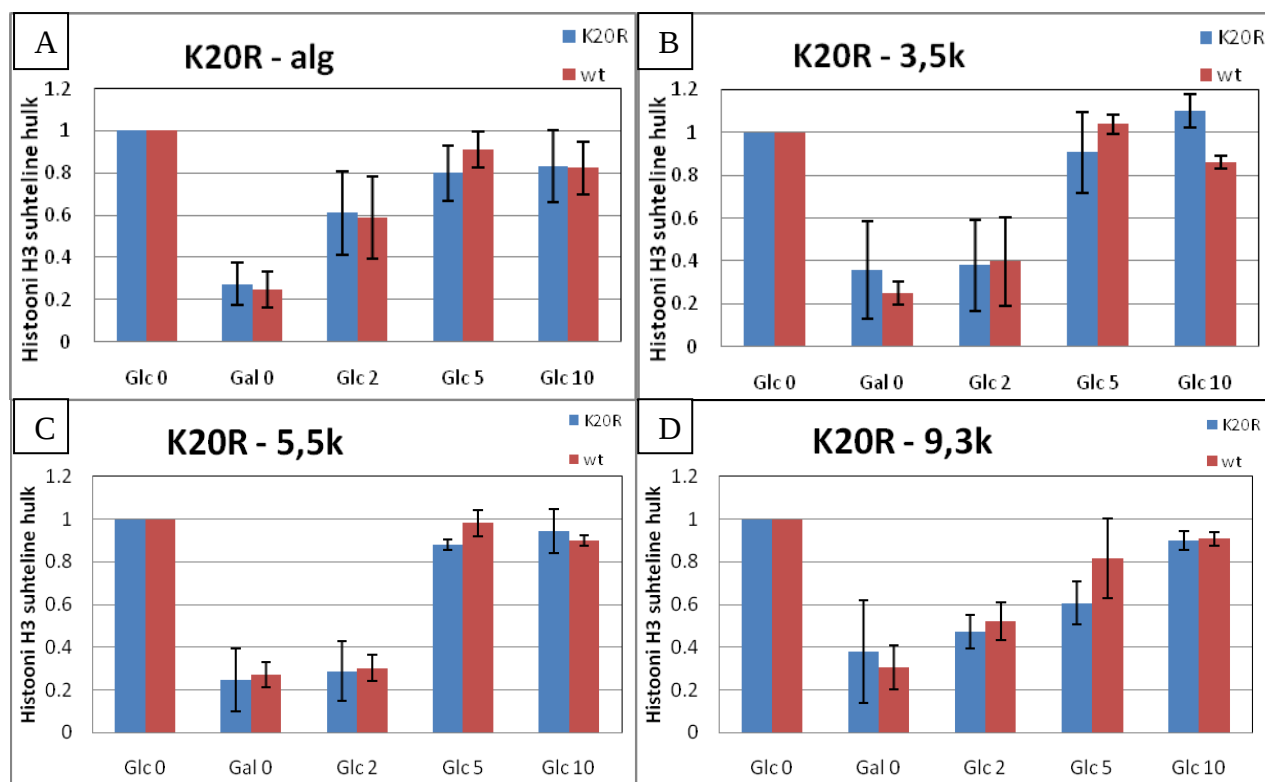
Joonis 17. Nukleosoomse struktuuri taastumine *GAL* – *VPS13* kodeerivas alas pärast geeni induktsiooni lõppemist tüves AK244. Glükoosis (2%) eelkasvatatud rakke kasvatati üleöö glükoosi (2%) ja galaktoosi (2%) sisaldavates söötmetes, segati mutantne ja metsiktüüpi tüvi mõlemas söötmes eraldi, pärast kooskasvamist fikseeriti glükoosis kultuuril ajapunkt 'Glc 0', mille tulemused võeti võrdseks ühega (nukleosoomide hulk indutseerimata olekus) ning galaktoosis kultuuril ajapunkt 'Gal 0' (nukleosoomide hulk indutseeritud olekus). Galaktoosi sisaldav sööde vahetati glükoosi sisaldava (2%) söötme vastu ning fikseeriti ajapunktid 2 minuti, 5 minuti ja 10 minuti möödudes. Kogutud proovidest valmistatud WCE-l viidi läbi immunopretsipitatsioon antikehadega 3F12 (K12R) ja 1E2 (wt). Tulemusi analüüsiti qPCR-il alg (graafik A), 3,5k (graafik B), ja 9,3k (graafik C) oligonukleotiididega. Tulemused normaliseeriti *Chr8*-ga. Esitatud on 2 katse keskmised koos keskmise hälbiga.

Indutseeritud transkriptsiooni tingimustes on mutatsiooniga K12R nukleosoomide hulk metsiktüübiga võrreldes suurem kogu geeni kodeerivas alas (Joonis 17, A-C), seda kinnitab ka selle erinevuse püsimine geeni 9,3k piirkonnas 2 minutit pärast transkriptsiooni initsiatsiooni lõppemist (Joonis 17, C, Glc 2 min). Mutatsioonist sõltumata on nukleosoomse struktuuri taastamise kiirus üldiselt sarnane. Geeni alguses kulub histoonide algtase taastunud hiljemalt 2 minutit pärast transkriptsiooni represseerimist, geeni lõpus kulub selleks rohkem aega ning algtase on taastunud hiljemalt 5 minutit pärast transkriptsiooni represseerimist.



Joonis 18. Nukleosoomse struktuuri taastumine *GAL* – *VPS13* kodeerivas alas pärast geeni induktsiooni lõppemist tüves AK262. Glükoosis (2%) eelkasvatatud rakke kasvatati üleöö glükoosi (2%) ja galaktoosi (2%) sisaldavates söötmetes, segati mutantne ja metsiktüüpi tüvi mõlemas söötmes eraldi, pärast kooskasvamist fikseeriti glükoosiga kultuuril ajapunkt 'Glc 0', mille tulemused võeti võrdseks ühega (nukleosoomide hulk indutseerimata olekus) ning galaktoosiga kultuuril ajapunkt 'Gal 0' (nukleosoomide hulk indutseeritud olekus). Galaktoosi sisaldav sööde vahetati glükoosi sisaldava (2%) söötme vastu ning fikseeriti ajapunktid 2 minuti, 5 minuti ja 10 minuti möödudes. Kogutud proovidest valmistatud WCE-l viidi läbi immunopretsipitatsioon antikehadega 3F12 (K16R) ja 1E2 (wt). Tulemusi analüüsiti qPCR-il alg (graafik A), 3,5k (graafik B), 5,5k (graafik C) ja 9,3k (graafik D) oligonukleotiididega. Tulemused normaliseeriti *Chr8*-ga. Esitatud on 2 katse keskmised koos keskmise hälbiga.

Mutatsioon K16R ei oma selget efekti nukleosoomse struktuuri taastumisele pärast geeni induktsiooni lõppemist (Joonis 18). Geeni alguses taastub nukleosoomide hulk hiljemalt 2 minuti jooksul (18, A), 3,5k geenipiirkonnas on selleks ajaks histoonide hulk kahekordistunud ning indutseerimata olekuga sarnane tase saavutatakse hiljemalt 5 minutiga alates induktsiooni lõppemisest (18, B). Geeni kodeeriva ala teises pooles toimub histoonide hulga taastumine pärast 2 minuti kuid enne 5 minuti möödumist transkriptsiooni repressioonist (18, C ja D).



Joonis 19. Nukleosoomse struktuuri taastumine *GAL* – *VPS13* kodeerivas alas pärast geeni induktsiooni lõppemist tüves AK288. Glükoosis (2%) eelkasvatatud rakke kasvatati üleöö glükoosi (2%) ja galaktoosi (2%) sisaldavates söötmetes, segati mutantne ja metsiktüüpi tüvi mõlemas söötmes eraldi, pärast kooskasvamist fikseeriti glükoosiga kultuuril ajapunkt 'Glc 0', mille tulemused võeti võrdseks ühega (nukleosoomide hulk indutseerimata olekus) ning galaktoosiga kultuuril ajapunkt 'Gal 0' (nukleosoomide hulk indutseeritud olekus). Galaktoosi sisaldav sööde vahetati glükoosi sisaldava (2%) söötme vastu ning fikseeriti ajapunktid 2 minuti, 5 minuti ja 10 minuti möödudes. Kogutud proovidest valmistatud WCE-l viidi läbi immunopretsipitatsioon antikehadega 3F12 (K20R) ja 1E2 (wt). Tulemusi analüüsiti qPCR-il alg (graafik A), 3,5k (graafik B), 5,5k (graafik C) ja 9,3k (graafik D) oligonukleotiididega. Tulemused normaliseeriti *Chr8*-ga. Esitatud on 2 katse keskmised koos keskmise hälbiga.

Võrreldes mõjuga nukleosoomide eemaldamisele pärast transkriptsiooni initsiatsiooni, ei ole mutatsiooni K20R efekt nukleosoomse struktuuri taastamisele pärast initsiatsiooni lõppemist nii selge (Joonis 19). Geeni algusosas toimub nukleosoomide hulga osaline taastumine juba 2 minutit pärast induktsiooni lõppemist (19, A), kuid geeni keskosas on sel ajal muutused nukleosoomide hulgas väikesed (B,C). Algtaseme saavutab nukleosoomide hulk kõigis eelmainitud piirkondades hiljemalt 5 minutit pärast induktsiooni lõppu. 9,3k piirkonnas (19, D) toimub vähene histoonide hulga suurenemine 2 minutit pärast glükoosi lisamist. 5 minutit pärast transkriptsiooni represseeriva suhkru lisamist on metsiktüüpi nukleosoomide tase peaaegu taastunud, kuid mutatsiooniga nukleosoomide tase vaid veidi suurenenud – algtaseme lähedale jõuab see alles 10 minutit pärast induktsiooni lõppemist

ARUTELU

On teada, et lühikestes kõrgelt transkribeeritavates geenides on histoonide hulk oluliselt vähenenud. Histoonide eemaldamise protsessi ajalise ja ruumilise dünaamika kohta sellistes geenides on vähe teada. Enamus uuritud pärmi geene on olnud lühikesed (1-2 kb). Uurides pagaripärmi histooni H4 N-terminaalsete mutatsioonide mõju nukleosoomide eemaldamise dünaamikale pikal geenil transkriptsiooni indutseerimisel ning repressseerimisel, selgusid teatavad üldised seaduspärasused:

- 1) Nukleosoomide eemaldamine pärast transkriptsiooni indutseerimist on kiirem promootori lähedal ning aeglustub promootorist kaugemal.
- 2) Nukleosoomide eemaldamise ulatus on suurem promootorile lähemal ning väheneb promootorist kaugemal.
- 3) Nukleosoomse struktuuri taastumine pärast transkriptsiooni induktsiooni lõppemist toimub seda aeglasemalt, mida kaugemal on uuritav piirkond promootorist.
- 4) Nukleosoomide eemaldamine transkriptsiooni käigus on oluliselt aeglasem protsess kui nukleosoomse struktuuri taastumine – nukleosoomide miinimumtase saavutatakse 2-4 tundi pärast induktsiooni algust, kuid nukleosoomse struktuuri taastumiseks kulub 2-5 minutit.
- 5) Histooni H4 N-terminaalsed modifikatsioonid mõjutavad nukleosoomide dünaamikat erinevates geenipiirkondades erineval ajal, kuid ei oma või omavad vähest mõju nukleosoomide lõpphulgale pärast transkriptsiooni indutseerimist või repressseerimist.

Üksikud histooni H4 N-terminaalsete lüsiinide mutatsioonid positsioonides K5, K8, K12, K16 ja K20 omavad erinevat efekti nukleosoomide dünaamikale geeni indutseeritud transkriptsiooni aktiveerimise ja repressseerimise järel.

Lüsiinide K8 ja K12 puhul on näha histoonide kiirem eemaldamine geeni keskosas vahetult pärast transkriptsiooni initsiatsiooni (Joonis 11 ja 12), kuid sama selge mõju geeni alguses ega lõpus ei ole täheldatav. Nukleosoomse struktuuri taastumine pärast transkriptsiooni repressseerimist ei ole mutatsioonide poolt oluliselt mõjutatud.

Lüsiin 5 puhul ei ole näha suuremaid erinevusi metsiktüübiga võrreldes ei transkriptsiooni initsieerimise ega repressseerimise järel (Joonis 10) ning histoonide ulatus ning dünaamika on sarnane võrreldes metsiktüübiga. Kuna mutatsioon K5R ei vähenda polümeraasi hulka, on see tulemus sarnane varemavaldatuga.

Kuna histoonide lõpptase transkriptsiooni initsieerimise järel on mutatsioone K5R, K8R ja K12R sisaldavates tüvedes sarnane metsiktüübiga, transkriptsiooni on vähetõenäoline, et väikesed erinevused histoonide eemaldamise kiiruses mõjutavad geenide ekspressiooni üldist taset. See langeb kokku varem avaldatud tulemustega nende mutatsioonide mõjust geeniekspressioonile – üksikmutatsioonid nendes positsioonides mõjutavad väheste geenid ekspressiooni ning mõjutatavad geenid kattuvad nende mutantide puhul (Dion, 2005).

H4 K16Ac on aktiivse kromatiiniga seostatud märges ning hüpoatsetüleeritus selles positsioonis on seotud heterokromatiini leviku ja säilitamisega. Katsetulemustes K16R mutatsiooni sisaldavas tüves on täheldatav nukleosoomide kiirem eemaldamine geeni esimese kolmandiku piirimail, kuid samas on nähtav nukleosoomide hulga suurenemine 2 kb eemal geeni keskel. (Joonis 13, B ja C). Selle põhjuseks võib olla nukleosoomide libistamine (*sliding*) mööda geeni. Kuna on näidatud, et H4K16Ac takistab nukleosoomide libistamist *in vitro* histooni chaperon ACF poolt (Shogren-Knaak et al, 2006), siis on võimalik, et selle positsiooni atsetüleerimatus soodustab nukleosoomide liigutamist DNA-l. Kuna histoonide eemaldamise ulatus 4 tundi pärast induktsiooni algust on mõlemas piirkonnas sarnane, võib tegemist olla ajutise nähtusega vahetult pärast transkriptsiooni initsiatsiooni. Geeni transkriptsiooni represseerimise järel ei ole suuri erinevusi nukleosoomse struktuuri taastumisel K16R modifikatsiooniga ja metsiktüüpi tüves (Joonis 18). Histoonide hulk suureneb 3,5k piirkonnas kiiremini kui 5,5k piirkonnas, kuid see ei ole üllatav, sest algtase on mõlemas piirkonnas sarnane.

Kõige selgemat mõju nukleosoomide dünaamikale omab mutatsioon H4 K20R. Transkriptsiooni indutseerimise järel toimub mutatsiooniga histoonide eemaldamine metsiktüübist kiiremini geeni algusest keskpaigani, kuid erineb vähem geeni lõpuosas (Joonis 14). See tulemus on üllatuslik, sest lüsiin 20 modifitseerimist pagaripärmis on küll leitud (Garcia et al., 2007), kuid selle bioloogilist rollist või modifikatsiooni läbiviivatest ensüümidest ei ole midagi teada. Võib olla, et antud positsioonis lüsiin mingi(te) valgu(kude) seondumismotiivi osaks, mida tavaolukorras lüsiini modifitseerimisega varjatakse. Sellesarnane mehhanism toimib näiteks Sir3 valgu puhul, mille seondumiseks on olulised H4 N-terminaalsete aminohapete 16-20 moodustatud aluseline motiiv ning Sir3 seondumist takistab H4K16 atsetüleerimine (Millar et al, 2004). Huvitav on asjaolu, et pärast transkriptsiooni represseerimist toimub nukleosoomse struktuuri taastumine mutatsiooni kontekstis väikese hilinemisega ainult geeni lõpuosas, teistes piirkondades olulisi erinevusi võrreldes metsiktüübiga pole (Joonis 19). Seega võiks pigem tegemist olla mingi

transkriptsiooni elongatsiooniga seotud mehhanismiga, kus metsiktüüpi rakkudes on H4K20 varjatud mingi lüsiini modifikatsiooniga, kuid H4K20R tüves on tänu arginiini atsetüleerimatussele modifitseerimine võimatu ning valk saab seonduda.

Siinkohal peaks välja tooma ka mõned eksperimendi ülesehitusega seotud asjaolud. Kuna tegemist on kunstliku süsteemiga, kus kasvava pärmi süsinikuallika vahetus toimub täielikult ning väga kiiresti, siis võib kahelda saadud tulemuste bioloogilises tähtsuses, sest pärm ei ole kohastunud süsinikuallika täielikuks muutumiseks mõne sekundi jooksul. Ka peab saadud tulemuste analüüsimisel arvestama katse metoodika spetsiifikat, sest tegelikult on vähe teada qPCR-i oligonukleotiidide ning võrdlusgeenide sobivusest. Kuna mitmetes tüvedes on selge efekt nähtav 1 või 2 praimerite paariga, on raske otsustada, kas artefakt on efekti olemasolu teatud praimeritega, selle puudumine ülejäänud praimeritega või nähtav tulemus vastab tegelikkusele. Katsete käigus selgus, et mõnede praimerite tulemuse kvaliteet sõltub oluliselt DNA hulgast (seda just eriti 5k oligonukleotiidide puhul), seepärast on lisaks kasutatud ka 5,5k või 6,4k oligonukleotiide.

Sobivate võrdlusgeenide leidmine ja nende sobivuse hindamine on viimasel ajal väga palju diskussioone tekitanud ning RT-qPCR (*reverse transcriptase qPCR*, pöördtranskriptaasiga kvantitatiivne PCR) jaoks on välja töötatud nimekiri andmetest eksperimendi kohta, mille peaks teadustöö autorid esitama, et tagada andmete kvaliteedi hindamise ning töö reprodutseerimise võimalikkus (Bustin et al, 2009). Kuna tegemist on veidi erineva metoodikaga, milles qPCR-le eelneb RNA pöördtranskriptsioon, ei saa kõike otseselt üle kanda otse DNA-lt tehtavale qPCR-le. Siiski on selge, et võrdlusgeenide hindamine on siiski oluline ka qPCR-i katsete jaoks ning sobivuse põhjendamine on vajalik. RT-qPCR katsetes soovivad juhendi autorid igas katses kasutada vähemalt sobivat 3-5 võrdlusgeeni, mis on välja valitud vähemalt 10 seast. Antud töös esitatud katsetes on lisaks *Chr8*-le kasutatud kontrollina ka *FBA1*, et võimalikud põhjendamatud kõikumised *Chr8* tasemes oleks leitavad.

KOKKUVÕTE

Eukarüootsetes rakkudes on DNA pakitud kromatiini. Kromatiini põhiliseks ühikuks on nukleosoom, mille moodustab histoonide oktameeri (2 koopiat histoonide H2A, H2B, H3 ja H4) on keerdunud 146 aluspaari DNA-d. Kromatiini struktuur on takistuseks DNA-ga seotud rakuliste protsesside toimumiseks ning DNA-le ligipääsu võimaldamiseks on vajalik kromatiini remodelleerimine. Histoonidel toimuvad post-translatsioonilised modifikatsioonid mõjutavad kromatiini struktuuri tekkimist ja muutmist.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* nukleosoomide eemaldamise dünaamikat pikal geenil transkriptsiooni indutseerimise ning repressiooniga käigus. Lisaks on uuritud histooni H4 N-terminuse positsioonide lüsiin 5, 8, 12 ja 16 muteerimise mõju sellele dünaamikale.

Katsetes selgus, et nukleosoomide eemaldamise kiirus ja ulatus pärast transkriptsiooni indutseerimist on kiirem promootori lähedal ning aeglustub promootorist kaugemal. Nukleosoomse struktuuri taastumine pärast transkriptsiooni repressiooniga toimub samuti kiiremini promootorile lähemal olevates geenipiirkondades. Nende kahe protsessi ajaskaala on väga erinev – histoonide eemaldamise lõpliku tasemeni jõudmiseks kulub 2-4 tundi alates transkriptsiooni indutseerimisest, kuid nukleosoomne struktuur taastub juba 2-5 minutit pärast transkriptsiooni repressiooniga.

Käesolevas töös uuritud histooni H4 modifikatsioonide mõju nukleosoomide dünaamikale sõltub geeni piirkonnast ja ajahetkest, kuid lõplikku histoonide taset pärast transkriptsiooni induktsiooni või repressiooni nad ei mõjuta või mõjutavad vähe.

Kõigist uuritud mutatsioonidest on kõige suurem mõju lüsiini 20 asendamisel arginiiniga. Seda mutatsiooni sisaldavate histoonide eemaldamine on kiirem võrreldes metsiktüüpi histoonidega. See on üllatav tulemus, sest praeguste teadmiste kohaselt ei ole H4 K20 aktiivselt post-translatsiooniliselt modifitseeritav aminohappejääk pagaripärmis. On võimalik, et see positsioon on osa mingi elongatsiooniga seotud valgu äratundmiskohast ning tavaolekus on seondumine takistatud mõne lüsiini varjava modifikatsiooni poolt.

SUMMARY

Chromatin is the state in which DNA is packaged within eukaryotic cells. The nucleosome is the basic unit of chromatin and it is composed of an octamer of the four core histones (2 copies of H2A, H2B, H3 and H4) around which 147 base pairs of DNA is wrapped.

Cellular processes like transcription, replication etc. need to loosen the inter- and intranucleosomal connections to gain access to DNA. The post-translational modifications of histones have a substantial role in the determination and alteration of the structure of chromatin.

The aim of this study was to explore the dynamics of nucleosome removal and redistribution upon the induction and repression of transcription of a long gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Also the effect of N-terminal mutations of histone H4 at lysines 5, 8, 12, 16 and 20 on this process was studied.

The results of this work show that after the induction of transcription histones are evicted more rapidly and to a larger extent in the areas closer to the promoter. The dynamics of histone redeposition to DNA is similarly quicker and more extensive in promoter proximal areas of the gene. The timescale of these two processes differs greatly – the full scope of histone removal is reached 2-4 hours after transcription initiation but chromatin structure is restored already in 2-5 minutes after repressing transcription.

The N-terminal modifications of histone H4 investigated in this study affect the nucleosome dynamics in different regions of the gene at different times, but they have a mild or no effect to the final amount of nucleosomes after induction or repression of transcription.

Of all the mutations investigated, the mutation of H4 K20R affects the nucleosome dynamics most severely. The removal of histones with this mutation is quicker compared to the removal of wild type histones. This is a surprising result because to current knowledge H4 lysine 20 is not actively modified post-translationally in *Saccharomyces cerevisiae*. It is possible that this position is part of the recognition motive of some protein associated with elongation and the lysine is covered with some modification in wild type cells.

KIRJANDUSE LOETELU

- Adkins MW, Tyler JK (2006) Transcriptional activators are dispensable for transcription in the absence of Spt6-mediated chromatin reassembly of promoter regions. *Molecular cell* 21(3): 405-416
- Akhtar A, Becker PB (2000) Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol Cell* 5(2): 367-375
- Allfrey VG, Mirsky AE (1964) Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science* 144(3618): 559
- Angelov D, Vitolo JM, Mutskov V, Dimitrov S, Hayes JJ (2001) Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(12): 6599-6604
- Arents G, Moudrianakis EN (1995) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(24): 11170-11174
- Boeger H, Griesenbeck J, Strattan JS, Kornberg RD (2003) Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Molecular cell* 11(6): 1587-1598
- Bortvin A, Winston F (1996) Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science (New York, NY)* 272(5267): 1473-1476
- Burgio G, La Rocca G, Sala A, Arancio W, Di Gesu D, Collesano M, Sperling AS, Armstrong JA, van Heeringen SJ, Logie C, Tamkun JW, Corona DF (2008) Genetic identification of a network of factors that functionally interact with the nucleosome remodeling ATPase ISWI. *PLoS Genet* 4(6): e1000089
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4): 611-622
- Cairns BR (2009) The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* 461(7261): 193-198
- Campos EI, Reinberg D (2009) Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet* 43: 559-599
- Carey M, Li B, Workman JL (2006) RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation. *Mol Cell* 24(3): 481-487
- Chandy M, Gutierrez JL, Prochasson P, Workman JL (2006) SWI/SNF displaces SAGA-acetylated nucleosomes. *Eukaryot Cell* 5(10): 1738-1747
- Chatterjee C, Muir TW (2010) Chemical approaches for studying histone modifications. *J Biol Chem* 285(15): 11045-11050

- Chen L, Widom J (2004) Molecular basis of transcriptional silencing in budding yeast. *Biochem Cell Biol* 82(4): 413-418
- Chubb JR, Trcek T, Shenoy SM, Singer RH (2006) Transcriptional pulsing of a developmental gene. *Curr Biol* 16(10): 1018-1025
- Clapier CR, Cairns BR (2009) The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 78: 273-304
- Clapier CR, Nightingale KP, Becker PB (2002) A critical epitope for substrate recognition by the nucleosome remodeling ATPase ISWI. *Nucleic Acids Res* 30(3): 649-655
- Congdon LM, Houston SI, Veerappan CS, Spektor TM, Rice JC (2010) PR-Set7-mediated monomethylation of histone H4 lysine 20 at specific genomic regions induces transcriptional repression. *J Cell Biochem* 110(3): 609-619
- Corona DF, Clapier CR, Becker PB, Tamkun JW (2002) Modulation of ISWI function by site-specific histone acetylation. *EMBO Rep* 3(3): 242-247
- Daniel JA, Pray-Grant MG, Grant PA (2005) Effector proteins for methylated histones: an expanding family. *Cell Cycle* 4(7): 919-926
- Darzacq X, Shav-Tal Y, de Turris V, Brody Y, Shenoy SM, Phair RD, Singer RH (2007) In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nat Struct Mol Biol* 14(9): 796-806
- Dawson SC, Sagolla MS, Cande WZ (2007) The cenH3 histone variant defines centromeres in *Giardia intestinalis*. *Chromosoma* 116(2): 175-184
- Dion MF, Altschuler SJ, Wu LF, Rando OJ (2005) Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(15): 5501-5506
- Dorigo B, Schalch T, Bystricky K, Richmond TJ (2003) Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J Mol Biol* 327(1): 85-96
- Du HN, Fingerman IM, Briggs SD (2008) Histone H3 K36 methylation is mediated by a trans-histone methylation pathway involving an interaction between Set2 and histone H4. *Genes Dev* 22(20): 2786-2798
- Fingerman IM, Li HC, Briggs SD (2007) A charge-based interaction between histone H4 and Dot1 is required for H3K79 methylation and telomere silencing: identification of a new trans-histone pathway. *Genes Dev* 21(16): 2018-2029
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37(4): 391-400
- Fuchs SM, Laribee RN, Strahl BD (2009) Protein modifications in transcription elongation. *Biochim Biophys Acta* 1789(1): 26-36

Fuda NJ, Ardehali MB, Lis JT (2009) Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature* 461(7261): 186-192

Galarneau L, Nourani A, Boudreault AA, Zhang Y, Heliot L, Allard S, Savard J, Lane WS, Stillman DJ, Cote J (2000) Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Molecular cell* 5(6): 927-937

Garcia BA, Hake SB, Diaz RL, Kauer M, Morris SA, Recht J, Shabanowitz J, Mishra N, Strahl BD, Allis CD, Hunt DF (2007) Organismal differences in post-translational modifications in histones H3 and H4. *J Biol Chem* 282(10): 7641-7655

Goldmark JP, Fazzio TG, Estep PW, Church GM, Tsukiyama T (2000) The Isw2 chromatin remodeling complex represses early meiotic genes upon recruitment by Ume6p. *Cell* 103(3): 423-433

Grant PA, Duggan L, Cote J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, Ohba R, Owen-Hughes T, Allis CD, Winston F, Berger SL, Workman JL (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes & development* 11(13): 1640-1650

Grant PA, Eberharter A, John S, Cook RG, Turner BM, Workman JL (1999) Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem* 274(9): 5895-5900

Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Pannuti A, Lucchesi JC (1997) mof, a putative acetyl transferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in Drosophila. *EMBO J* 16(8): 2054-2060

Horz W, Zachau HG (1980) Deoxyribonuclease II as a probe for chromatin structure. I. Location of cleavage sites. *J Mol Biol* 144(3): 305-327

Hsu JM, Huang J, Meluh PB, Laurent BC (2003) The yeast RSC chromatin-remodeling complex is required for kinetochore function in chromosome segregation. *Mol Cell Biol* 23(9): 3202-3215

Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403(6771): 795-800

Ito T, Ikehara T, Nakagawa T, Kraus WL, Muramatsu M (2000) p300-mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A-H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone. *Genes Dev* 14(15): 1899-1907

Iyer V, Struhl K (1996) Absolute mRNA levels and transcriptional initiation rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(11): 5208-5212

Izban MG, Luse DS (1992) The RNA polymerase II ternary complex cleaves the nascent transcript in a 3'----5' direction in the presence of elongation factor SII. *Genes Dev* 6(7): 1342-1356

Juven-Gershon T, Kadonaga JT (2010) Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol* 339(2): 225-229

Kao CF, Hillyer C, Tsukuda T, Henry K, Berger S, Osley MA (2004) Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B. *Genes Dev* 18(2): 184-195

- Katsani KR, Mahmoudi T, Verrijzer CP (2003) Selective gene regulation by SWI/SNF-related chromatin remodeling factors. *Current topics in microbiology and immunology* 274: 113-141
- Kim HJ, Seol JH, Han JW, Youn HD, Cho EJ (2007) Histone chaperones regulate histone exchange during transcription. *The EMBO journal* 26(21): 4467-4474
- Kimura A, Umehara T, Horikoshi M (2002) Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing. *Nat Genet* 32(3): 370-377
- Kimura H, Cook PR (2001) Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *The Journal of cell biology* 153(7): 1341-1353
- Kireeva ML, Walter W, Tchernajenko V, Bondarenko V, Kashlev M, Studitsky VM (2002) Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Molecular cell* 9(3): 541-552
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4): 693-705
- Kristjuhan A, Svejstrup JQ (2004) Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo. *Embo J* 23(21): 4243-4252
- Kurdistan SK, Tavazoie S, Grunstein M (2004) Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* 117(6): 721-733
- Landsman D (1996) Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*: a double mystery solved? *Trends Biochem Sci* 21(8): 287-288
- Lee C, Li X, Hechmer A, Eisen M, Biggin MD, Venters BJ, Jiang C, Li J, Pugh BF, Gilmour DS (2008) NELF and GAGA factor are linked to promoter-proximal pausing at many genes in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* 28(10): 3290-3300
- Lee CK, Shibata Y, Rao B, Strahl BD, Lieb JD (2004) Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nature genetics* 36(8): 900-905
- Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72(1): 73-84
- Lee TI, Young RA (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual review of genetics* 34: 77-137
- Li J, Langst G, Grummt I (2006) NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes. *EMBO J* 25(24): 5735-5741
- Liu CL, Kaplan T, Kim M, Buratowski S, Schreiber SL, Friedman N, Rando OJ (2005) Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol* 3(10): e328
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648): 251-260

Ma XJ, Wu J, Altheim BA, Schultz MC, Grunstein M (1998) Deposition-related sites K5/K12 in histone H4 are not required for nucleosome deposition in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12): 6693-6698

Malik HS, Henikoff S (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* 10(11): 882-891

Millar CB, Kurdistani SK, Grunstein M (2004) Acetylation of yeast histone H4 lysine 16: a switch for protein interactions in heterochromatin and euchromatin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69: 193-200

Murray K (1964) The Occurrence of Epsilon-N-Methyl Lysine in Histones. *Biochemistry* 3: 10-15

Mutskov V, Gerber D, Angelov D, Ausio J, Workman J, Dimitrov S (1998) Persistent interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding. *Mol Cell Biol* 18(11): 6293-6304

Ni Z, Saunders A, Fuda NJ, Yao J, Suarez JR, Webb WW, Lis JT (2008) P-TEFb is critical for the maturation of RNA polymerase II into productive elongation in vivo. *Mol Cell Biol* 28(3): 1161-1170

Oda H, Okamoto I, Murphy N, Chu J, Price SM, Shen MM, Torres-Padilla ME, Heard E, Reinberg D (2009) Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Mol Cell Biol* 29(8): 2278-2295

Olins DE, Olins AL (2003) Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(10): 809-814

Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4(4): 281-300

Patterson HG, Landel CC, Landsman D, Peterson CL, Simpson RT (1998) The biochemical and phenotypic characterization of Hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273(13): 7268-7276

Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503-533

Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolzheimer E, Zeitlinger J, Lewitter F, Gifford DK, Young RA (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122(4): 517-527

Reinke H, Horz W (2003) Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol Cell* 11(6): 1599-1607

Richmond TJ, Davey CA (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423(6936): 145-150

Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311(5986): 532-537

Rusche LN, Kirchmaier AL, Rine J (2003) The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* 72: 481-516

- Sanders SL, Portoso M, Mata J, Bahler J, Allshire RC, Kouzarides T (2004) Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* 119(5): 603-614
- Santoro R, Li J, Grummt I (2002) The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet* 32(3): 393-396
- Sasaki K, Ito T, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M (2009) Real-time imaging of histone H4 hyperacetylation in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(38): 16257-16262
- Scharf AN, Meier K, Seitz V, Kremmer E, Brehm A, Imhof A (2009) Monomethylation of lysine 20 on histone H4 facilitates chromatin maturation. *Mol Cell Biol* 29(1): 57-67
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18(11): 1251-1262
- Schwabish MA, Struhl K (2004) Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology* 24(23): 10111-10117
- Segal E, Fondufe-Mittendorf Y, Chen L, Thastrom A, Field Y, Moore IK, Wang JP, Widom J (2006) A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* 442(7104): 772-778
- Selth LA, Sigurdsson S, Svejstrup JQ (2010) Transcript Elongation by RNA Polymerase II. *Annu Rev Biochem* 79: 271-293
- Shahbazian MD, Grunstein M (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76: 75-100
- Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311(5762): 844-847
- Siino JS, Yau PM, Imai BS, Gatewood JM, Bradbury EM (2003) Effect of DNA length and H4 acetylation on the thermal stability of reconstituted nucleosome particles. *Biochem Biophys Res Commun* 302(4): 885-891
- Simic R, Lindstrom DL, Tran HG, Roinick KL, Costa PJ, Johnson AD, Hartzog GA, Arndt KM (2003) Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *Embo J* 22(8): 1846-1856.
- Smith CM, Gafken PR, Zhang Z, Gottschling DE, Smith JB, Smith DL (2003) Mass spectrometric quantification of acetylation at specific lysines within the amino-terminal tail of histone H4. *Anal Biochem* 316(1): 23-33
- Smith ER, Cayrou C, Huang R, Lane WS, Cote J, Lucchesi JC (2005) A human protein complex homologous to the Drosophila MSL complex is responsible for the majority of histone H4 acetylation at lysine 16. *Mol Cell Biol* 25(21): 9175-9188

Sobel RE, Cook RG, Perry CA, Annunziato AT, Allis CD (1995) Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(4): 1237-1241

Stedman E (1950) Cell specificity of histones. *Nature* 166(4227): 780-781

Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765): 41-45

Suka N, Luo K, Grunstein M (2002) Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat Genet* 32(3): 378-383

Talbert PB, Henikoff S (2010) Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(4): 264-275

Tse C, Sera T, Wolffe AP, Hansen JC (1998) Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* 18(8): 4629-4638

Turner BM (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22(9): 836-845

Turner BM, Birley AJ, Lavender J (1992) Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* 69(2): 375-384

Varv S, Kristjuhan K, Kristjuhan A (2007) RNA polymerase II determines the area of nucleosome loss in transcribed gene loci. *Biochemical and biophysical research communications* 358(2): 666-671

Värv S, Kristjuhan K, Kristjuhan A (2007) RNA polymerase II determines the area of nucleosome loss in transcribed gene loci. *Biochem Biophys Res Commun* 358(2): 666-671

Wang X, Hayes JJ (2008) Acetylation mimics within individual core histone tail domains indicate distinct roles in regulating the stability of higher-order chromatin structure. *Mol Cell Biol* 28(1): 227-236

Weake VM, Workman JL (2008) Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* 29(6): 653-663

White CL, Suto RK, Luger K (2001) Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *EMBO J* 20(18): 5207-5218

Whitehouse I, Rando OJ, Delrow J, Tsukiyama T (2007) Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature* 450(7172): 1031-1035

Yang H, Mizzen CA (2009) The multiple facets of histone H4-lysine 20 methylation. *Biochem Cell Biol* 87(1): 151-161

Yang H, Pesavento JJ, Starnes TW, Cryderman DE, Wallrath LL, Kelleher NL, Mizzen CA (2008) Preferential dimethylation of histone H4 lysine 20 by Suv4-20. *J Biol Chem* 283(18): 12085-12092

Yuan GC, Liu YJ, Dion MF, Slack MD, Wu LF, Altschuler SJ, Rando OJ (2005) Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* 309(5734): 626-630

Zhao J, Herrera-Diaz J, Gross DS (2005) Domain-wide displacement of histones by activated heat shock factor occurs independently of Swi/Snf and is not correlated with RNA polymerase II density. *Mol Cell Biol* 25(20): 8985-8999

LISA 1. Kromatiini immunosadestamise puhvrid.

PBS (10x, pH 7,4) 1000 ml

2 g KCl

80 g NaCl

17,8 g Na₂HPO₄·2H₂O

2,4 g KH₂PO₄

TE (10/1)

10 mM Tris – HCl pH 8,0

1 mM EDTA pH 8,0

FA – lüüsipuhver

50 mM Hepes – KOH pH 7,5

140 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X – 100

0,1% Na deoksühoolhape

Proteaaside inhibiitorite segu [1 mM PMSF (*phenylmethanesulphonylfluoride*), 1 µg/ml leupeptiin, 1 µg/ml pepstatiin)

FA500

50 mM Hepes – KOH pH 7,5

500 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X – 100

0,1% Na deoksühoolhape

LiCl pesulahu

10 mM Tris – HCl pH 8
250 mM LiCl (M_w 42,39)
0,5% NP – 40
0,5% Na deoksühoolhape
1 mM EDTA

TES

10 mM Tris – HCl pH 7,5
1 mM EDTA
100 mM NaCl

Elueerimispuhver

100 mM tris pH 7,8
10 mM EDTA
1% SDS
400 mM NaCl

TÄNUAVALDUSED

Soovin südamest tänada kõiki rakubioloogia õppetooli inimesi, kes on mind toetanud sellel pikal ja käänulisel teel. Eriline tänu minu juhendajale Arnold Kristjuhanile ja minu abijuhendajale Signe Värville.