

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

***Saccharomyces cerevisiae* mudelsüsteemi konstrueerimine uurimaks histoon H3  
atsetüleerimise olulisust kaheaahelalise DNA katke parandamises**

Bakalaureusetöö

Geenitehnoloogia

12 EAP

Hanna Sein

Juhendaja *PhD* Kadri Peil

TARTU 2017

## INFOLEHT

### ***Saccharomyces cerevisiae* mudelsüsteemi konstrueerimine uurimaks histoon H3 atsetüleerimise olulisust kaheahelalise DNA katke parandamises**

Pagaripärmi iga rakutsükli G1 faasis toimub HO-endonukleaasi indutseeritud DNA kaheahelalise katke tegemine, mis algatab paardumistüübi vahetuse. Selle katke parandamine toimub geenikonversiooni mehhanismiga. Laboratoorsetes tüvedes on HO-endonukleaasi ekspressioon tavaliselt inaktiveeritud. Käesolevas töös aga kasutatakse galaktoosi kontrolli all oleva promootoriga HO-endonukleaasi tehtud lõiget kaheahelalise katke parandamise uurimiseks mutantsete histoonidega *S. cerevisiae* tüvedes, kus valitud lüsiinijäägid histoonil H3 on muteeritud arginiinideks (K9R, K14R, K23R ja kolmekordne mutant K9,14,23R). Töö käigus leiti, et kõige tundlikum kaheahelalistele katketele on H3K9,14,23R mutatsioonidega tüvi. Üksikmutantide puhul efekti ei nähtud.

**Märksõnad:** HO-endonukleaas, kaheahelalise katke parandamine, histooni modifikatsioonid, *Saccharomyces cerevisiae*

**CERCS kood:** B220 Geneetika, tsütogeneetika

### **Construction of a *Saccharomyces cerevisiae* model system to study the importance of histone H3 acetylation in DNA double strand break repair**

The DNA double-strand break induced by HO endonuclease is an event in yeast cells, which takes place in the G1 phase of every cell cycle. This DSB may also induce a mating type switch, and it is repaired by the mechanism of gene conversion. The expression of HO endonuclease in laboratory strains is usually suppressed. However, here the DSB made by the HO endonuclease expressed under the galactose-inducible promoter was used to study the reparation of the DSB in different *S. cerevisiae* strains, where selected lysine residues of histone H3 were mutated into arginines (K9R, K14R, K23R and a triple mutant K9,14,23R). The results of the study showed that the triple mutant had the lowest growth rate, and therefore is the most sensitive one to the DSBR. No effect on the other tested mutants was detected.

**Keywords:** HO endonuclease, double-strand break repair, histone modifications, *Saccharomyces cerevisiae*

**CERCS code:** B220 Genetics, cytogenetics

## SISUKORD

INFOLEHT.....	2
Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus .....	7
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	8
1.1 Pagaripärm kui mudelorganism.....	8
1.2 Kromatiin.....	8
1.3 Histoonid .....	9
1.4 Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid .....	10
1.5 Pagaripärmi paardumistüübid.....	12
1.6 Pagaripärmi paardumistüübi vahetus .....	13
1.7 DNA kaheaheelaliste katkete parandamine mittehomooloogsete otste ühendamise mehhanismiga.....	16
1.8 Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid DNA kaheaheelalise katke parandamises .....	17
2 EKSPERIMENTAALNE OSA .....	18
2.1 Töö eesmärk .....	18
2.2 Materjalid ja meetodika.....	18
2.2.1 Kasutatud tüved, plasmiidid ja söötmed.....	18
2.2.2 Agaroosgeelelektroforees .....	19
2.2.3 DNA eraldamise meetodid .....	19
2.2.4 Kloneerimine .....	20
2.2.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> plasmidi transformatsioon liitiumatsetaadi meetodil .....	21
2.2.6 Lineaarse DNA fragmendi sisestamine pärmis genoomi homoloogilise rekombinatsiooni teel .....	22
2.2.7 DNA kaheaheelalist katket tegeva tüve kontrollsüsteem.....	22
2.2.8 Plasmidi vahetus.....	23

2.2.9 Lahjenduste rea analüüs.....	23
2.3 Tulemused. Arutelu .....	24
2.3.1 HO-endonukleaasi ekspresseeriva tüve konstrueerimine .....	24
2.3.2 Plasmidi pBlueScript_ADE2 kloneerimine.....	24
2.3.3 Plasmidi pBlueScript_ADE2_GAL_HO kloneerimine.....	26
2.3.4 Galaktoosiga indutseeritava HO-endonukleasiga DNA kaheahelalist katket tegeva pärmitüve kontroll .....	29
2.3.5 Plasmidivahetus ja kontroll .....	31
2.3.6 Lahjenduste rea analüüs.....	33
KOKKUVÕTE .....	36
Summary.....	37
KASUTATUD KIRJANDUS .....	38
LISAD .....	45
Lisa 1 .....	45
Lisa 2 .....	47
Lisa 3 .....	48
Lisa 4 .....	49
Tänuavaldused.....	51
Lihtlitsents .....	52

## **Kasutatud lühendid**

5-FOA – *5-Fluoroorotic acid*

ac – *acetylation* (atsetüleerimine)

ADE – **adeniin**

ap – **aluspaari**

ARS – *autonomously replicating sequence* (autonoomselt replitseeruv järjestus)

Asf1p- *anti-silencing function protein 1* (mittevaigistava funktsiooniga valk 1)

CEN – pärmi tsentromeerne järjestus

C-terminaalne – *carboxyl terminal* (karboksüül-terminaalne)

CSE4 – *Chromosome Segregation 4* (kromosoomide segregatsioon 4)

DSB – *double strand break* (kaheaahelaline katke)

DSBR – *double strand break repair* (kaheaahelalise katke parandamine)

EtBr – **etiidiumbromiid**

H1 – histoon H1

H2A – histoon H2A

H2B – histoon H2B

H3 – histoon H3

H4 – histoon H4

HAT – *histone acetyltransferase* (histoonide atsetüültransferaas)

HHF – *Histone H Four* (histoon H4)

HHO1 – *Histone H One* (histoon H1)

HHT – *Histone H Three* (histoon H3)

HIS – **histidiin**

HML – *hidden MAT left* (peidetud MAT vasakul)

HMR – *hidden MAT right* (peidetud MAT paremal)

HMT – *histone methyltransferase* (histoonide metüültransferaas)

*HTA* – *histone two A* (histoon kaks A)

*HTB* – *histone two B* (histoon kaks B)

*HTZ* – *histone two Z* (histoon kaks Z)

K – lüsiin

kb – *kilobasepair* (kiloaluspaar)

LEU – **leucine** (leutsiin)

LYS – **lysine** (lüsiin)

*MAT*-  *mating type* (paardumistüüp)

me – **metüleerimine**

MMS – **metüülmetaansulfonaat**

N-terminaalne – amino-terminaalne

NHEJ – *nonhomologous end joining* (mittehomoloogne otste ühendamine)

R – arginiin

RPA – *replication protein A* (replikatsiooni valk A)

TRP- *tryptophan* (trüptofaan)

U –*unit* (ühik)

URA – *uracil* (uratsiil)

wt – *wildtype* (metsiktüüp)

YPD – *yeast extract, peptone, dextrose* (pärmis ekstraktsioon, peptoon, dekstroos; kõiki pärmis eluks vajalikke komponente sisaldav pärmisööde)

## Sissejuhatus

Eukarüootsetes rakkudes on DNA histoonide abil tihedalt kokku pakitud struktuuri, mida nimetatakse kromatiiniks. DNA kromatiini pakkimise eesmärgiks on nii DNA mahutamine rakutuuma kui ka DNA-ga toimuvate protsesside korrektne reguleerimine. Histoonide ja DNA vaheliste interaktsioonidega mõjutatakse DNA-l opereerivate valkude ligipääsetavust DNA-le. Interaktsioone mõjutatakse nii kromatiini struktuuri ümberpakkimisega kui ka histoonide post-translatsiooniliste modifikatsioonidega. Modifitseerimine on võimalik nii histoonide C- kui ka N-terminaalsetes osades, kuid kõige rohkem modifikatsioonikohti on kirjeldatud histoonide väljaulatuvates mittestruktuursetes N-terminaalsetes osades. Levinuimad histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid on näiteks atsetüleerimine (lüsiin), metüleerimine (lüsiin ja arginiin) ning fosforüleerimine (seriin, treoniin ja türosiin). Erinevad post-translatsioonilised modifikatsioonid muudavad DNA ja histoonide vaheliste seoste tugevust, DNA kättesaadavust valgulistele faktoritele ning mõjutavad seeläbi nii transkriptsiooni, replikatsiooni kui ka DNA reparatsioonimehhanisme.

Käesolevas töös otsitakse seoseid histooni modifikatsioonide ning reparatsioonimehhanismide vahel. Kasutades mudelorganismina pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae*, loodi testsüsteem, kus mutantsete histoonidega pärmitüvedes indutseeritakse DNA kaheaheelalise katke teke. Muteeritud histoonides on teatud positsioonides asuvad lüsiinijäägid vahetatud arginiinijääkide vastu, kuivõrd arginiinijääke ei ole võimalik atsetüleerida. Seega on antud töö eesmärgiks kindlaks määrata, kas mõni uuritud konkreetsetest atsetüleerimiskohtadest mängib rolli ka DNA kaheaheelaliste katkete parandamisel.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

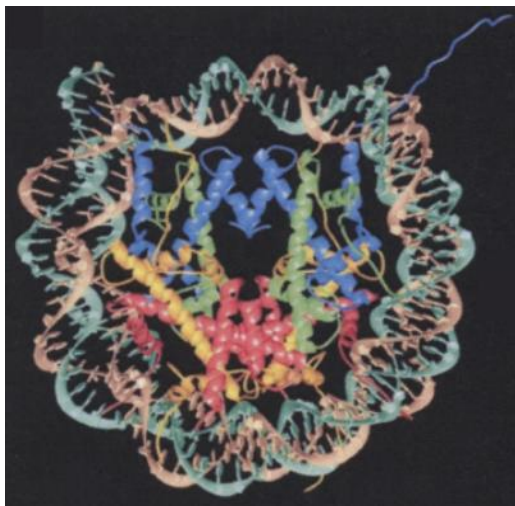
## 1.1 Pagaripärm kui mudelorganism

Mudelorganismid on teaduses kasutatavad liigid, mida on laboratoorsetes tingimustes kerge kasvatada ning millel on tänu lihtsamale ülesehitusele keerulisemate organismidega võrreldes eksperimentide läbiviimisel palju eeliseid. Uurimaks eukarüootsetes rakkudes toimivaid baasmehhanisme on pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae* juba pikka aega osutunud palju kasutatavaks mudelorganismiks. Hea näide pagaripärmi lihtsusest ilmneb histoonide uuringutel, kus võrreldes teise levinud mudelorganismi äädikakärbsega, on pärmil histoonide geenikoopiaid kaks, kuid äädikakärbsel 110 (Pérez-Martín, 1999). Pärm on teaduseksperimentides sobilik tänu kiirele kasvule, lihtsatele kasvutingimustele ning mitmekülgsetele DNA transformatsiooni ja mutantide isoleerimise võimalustele (Sherman, 2002). Pagaripärm jaguneb pungudes ning kui keskkonnas on piisavalt toitaineid, kahekordistub pärmirakkude arv umbes 100 minutiga (Herskowitz, 1988). Pagaripärm on kasutust leidnud ka inimhaiguste uurimisel. Juba enne suuremahulist genoomide sekveneerimise levikut oli selge, et imetajate ning pärmide geenid kodeerivad väga sarnaseid valke (Botstein ja Fink, 1988). Teadmine, et ligi 17% pagaripärmi umbes 6000-st geenist kuuluvad inimhaigustega seotud geeniperekonda (Heinicke et al., 2007), muudab pagaripärmi teadlaste jaoks veelgi atraktiivsemaks.

## 1.2 Kromatiin

Eukarüootsetes rakkudes on DNA rakutuumas pakitud kõrgelt konserveerunud kompleksi, mida nimetatakse kromatiiniks. Enamik *S.cerevisiae* geenidest asuvad eukromatiinis ehk kromosoomi regioonides, kus valkudel on hea ligipääs DNA-le ning transkriptsioon on aktiivne. Teine osa gene asub represseeritud regioonides ehk heterokromatiinis, kus DNA on kondenseerunud ning transkriptsioon vaigistatud (Tamaru, 2010). Põhilisteks kromatiini valkudeks, mille ümber DNA on keerdunud, on histoonid. Histoonid koos DNA-ga moodustavad nukleosoomi, kusjuures igas nukleosoomis on iga histoonimolekuli (H2A, H2B, H3 ja H4) kahes korduses ning H2A ja H2B ning H3 ja H4 molekulid moodustuvad omavahel dimeere (Sperling ja Bustin, 1976). Ühes nukleosoomi südamikus teeb 146 aluspaari pikkune

DNA 1,65 pöoret ümber histoonide oktameeri (joonis 1) (Luger et al., 1997). Nukleosoome ühendab linker-DNA, millega seonduvad linker-histoonid (H1), mis pakivad kromatiini veelgi kompaktsemasse struktuuri (Thoma ja Koller, 1977). Enamikel rakkudel on umbes üks H1 nukleosoomi kohta, kuid *S.cerevisiae*-l on lühema linker-DNA tõttu ka oluliselt väiksem päarmi H1 analoogi Hho1p hulk: umbes üks Hho1p molekul 37 nukleosoomi kohta (Freidkin ja Katcoff, 2001). Nukleosoomid osalevad lisaks kromatiini pakkimisele ka transkriptsiooni initsiatsiooni ja elongatsiooni represseerimisel ning kontrollil, raskendades transkriptsioonifaktorite ja vajalike valkude ligipääsetavust DNA-le (Walter et al. 1995).



**Joonis 1. Nukleosoomi struktuur.** Kujutatud on 4 histoonivalgu kahes korduses (sinine: H3; roheline: H4; kollane: H2A; punane: H2B), mida ümbritseb 146-aluspaarine DNA lõik. Näha on ka nukleosoomist välja ulatuvaid histoonide N-terminaalseid „sabasid“ (Luger et al., 1997).

### 1.3 Histoonid

Histoonid on lüsiini- ja arginiinirohked tugevalt positiivselt laetud valgud, mis osalevad rakutuumas negatiivselt laetud DNA pakkimisel, geeniregulatsioonis ning epigeneetilistes mehhanismides. Kirjeldatud on nii histoon-histoon kui ka histoon-DNA interaktsioone (Luger et al., 1997). Igal histoonil on tsentraalne histooni voldi domeen C-terminaalses osas ning struktureerimata N-terminaalne „saba“, mis ulatub nukleosoomist väljapoole ning on sihtmärgiks mitmetele post-translatsioonilistele modifikatsioonidele (Walter et al., 1995). Histoonide „sabad“ on olulised nii geenide aktivatsioonil kui ka repressioonil (Wan et al.,

1995) ning osalevad ka kromatiini kõrgemat järku struktuuride moodustumisel (Luger ja Richmond, 1998).

Pagaripärmis on nukleosoomsete histoonide geenide koopiaid kaks. Histooni H2A kodeerivad *HTA1* ja temaga peaaegu identne *HTA2* ning H2B-d kodeerivad *HTB1* ja temaga peaaegu identne *HTB2* (Hereford et al., 1979). Histooni H3 kodeerivad nii *HHT1* kui ka *HHT2* geenid ning histooni H4 kodeerivad *HHF1* ja *HHF2* geenid (Smith ja Murray, 1983). Pämirakkudel on ellu jäämiseks vajalik vaid üks *HHT-HHF* lookus (Smith ja Stirling, 1988). Lisaks kahes korduses esinevatele nukleosoomsete histoonide geenidele on pagaripärmis veel ühes korduses H2A.Z valku kodeeriv geen *HTZ1*, tsentromeerset H3 histooni kodeeriv geen *CSE4* ja H1 histooni kodeeriv geen *HHO1*. Tsentromeerne H3 valk seondub tsentromeeridega ning on vajalik kinetohoori moodustumiseks (Lefrançois et al., 2013) ning H2A.Z mängib rolli transkriptsiooni elongatsioonil (Santisteban et al., 2011). Kuigi *HHO1* geen on järjestuselt inimese H1 omale kõige sarnasem (Ushinsky et al., 1997), ei esine pagaripärmi Hho1p puudulikel rakkudel kasvundefekte ega suuri muutusi kromatiini struktuuris (Patterton et al., 1998), erinevalt deleteeritud H1 histooniga imetajate rakkudest (Thoma et al., 1979).

Nukleosoomsed histoonid on võrreldes histooniga H1 liikide vahel oluliselt konserveerunud. Näiteks histoonil H4 on pärmis ja inimese DNA järjestuste vahel 92% homoloogiat, samas kui *HHO1* ning inimese H1 järjestuste vahel on vaid 31% homoloogiat, (Harshman et al., 2013). Teisi nukleosoomseid histoone on enamusel eukarüootidel palju erinevaid alamtüüpe (Weber ja Henikoff, 2014).

Hiljuti on avastatud, et ilmselt täidab linker-histooni funktsiooni pärmis hoopis Hmo1 valk, millel on histoonidele iseloomulik lüsiinirikas „saba“ ning mis osaleb kromatiini kompaktsemaks muutmisel ja kaitseb linker-DNA-d nukleaasse aktiivsuse eest (Panday ja Grove, 2016).

#### **1.4 Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid**

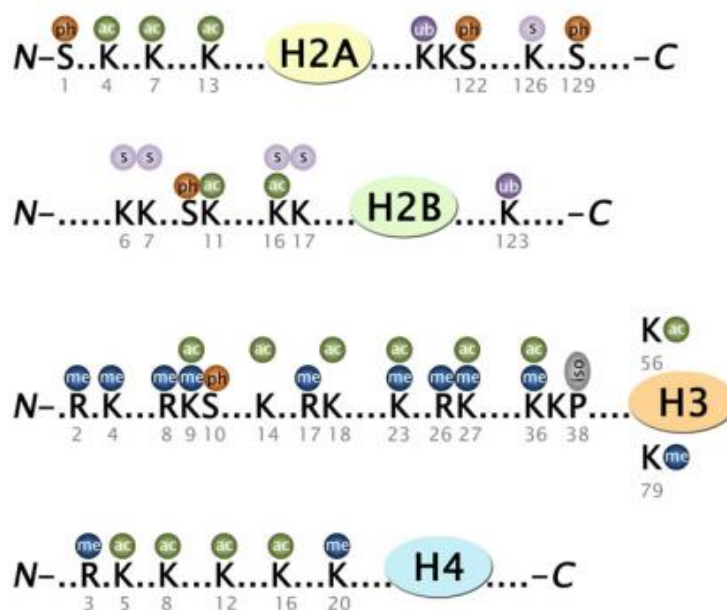
Kuigi histoonidel on kindel struktuur, on tänu paljudele post-translatsioonilistele modifitseerimise võimalustele histoonide omadused ajas muutuvad. Histoonidel on leitud üle 60 modifitseeritava aminohappejäagi (Kouzarides, 2007), millest enamused asuvad nukleosoomsete histoonide N-terminaalsetes „sabades“ (joonis 2). Uurituimad modifikatsioonid on atsetüleerimine (lüsiin), metüleerimine (lüsiin ja arginiin) ning

fosforüleerimine (seriin ja treoniin), kuid lisaks esineb veel ka ubikvitinüleerimist (lüsiin), sumoüleerimist (lüsiin), ADP ribosüleerimist (glutamaat), deimineerimist (arginiin) ning proliini isomerisatsiooni (Kouzarides, 2007). Modifikatsioonid nagu atsetüleerimine ja fosforüleerimine saavad muuta histooni „sabade“ laengut ning seeläbi kromatiini elektrostaatilisi mehhanisme, kuid paljud modifikatsioonid mõjutavad hoopis mittehistonsete valkude interakteerumist kromatiiniga. Kuigi N-terminaalsete „sabade“ modifikatsioonid on teaduses rohkem tähelepanu saanud, esineb neid ka histoonide C-terminaalsetes osades (Mersfelder ja Parthun, 2006).

Lüsiinijääkide atsetüleerimine, mis oli ka esimene kirjeldatud histoonide modifikatsioon (Phillips, 1963), neutraliseerib nende positiivse laengu ning seeläbi lõdvendab DNA ning histoonide omavahelist seost. Rohke atsetüleerimine on levinud *enhancer* elementidel ja geenipromootoritel (Wang et al., 2008), sest antud modifikatsioon muudab DNA valkudele ligipääsetavaks. Seetõttu loetakse atsetüülrühma lisamist transkriptsiooni aktiveerivaks modifikatsiooniks (Lee et al., 1993). Atsetüleerimist viivad läbi histooni atsetüültransferaasid (HAT-id), mis klassifitseeruvad erinevatesse perekondadesse ning on tihti ka pärmide ja inimeste vahel konserveerunud (Wang et al., 1997).

Kuid sugugi mitte iga atsetüleerimine ei tähenda transkriptsioonilist aktivatsiooni. Kuna modifikatsioonide kombinatsioonide mõju kromatiinile ning seal opereerivatele valkudele on varieeruv, on välja tulnud „histooni koodi“ hüpoteesiga (Strahl ja Allis, 2000). Näiteks histoon H4 12. lüsiinijäägi (H4K12) atsetüleerimine on seotud heterokromatiini tekkega (Turner, 2000). Ka fosforüleerimine, mis lisab histoonidele negatiivse laengu ning peaks seega vähendama histoonide ning DNA vahelise interaktsiooni tugevust, on mitoosis H3S10 positsioonis levinud üle terve genoomi ning seda seostatakse kromatiini kondenseeritumaks muutmisega (Wei et al., 1998). Iga metüleeritavat lüsiinijääki saab nii mono-, di- kui ka trimetüleerida. Seda teevad histooni metüültransferaasid ehk HMT-d (Jenuwein et al., 2000). Metüülrühma lisamine histoonide laenguid ei muuda, kuid ka siinjuhul on erinevatel kombinatsioonidel erinev tulem. H3K4, H3K36 ja H3K79 monometüleerimine on seotud geeniekspressiooni aktiveerimisega, kuid H3K9, H3K27 ja H4K20 di- ja trimetüleerimine hoopis geeni vaigistamisega (Zhang et al., 2012). Erinevad modifikatsioonid võivad ka üksteist mõjutada. Näiteks H3S10 fosforüleerimine takistab kõrval asuva 9. lüsiinijäägi dimetüleerimist (Zhang et al., 2006), aga soosib 14. lüsiinijäägi atsetüleerimist (Cheung et al., 2000). Lisaks on näidatud, et H4R3 metüülatsioon muudab histooni H4 atsetüleerivatele ensüümidele paremaks substraadiks (Wang et al., 2001). Seega loevad erinevad valgud

„histooni koodi“ ehk modifikatsioonide mustrit erinevalt ning sellest olenevalt muutub ka histoonide post-translatsioonilistest modifikatsioonidest sõltuv geeniekspressioon.



**Joonis 2. Pärmis histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid.** Välja on toodud H2A, H2B, H3 ning H4 histoonid ning neil esinevad modifitseeritavad aminohappejäägid. „ph“ tähistab fosforüleerimist, „ac“ atsetüleerimist, „me“ metüleerimist, „s“ sumoüleerimist, „ub“ ubikvitinüleerimist ning „iso“ isomerisatsiooni (Smolle ja Workman, 2013, modifitseeritud).

### 1.5 Pagaripärmi paardumistüübid

Pärmil on võime eksisteerida kolme erineva rakutüübina: haploidse  $a$ - või  $\alpha$ - rakuna ning nende paardumisel raku ja rakutuuma ühinedes tekkinud diploidse  $a/\alpha$ -rakuna (Herskowitz, 1988). Haploidsed rakutüübid toodavad feromooni:  $\alpha$ -rakud  $\alpha$ -faktorit (Duntze et al., 1970) ning  $a$ -rakud  $a$ -faktorit (Wilkinson ja Pringle, 1974), mis on vastavalt 13 (Stotzler et al., 1976) ja 12 (Betz et al., 1987) aminohappe pikkused rakkudevaheliste signaalmolekulidena toimivad peptiidid. Diploidsed rakud feromooni ei tooda. On kirjeldatud, et  $a$ -rakkudel on  $\alpha$ -faktorit äratundmiseks *STE2* geenilt (Blumer et al., 1988) ning  $\alpha$ -rakkudel  $a$ -faktorit äratundmiseks *STE3* geenilt kodeeritud retseptor (Hagen et al., 1986). Nimetatud feromoonid peatavad rakutsükli vahetult enne S-faasi (Bucking-Throm et al., 1973), mis kindlustab rakutsükli

sünkroniseerituse ning millele järgneb rakkude ning rakutuumade ühinemine ja diploidi moodustumine paarduvate haploidsete rakkude vahel. Diploidsed MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$  rakud on võimelised lämmastiku ja süsinikuvaeses keskkonnas läbima meioosi ning moodustama spoore (Esposito ja Klapholz, 1981). Haploidse pärmil genoom koosneb 16-st kromosoomist (Goffeau et al., 1996). Pärmil paardumistüübi määrab ära kolmandal kromosoomil asuvas MAT-lookuses (ingl. k MAT- *Mating Type*) asuv kas a- või  $\alpha$ -spetsiifilisi valke kodeeriv järjestus. Rakkudel, kelle MAT-lookuses on  $\alpha$ -alleel, avaldub  $\alpha$ -rakkude fenotüüp ning a-alleeliga rakkudel a-rakkude fenotüüp (Strathern et al., 1981). MAT-lookus koosneb viiest regioonist: W, X, Y, Z1 ja Z2, millest raku paardumistüübi spetsiifilised valgud kodeeritakse Y segmendilt (Nickoloff et al., 1986). Lisaks MAT-lookusele on pärmil kolmandas kromosoomis olemas ka paardumistüübi geenide vaigistatud koopiad (nimetatakse ka doonorjärjestused) *HML $\alpha$*  ja *HMR $\alpha$* , mis on pakitud heterokromatiini (Nasmyth, 1982) ning on kaitstud igasuguse endonukleaasi aktiivsuse, kaasaarvatud HO-endonukleaasi eest (Connolly et al., 1988).

### 1.6 Pagaripärmil paardumistüübi vahetus

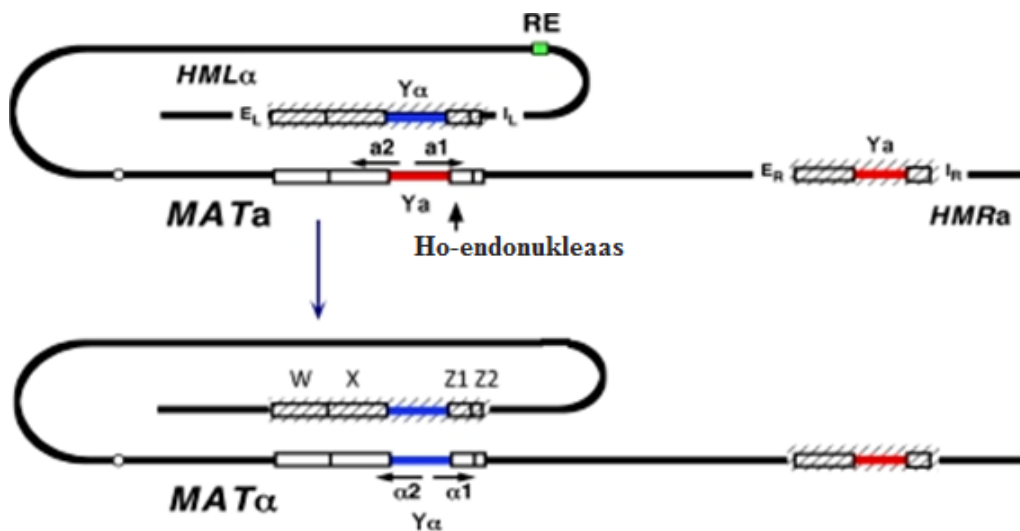
Haploidsetel a- ja  $\alpha$ -rakkudel on võime mitootilisel jagunemisel saada järglasi mõlemast haploidsest paardumistüübist (Hicks ja Herskowitz, 1976). Seda, kas paardumistüübi vahetus saab toimida, määrab ära HO-geen (Winge ja Roberts, 1949). Nimetus HO viitab homotallismile, mis kujutab elutsükli, kus üksikust haploidsest rakust võib jagunemiste käigus areneda diploidsete rakkude järglaskond. Selle eelduseks on rakkude võime paardumistüüpi vahetada. Heterotallilises elutsükli seevastu moodustuvad diploidid ainult juba algselt erinevate paardumistüüpidega rakkude vahel. Homotallilistel tüvedel on see geen funktsionaalne (tähistatakse HO) ning heterotallilistel defektne (tähistatakse ho).

Laboritüvedes on eksperimentides lihtsuse mõttes enamasti kasutusel ho variant, mis kindlustab, et rakud ei vaheta katse jooksul paardumistüüpi ega moodusta diploide. HO tüvedes vahetub paardumistüüp iga raku jagunemisega (Hicks ja Herskowitz, 1976).

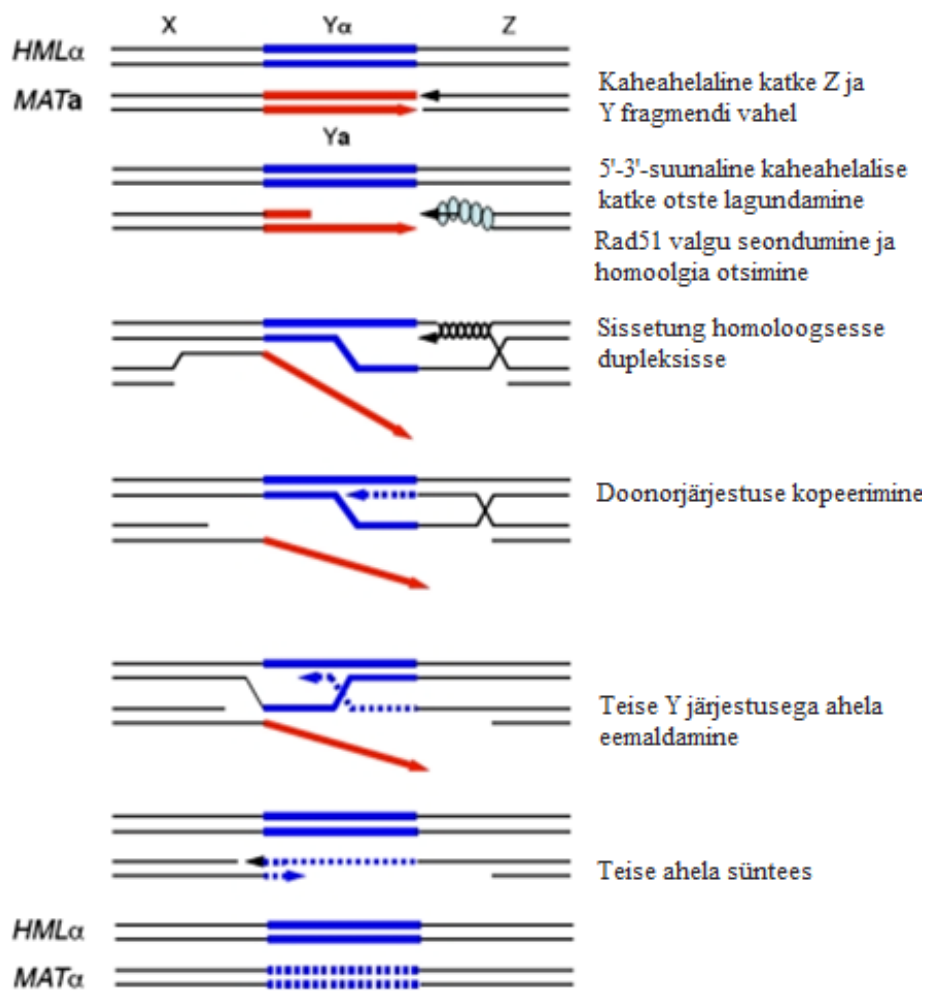
Paardumistüübi vahetuse indutseerib HO-geeni produkti HO-endonukleaasi tehtud kaheaahelaline katke MAT-lookuses (Strathern et al., 1982). HO-endonukleaasi ekspresseeritakse ainult haploidsete emarakkude rakutsükli G1 faasis (Jensen ja Herskowitz, 1984), kuid galaktoosiga indutseeritava promootoriga konstrueeritud HO-geeni on galaktoosi söötmesse lisades võimalik ekspresseerida igas rakus ning rakutsükli faasis (Nasmyth, 1987).

Paardumistüübi vahetus toimub geenikonversiooni mehhanismiga. HO-endonukleas tunneb ära ja teeb lõike 24-aluspaarisesse järjestusse *MAT* lookuse Y/Z segmentide piiril (joonis 3) (Nickoloff et al., 1986), mille järel toimub 5'-3' suunaline DNA lagundamine u 1 nukleotiidi sekundis (joonis 4) (Fishman-Lobell et al., 1992). Kui 3' üleulatuvad otsad on tekkinud, seostub nendega üheaahelalist DNA-d siduv kompleks RPA (ingl k. **Replication protein A**), mis asendatakse Rad52 valgu vahendusel (Sugawara et al., 2003) Rad51 rekombinatsiooni valguga (Wang ja Haber, 2004), mis vahendab homoloogse piirkonna (doonorjärjestuste) otsimist, et initsieerida rekombinatsiooni. Seejärel toimub Z-segmendi poolse 3' otsa saba sissetung homoloogsesse dupleksisse, mille järgi pikendatakse 3' saba komplementaarsuse alusel. Rekombinatsioon toimub *MATa* rakkudel *HMLa* ning *MATa* rakkudel *HMRa* järjestustega, kusjuures doonorjärjestused protsessi käigus ei muutu, vaid neid kasutatakse ainult geenikonversiooni matriitsina. Seejärel teeb Rad1-Rad10 endonukleas lõike *MAT*-lookuse Y ja X järjestuse vahele, mida 5'-3' suunalise eksonukleasase aktiivsusega ei eemaldatud ning algne Y järjestus eemaldub *MAT*-lookusest (Fishman-Lobell et al., 1992). Peale esimese ahela sünteesimist *MAT*-lookusesse sünteesitakse selle abil ka komplementaarne ahel.

HO-endonukleasasi indutseeritud DNA kaheaahelalise katke tegemise süsteemi on laialt kasutatud kaheaahelalise katke parandamise ja ka homoloogse rekombinatsiooni uurimisel. Galaktoosi kontrolli all olevat promotorit saab aktiveerida lisades kasvukeskkonda galaktoosi ning seejärel inaktiveerida kasvatades rakke glükoosiga söötmes. Tänu sellele on eksperimentides võimalik HO-endonukleasasi ekspresseerida valitud aja vältel soovitud hetkel. HO-endonukleasasi indutseeritud kaheaahelaline DNA katke on väga spetsiifiline, kuna HO-endonukleasasi puhul on teada täpne katke tegemise asukoht *MAT*-lookuses ning terve pärimi genoomi kohta tehakse täpselt üks katke. Katke toimumise kontrolliks on disainitud ka sellised PCR reaktsioonis kasutatavad praimerid, millest üks seondub ühele ning teine teisele poole HO-endonukleasasi lõikekohta. Juhul kui *MAT*-lookuses on  $\alpha$ -järjestus, amplifitseeritakse lookuselt 1 kb produkt ning kui  $\alpha$ -järjestus, siis 1,1 kb produkt (joonis 5). PCR produkti puudumine viitab HO-endonukleasasi tehtud katkele. Kuna  $\alpha$ - ja  $\alpha$ -järjestustelt amplifitseeritav PCR produkt erineb 100 bp võrra, saab sellise PCR reaktsiooniga kontrollida ka paardumistüübi vahetust ning seega HO-endonukleasasi ekspressiooni. Kirjeldatud lihtsasti rakendatav kontrollisüsteem põhjendab HO-endonukleasasi tehtud kaheaahelalise DNA katke kasutamise valikut teadustöös.

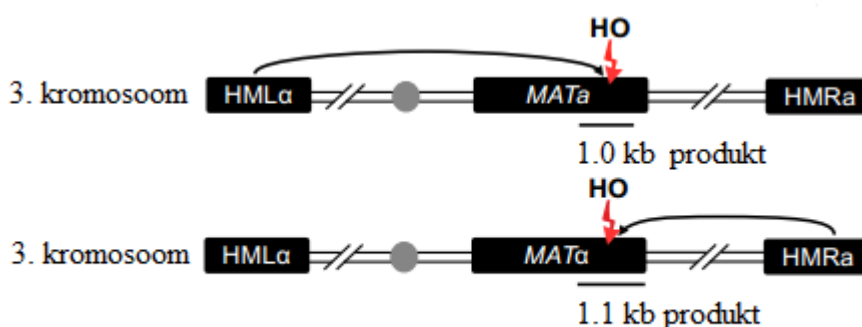


**Joonis 3. Geenikonversiooni mudel.** Kujutatud on geenikonversioon *MATa* lookusest *MATα* lookuseks. Doonorjärjestused on vaigistatud lühikeste heterokromatiinsete regioonidega (joonisel kaetud diagonaalsete triipudega) (Haber, 2012, modifitseeritud).



**Joonis 4. *MAT*-lookuse vahetuse mehhanism *MATa* lookusest *HMLα* lookuseks.** Peale HO-endonukleasaasi kaheaahelalise katke sooritamist Z ja Y fragmendi vahel toimub 5'-3'

suunaline kaheaahelalise katke otste lagundamine. Rad51 valk seondub 3' otsale ning moodustunud kompleks otsib doonorjärjestuse homoloogiat. Kui doonorjärjestus on leitud, toimub sissetung homoloogsesse dupleksisse ning doonorjärjestus kopeeritakse. Peale algselt alles jäänud Y järjestuse eemaldamist sünteesitakse lookusesse komplementaarsuse alusel ka teine ahel (Haber, 2012, modifitseeritud).



**Joonis 5. Pärimi kolmas kromosoom.** Joonisel on näha pärimi kolmandal kromosoomil asuvat *MAT*-lookust ning doonorjärjestusi *HML $\alpha$*  ning *HMR $\alpha$* . *MAT*-lookuses on näidatud HO-endonukleaasi löikekoht ning seda ümbritsevatelt aladelt võimendatavad 1.0 kb  $\alpha$ -spetsiifiline produkt ning 1,1 kb  $\alpha$ -spetsiifiline produkt. Autori poolt modifitseeritud joonis on pärit Henel Seinalt.

### 1.7 DNA kaheaahelaliste katkete parandamine mittehomoogsete otste ühendamise mehhanismiga

Kaheaahelaliste DNA kahjustuste parandamine on rakus hädavajalik, et ära hoida raku surma, kartsinogeneesi või terve kromosoomi „õla“ kadumist mitoosi käigus. Rakkudel on kaheaahelalise DNA kahjustuse parandamiseks kaks põhilist suunda: homoloogiline rekombinatsioon ning mittehomoogsete otste ühendamine (NHEJ- ingl k. *nonhomologous end joining*). HO-endonukleaasi löike puhul toimub homoloogiline rekombinatsioon 90% ning NHEJ 10% tõenäosusega, kusjuures paardumistüübi vahetus toimub vaid homoloogilise rekombinatsiooniga (Haber, 2012). NHEJ mehhanismil osalevad mitmed valgukompleksid. Hdf1/Hdf2 kompleks seondub DNA otstele ning vahendab Mre11/Rad50/Xrs2 valgukompleksi seondumist, millel on katke otsi ühendav funktsioon ja viimase sammuna ligeerib Dnl4/Lif1 kompleks DNA otsad kokku (Chen et al., 2001).

## 1.8 Histoone post-translatsioonilised modifikatsioonid kaheahelalise DNA katke parandamises

Erinevate uurimuste tulemustena on näidatud, et histooni „sabade“ modifikatsioonid mängivad otsustavat rolli nii DNA parandamise läbiviimisel kui ka parandamisviisi valikul. Mudelorganismis *Schizosaccharomyces pombe* viib kaheahelalise katke korral Gcn5-sõltuv H3K36 atsetüleerimine homoloogilise rekombinatsioonini, kuid Set2-sõltuv H3K36 metüleerimine mittehomoogse otste ühendamiseni (Pai et al., 2014). Kui ainsaks võimalikuks kaheahelalise katke parandamise mehhanismiks rakus on NHEJ, väheneb kaheahelalist katket ümbritsevatel aladel H4K16 atsetüleerimine 40-50% (Jazayeri et al., 2004) ja H4K8 atsetüleerimine suureneb lühiajaliselt (Downs et al., 2004). Lisaks on *S.pombe* puhul näidatud, et H3K14 atsetüleerimine on vajalik DNA kahjustuse kontrollpunkti aktivatsiooniks (Wang et al., 2012), sest H3K14 atsetüleerimine reguleerib otseselt kromatiini kompaktsust, neutraliseerides H3K14 positiivset laengut ja värbab ka kromatiini remodelleerimise valgu kompleksi RSC (*Remodels the Structure of Chromatin*) (Kasten et al., 2004). Kuna H3K14 atsetüleerituse tase suureneb 2 kb kaugusel DNA kahjustuse kohast, kuid mitte enam 16 kb kaugusel, seostatakse H3K14 atsetüleerimist otseselt katke toimumise kohaga (Wang et al., 2012). Uurimistööd pagaripärmis viitavad, et atsetüleeritud H3K14 roll värvata RSC kompleks on seotud ATM/ATR sensorkinaaside toomisega katke kohale ning seeläbi H2A fosforüleerimisega (Liang et al., 2007). Fosforüleeritud H2A viib omakorda kromatiini remodelleeriva kompleksi INO80 värbamisele kaheahelalise katke juurde, mis on vajalik katke protsessimisel üheaahelaliseks DNA-ks (van Attikum et al., 2004). Pagaripärmis võivad HAT-id füüsiliselt seonduda Ku70 DNA parandamise valguga (Barlev et al., 1998), mis viitab samuti atsetüleerimise seosele DNA parandamisega. Homoloogiline rekombinatsioon indutseerib histoonide H3 ja H4 N-terminaalsete lüsiinide atsetüleerimist kaheahelalist katket ümbritsevatel aladel histooni atsetülaaside Gcn5 ja Esa1 poolt, millele järgneb H3 ja H4 deatsetüleerimine Sir2, Hst1 ja Rpd3 poolt (Tamburini ja Tyler, 2005). Pagaripärmis on tehtud katse, kus H3 lüsiinid positsioonides 9, 14, 18, 23 ja 27 muteeriti erinevates kombinatsioonides arginiiniks, mimikeerides seega atsetüleerimata lüsiine. Kui rakke töödeldi DNA-s kaheahelalisi katkeid tekitava kemikaaliga MMS säilis rakkudel täielik eluvõime juhul, kui 14. ja 23. positsioonis olevad lüsiinid olid muteerimata, mis viitab nende positsioonide atsetüleerimise olulisusele kaheahelaliste katkete parandamises (Qin ja Parthun, 2002).

## 2 EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärkideks oli:

1. Konstrueerida galaktoosiga indutseeritava promootori kontrolli all olev HO-endonukleaasi ekspresseeriv (GAL-HO) plasmiid.
2. Integreerida *GAL-HO* ekspressioonikassett pagaripärmi tüvesse, milles genoomsed H3 ja H4 histoon ekspresseerivad järjestused on deleteeritud ning milles metsiktüüpi H3 ja H4 geenikoopia ekspresseerub plasmiidilt.
3. Vahetada saadud pärmitüves metsiktüüpi H3 ja H4 histoon ekspresseeriv plasmiid välja erinevate mutantset H3 histooni ekspresseerivate plasmiidide vastu (H3K9R, H3K14R, H3K23R, H3K9,14,23R ja kontrolliks ka *wt* H3).
4. Võrrelda saadud histoon H3 atsetüleerimises defektseid pärmitüvesid metsiktüüpi histoon ekspresseeriva tüvega HO-endonukleaasi poolt tekitatud kaheaahelalise DNA katke juuresolekul.

### 2.2 Materjalid ja meetodika

#### 2.2.1 Kasutatud tüved, plasmiidid ja söötmed

Käesolevas töös kasutatud pärmitüvi AKY202 on valmistatud tüve W303 baasil (Thomas ja Rothstein, 1989). Mutantseid histoon H3 gene ekspresseerivad plasmiidid olid valmistatud *HIS3* markergeeniga pRS413 plasmidi põhjal meie laboris. HO-endonukleaasi ekspresseeriv pRS412\_GAL\_HO plasmiid saadeti meile Dr. Jeff Thompsoni poolt infoga, et HO-endonukleaasi ekspressiooniks vajaliku promootori, HO-endonukleaasi kodeeriva järjestuse ning terminaator alaga fragment on plasmidi sisestatud SalI ja EcoRI restriктаasidega ning fragmendi pikkus on 3500-4000ap. Lisaks on antud plasmidis *ADE2* markergeen, *E.coli*

replikatsiooni alguspunkt, ampitsilliini resistentsusgeen (AmpR) ning pärimi tsentromeerne järjestus (ARS/CEN), mis võimaldab vektorite replitseerumist pärmirakkudes ja segregatsiooni mitoosis. Tüvede ja plasmiidide nimetused, genotüübid ja autorid on välja toodud vastavalt Lisas 2 ja Lisas 3. Töös kasutatud söötmete koostised ja kasutamise eesmärgid on välja toodud Lisas 1.

### **2.2.2 Agaroosgeelelektroforees**

Käesolevas töös läbiviidud PCR-i, restriksioonanalüüsi- ja kloonimisproduktide kontrolliks kasutati DNA analüüsiks agaroosgeelelektroforeesi. Sõltuvalt uuritava DNA nukleotiidjärjestuse pikkusest kasutati 0,8-1,2 % agaroosgeeli, mille valmistamisel kasutati 1x TAE puhvrit (40 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8), vastav kogus agaroosi ja etiidiumbromiidi (EtBr) (0,5µg/ml).

### **2.2.3 DNA eraldamise meetodid**

#### **DNA eraldamine pärmirakkudest liitiumatsetaadi meetodil**

Esmalt kasvatati pärmirakke 3-4 ööpäeva 30°C juures tardsöötmega tassidel, valiti sobivad kolooniad ning kasvatati neid YP vedelsöötmes üleöö 30°C juures. Rakud tsentrifuugiti ja võeti üles 100 µl-s LiOAc+SDS puhvris, hoiti 15 min 70°C juures ning lisati 300 µl 96% piiritust. Seejärel hoiti proove 1 min toatemperatuuril, rakud tsentrifuugiti 3 min 13 000 rpm juures lauatsentrifuugis (*Eppendorf Centrifuge 5415 R*) kokku ning supernatant eemaldati. Sadet kuivatati 20 min 40°C juures ning seejärel võeti üles 100 µl-s TE-puhvris, tsentrifuugiti 1 min 13 000 rpm juures ning supernatant eraldati uude tuubi (Lõoke et al., 2011).

#### **Plasmiidse DNA eraldamine bakterirakkudest**

Ampitsilliini sisaldavatel selektiivplaatidel kasvanud kolooniatest valiti kaks kolooniat ning neid kasvatati üleöö 3 ml LB söötmes, millesse oli lisatud ampitsilliini lõpp-kontsentratsiooniga 100 µg/ml. Plasmiidne DNA eraldati kasutades *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit*'i vastavalt tootjapoolsele juhendile.

### **Lineaarsete DNA fragmentide puhastamine preparatiivsest geelist**

Esmalt viidi läbi restriksioon, milles lõigati proov lineaarseks, seejärel lisati proovile *Loading Dye (Thermo Scientific)*, proovid kanti preparatiivsele geelile (sõltuvalt DNA nukleotiidjärjestuse pikkusest agarooši, EtBr ja 1x TAE puhver) ning geelist soovitud pikkusega UV all välja lõigatud (masin *UVP Model White/UV TMW-20 Transilluminator*) DNA fragmendid puhastati kasutades *FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit*'i vastavalt tootjapoolsele juhendile.

### **Lineaarsete DNA fragmentide sadestamine**

Restriktaasiga lineariseeritud proovile (10 µl) lisati 190 µl TE puhvrit (10Mm Tris, 0,1 mM EDTA), 20 µl 3M NaAc, 1 µl glükogeeni, 600 µl 96%-list piiritust ning hoiti 30 minutit 20°C juures. Proove tseentrifuugiti 15 min 13200 rpm, supernatant eemaldati ja sadet pesti 500 µl 70%-lise etanooliga. Seejärel tseentrifuugiti proove 10 min 13200 rpm, supernatant eemaldati ning sade lahustati 40 µl vees.

## **2.2.4 Kloneerimine**

### **DNA restriksioonid**

DNA restriksioonid viidi läbi 37°C juures üleöö. Reaktsioonisegu sisaldas lõigatavat DNA-d, vastavalt DNA hulgale sobivas koguses restriктаasi, restriктаasile vastavat puhvrit ning 20 µl-ni vett. Nii restriктаasid kui ka puhvrid olid firmalt *Thermo Fisher Scientific (USA)*.

### **Fosfataasitöötlus**

20 µl restriksioonisegule lisati 1 U SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*) fosfataasi firmalt *Fermentas*. Proovi inkubeeriti 30 min 37°C juures.

## DNA ligeerimine

DNA ligatsioonil segati kokku 20 µl reaktsioonisegu ning segu hoiti üleöö temperatuuril 17°C.

1. pBlueScript SK ja ADE2 fragment:

DNA ligatsioon tehti 20 µl-s: 2 µl puhvrit, 1 µl T4 DNA ligaasi, 12 µl ADE2 fragmenti, 5 µl lineaarset pBlueScripti. Kontrolliks tehti segu, kus ADE2 fragmendi asemel kasutati 12 µl vett.

2. pBlueScriptSK\_ADE2 ja GAL\_HO fragment:

DNA ligatsioon tehti 20 µl-s: 2 µl puhvrit, 1 µl T4 DNA ligaasi, 14 µl GAL\_HO fragmenti, 3 µl lineaarset pBlueScript\_ADE2. Kontrolliks tehti segu, kus GAL\_HO fragmendi asemel kasutati 14 µl vett.

## Plasmiidse DNA transformatsioon

Kompetentsetele *E.coli* DH5α rakkudele (100 µl) lisati 20 µl ligatsioonisegu. Rakke hoiti 25 min jääl, seejärel 1 min 42°C juures ning jahutati jääl. Segule lisati 800 µl LB-söödet, inkubeeriti 1h 37°C juures, tsentrifuugiti 3500 rpm 1 min, eemaldati enamused söötmetest. Rakud resuspendeeriti allesjäänud söötmes ning plaaditi ampitsilliini sisaldava söötmega plaatidele (siin töös kasutatud plasmiididel on ampitsilliini resistentsusgeen) ning pandi 37°C juurde kasvama.

### 2.2.5 *Saccharomyces cerevisiae* plasmidi transformatsioon liitumatsetaadi meetodil

Pärmitüvesid AKY202 ja AKY1513 kasvatati YPD tassidel 3 ööpäeva 30°C juures. Seejärel kasvatati rakke üleöö 15 ml-is YPD vedelsöötmes 30°C juures loksutil (*Excella E25 Incubator Shaker Series*). Eppendorfi tuubidesse pandi 1,5ml rakususpensiooni, mida tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 3 min 5000 rpm juures. Sööde eemaldati, rakke pesti 500 µl 1x LiOAc+TE lahusega, tsentrifuugiti 3 min 5000 rpm juures. Peale söötme eemaldamist lahustati rakusade 40 µl-is LiOAc+TE-s ja lisati 7 µl eelnevalt 95°C juures 6-7 minutit

denatureeritud ja jääl jahutatud carrier DNA-d. Segati kokku transformatsioonisegud, mis sisaldasid 100ng plasmiidset DNA-d ning 50 µl rakke.

1) pBlueScript\_ADE2\_GAL\_HO plasmiidi transformatsioonil: ühte tuubi 50 µl LiOAc+TE-s lahustatud rakke ja 100ng sadestatud plasmiidi, teise tuubi 50 µl rakke ja 100ng preparatiivsest geelist puhastatud plasmiidi. Positiivsesse kontrolli lisati 50 µl rakke ja 100ng pRS412\_GAL\_HO plasmiidi ning negatiivne kontroll sisaldas 50 µl rakke koos carrier DNA-ga.

2) Mutantseid H3 histooni ekspresseerivate plasmiidide transformatsioonil: 50 µl LiOAc+TE-s lahustatud rakke ja 100 ng plasmiidset DNA-d.

Transformatsioonisegud seisisid 5 min toatemperatuuril, peale mida lisati 300 µl LiOAc+TE+PEG lahust, segati vortexil (*Scientific Industries Vortex-Genie 2*) ja hoiti toatemperatuuril 5 min. Lisati 30 µl DMSO-d, segati uuesti vortexil ning tehti 42°C juures 10 min kuumašokk. Proove tsentrifuugiti 3 min 3000 rpm juures, eemaldati supernatant, sade lahustati 150 µl steriilses vees ning plaaditi tardsöötmege tassidele.

### **2.2.6 Lineaarse DNA fragmendi sisestamine pärmis genoomi homoloogilise rekombinatsiooni teel**

Antud töös sooviti HO-endonukleaasi kodeeriv järjestus sisestada pärmis genoomi. Selleks konstrueeriti plasmiid, kus lisaks HO-endonukleasile oleks ka *ADE2* markergeen, millel on homoloogia pärmis genoomis. Tsirkulaarne plasmiid lõigati genoomi integreerimiseks *AflI* restriktasiga katki just *ADE2* geenist, et lineaarse fragmendi otstel oleks pärmis genoomiga homoloogia, mis kindlustaks homoloogilise rekombinatsiooni toimumise ning lineaarse konstrukti koosseisus oleva GAL-HO-endonukleaasi integreerumise pärmis genoomi.

### **2.2.7 DNA kaheaheelalist katket tegeva tüve kontrollsüsteem**

Geelist puhastamise ja sadestamise teel saadud lineaarsete plasmiididega transformeeritud rakke kasvatati adeniiniga selektiivtassil 3-4 ööpäeva 30°C juures. Kummagi meetodiga saadud DNA-ga transformeeritud rakkudest valiti välja kolm kolooniat, mida kasvatati üleöö rafinoosiga vedelsöötmes 30°C juures. Hommikul tõsteti sealt 1,5 ml rakususpensiooni

Eppendorfi tuubidesse. Rakud koguti tsentrifuugides, sööde eemaldati ning DNA puhastati PCR-i tarbeks liitiumatsetaadi meetodil (PCR reaktsioonide programmid ja kasutatud praimerid on välja toodud Lisas 4, vastavalt Tabel 4 ja Tabel 5). Ülejäänud rakud tsentrifuugiti 15 ml Falconi tuubis *Sigma Laboratory Centrifuges 4K15C* masinaga 2000 rpm 5 minutit, rafinoosiga sööde eemaldati ning rakkudele lisati galaktoosiga sööde. Rakke kasvatati 2h 30°C juures loksutil ning korrati liitiumatsetaadiga DNA eraldamist 1,5 ml rakususpensioonist. Allesjäänud rakkudel eemaldati galaktoosiga sööde ning rakud pandi kasvama glükoosiga söötmesse, kasvatati 2h 30°C juures loksutil ning puhastati sama meetodiga PCR-i jaoks DNA.

### **2.2.8 Plasmiidivahetus**

Mutantseid H3 histoone ekspresseerivad plasmiidid (K9R, K14R, K23R, K9,14,23R) transformeeriti liitiumatsetaadi meetodil AKY1513 tüvesse. Transformeeritud rakke kasvatati üleöö 30°C juures YPD tassidel ning tembeldati järgmisel päeval edasi histidiiniga 5-FOA tassidele, et eemaldada AKY1513 tüves olevad *URA3* markergeeni sisaldavad plasmiidid.

### **2.2.9 Lahjenduste rea analüüs**

Võrdlemaks metsiktüüpi histoonidega rakkude kasvu erinevaid mutantseid H3 histoone ekspresseerivate rakkudega juhul, kui on indutseeritud HO-endonukleasiga kaheaheelalise katke tegemine, valmistati esmalt nii glükoosiga kui ka galaktoosiga SC tardsöötmed. Seejärel tehti rakkudest kümnekordsete lahjenduste read vees (rakukultuuri tihedust mõõdeti rakuloenduriga Z<sup>TM</sup> COULTER COUNTER *Cell and Particle Counter*, Beckman Coulter) nii, et suurima tihedusega lahjenduses oli 10 000 rakku/μl ning väikseimas 1 rakk/μl. Saadud lahjendustest kanti 5 μl tilkadena lahjenduste read nii glükoosiga kui ka galaktoosiga tardsöötmetele. Enne tulemuste analüüsimist kasvatati rakukultuure 3-4 ööpäeva 30°C juures. 2% galaktoosiga ja 2% glükoosiga selektiivsöötmele tehti lahjenduste rea analüüsi kahes korduses, 1% galaktoosiga söötmele ühes korduses.

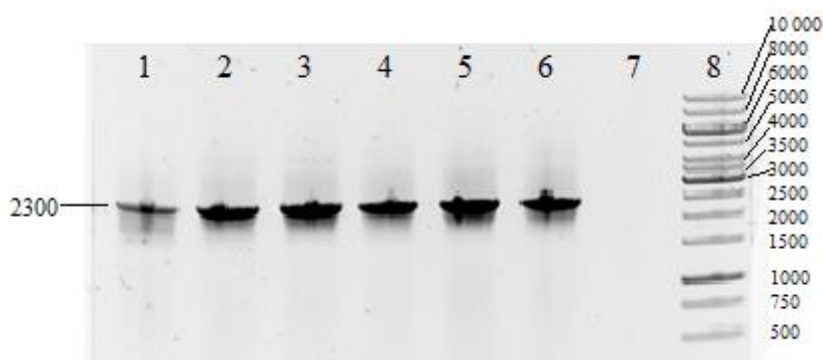
## 2.3 Tulemused. Arutelu

### 2.3.1 HO-endonukleaasi ekspresseeriva tüve konstrueerimine

Töö eesmärgiks oli uurida DNA kaheaahelaliste katkete parandamist histoonmutantsetes tüvedes, kus kaheaahelised katked tekitatakse HO-endonukleaasi poolt. Selleks tuli esmalt luua pärmitüvi, mille genoomi oleks integreeritud galaktoosiga indutseeritava promotori kontrolli all olev HO-endonukleaasi ekspresseeriv järjestus. Kuna meile saadetud pRS412\_GAL\_HO plasmiid sisaldas ARS/CEN järjestust, ei sobinud see pärmi genoomi integreerimiseks ning kloonimiseks valiti pBlueScript SK plasmiid.

### 2.3.2 Plasmidi pBlueScript\_ADE2 kloonimine

Integreerimiseks sobivat plasmidi hakati üles ehitama pBlueScript SK plasmidi põhjal, mis sisaldab ka ampitsilliini resistentsusgeeni. Antud plasmiid lõigati lineaarseks BamHI restriктаasiga ning sellele tehti fosfataasi töötlus. Järgmisena lõigati plasmiidist pRS412 BglII restriктаasidega välja *ADE2* markergeen, fragmendid puhastati geelist ning sooritati lineaarse pBlueScript SK ning *ADE2* fragmendi kokku ligeerimine. Saadud plasmiid transformeeriti DH5 $\alpha$  kompetentidesse ning paljundati seal üles.

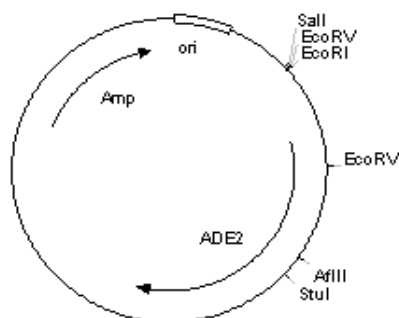


**Joonis 6.** Koloonia PCR pRS413F ja pRS413R praimeritega pBlueScript\_ADE2 kloonimise kontrolliks. Radadel 1-6 on erinevatest bakterikolooniast saadud PCR-i produktid, 7. rajal

on kontroll tagasi kokku ligeerinud pBlueScript vektoriga ning 8. rajal marker (*1kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*) väljatoodud suurustega.

*ADE2* fragmendi plasmidi sisenemise kontrolliks tehti PRS413F ja PRS413R praimeritega koloonia PCR (joonis 6). Praimerid seonduvad kumbki erinevale poole *ADE2* markergeeni ümbritsevale piirkonnale. Juhul kui *ADE2* markeri lisamine plasmidi on õnnestunud, võimendatakse 2300 aluspaarine produkt. Kui toimub pBlueScripti tagasi kokku ligeerumine ilma *ADE2* fragmendi sisenemiseta, pole PCR produkt detekteeritav (joonis 6, rada 7).

Järgnevalt puhastati pBlueScript\_ *ADE2* plasmid bakterirakkudest *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit* juhendusel.

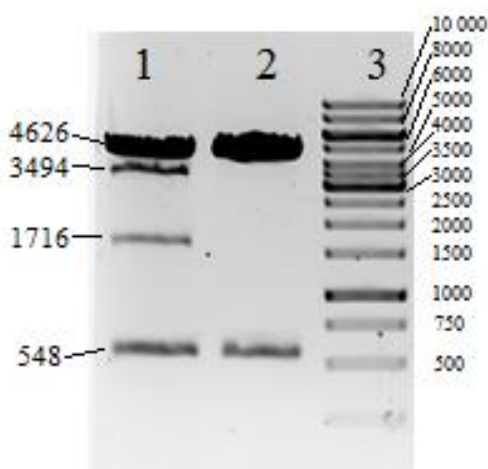


**Joonis 7.** Kujutatud on pBlueScript plasmidi, millesse on kloonitud *ADE2* markergeen (pBlueScript\_ *ADE2*).

Saadud plasmidi kontrolliti ka restriksioonanalüüsiga. Kuna *ADE2* markergeeni sisaldav fragment oli eelnevalt välja lõigatud BglII restriктаasiga ja pBlueScript oli lineaarseks lõigatud BamHI restriктаasiga, võis *ADE2* fragment plasmidi siseneda mõlemat pidi.

Kontrollimaks, mis suunaliselt on *ADE2* markergeen plasmidi sisenenud, oli võimalik kasutada EcoRV restriктаasiga kontroll-lõikust. Antud ensüümil on pBlueScript\_ *ADE2* plasmidis kaks lõikekohta, millest üks asub *ADE2* geeni sees ning teine multikloneerimisjärjestuses (joonis 7). Kui *ADE2* sisenes joonisel 7 noolega kujutatud suunas, tekivad restriksioonanalüüsil 548 ap ja 4626 ap pikkused fragmendid, kui teistpidi siis 1716 ap ja 3494 ap pikkused fragmendid. Analüüsist selgus, et *ADE2* marker on koloonias nr 2 sisenenud joonisel kujutatud suunas (joonis 8). Koloonias nr 1 on aga segu mõlemat pidi

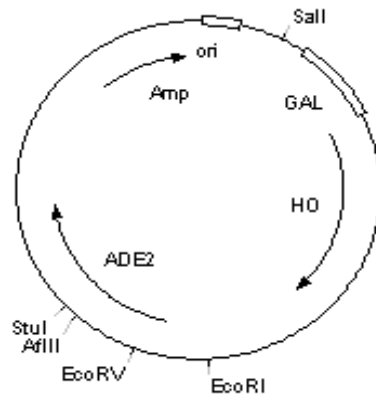
sisenenud fragmendiga plasmiididest. Edasi otsustati kasutada kolooniast nr 2 saadud plasmidi.



**Joonis 8.** EcoRV-ga restriksioonanalüüs 0,8% agarosegeelil. Rajal 1 on koloonia nr 1, rajal 2 on koloonia nr 2 ja rajal 3 on marker (*1kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*) väljatoodud suurustega.

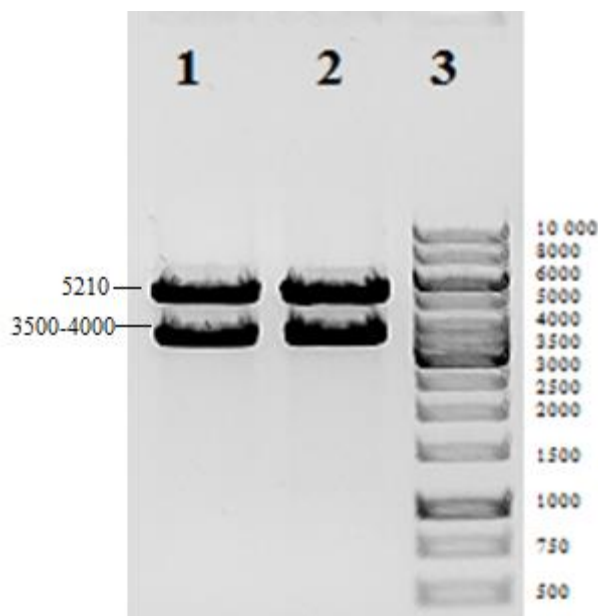
### 2.3.3 Plasmidi pBlueScript\_ADE2\_GAL\_HO klonimine

Järgnevalt kasutati ensüüme *SalI* ja *EcoRI*, et plasmidist pRS412\_GAL\_HO välja lõigata GAL\_HO fragment. Samade ensüümidega lõigati lineaarseks ka pBlueScript\_ADE2 plasmid. Restriksioonid kanti preparatiivsele geelile (0,8% agarose ja EtBR 1x TAE puhvis) ning GAL\_HO fragment ja lineaarne pBlueScript\_ADE2 lõigati UV all geelist välja. Fragmentid puhastati geelist *FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit*'i juhendusel ning ligeeriti kokku (joonis 9). Plasmid pBlueScript\_ADE2\_GAL\_HO paljundati *E. coli* DH5 $\alpha$  kompetentsetes bakterirakkudes üles.



**Joonis 9.** Kujutatud on pBlueScript plasmidi, millesse on kloneeritud nii *ADE2* markergeen kui ka HO-endonukleas (pBlueScript\_ADE2\_GAL\_HO).

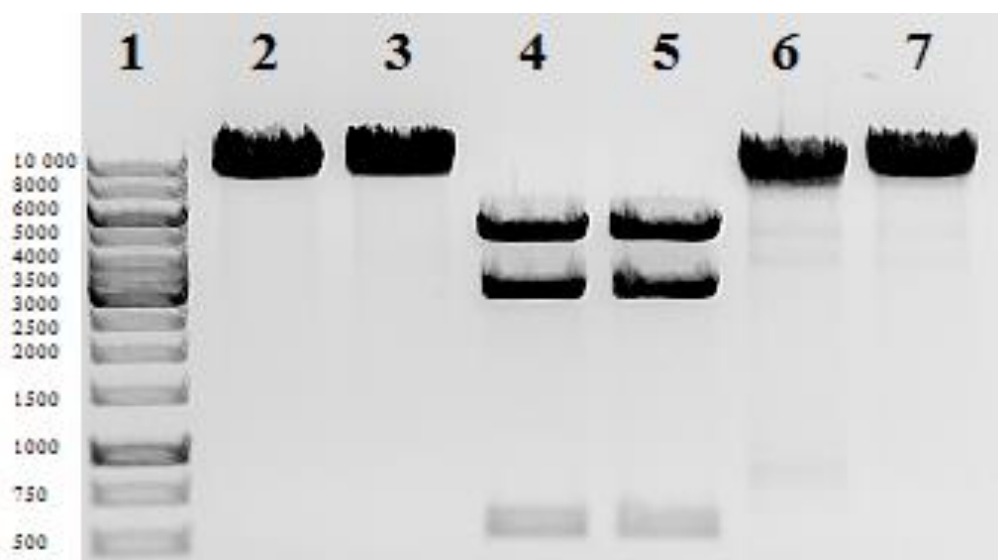
Selektiivplaadilt valiti kaks bakterikolooniat, millest eraldati plasmiidne DNA *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit*'i tootjapoolse juhendi järgi. Ensüümide *EcoRI* ja *SalI* lõikusega kontrolliti GAL\_HO fragmendi sisenemist pBlueScript\_ADE2 plasmidi. pBlueScript\_ADE2 plasmiid on 5210 aluspaari pikk ja GAL\_HO fragment 3500-4000 aluspaari pikk. Fragmentide pikkusi markeri suurustega võrreldes saab kinnitada, et GAL\_HO fragmendi kloneerimine plasmidi õnnestus (joonis 10).



**Joonis 10.** Radadel 1 ja 2 on näha vastavalt valitud kolooniatest 1 ja 2 eraldatud plasmiidse DNA lõikus *EcoRI* ja *SalI* restriiktaasidega kujutatud 0,8% agarosgeelil. Rajal number kolm on marker (*1kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*).

Järgnevalt oli vaja leida selline restriiktaas, mis lõikaks kloneeritud plasmidi *ADE2* markergeeni seest ning võimaldaks seega kogu konstrukti integreerimist pärmis genoomi. Meile saadetud pRS412\_GAL\_HO plasmidi puhul oli teada, milliste ensüümidega saab välja lõigata HO-endonukleaasi ekspresseerivat fragmenti. Samas ei olnud teada täpne nukleotiidne järjestus ega restriiktaaside lõikekohad ning seega oli vajalik kontrollida, millised ensüümid lõikavad konstrueeritud pBlueScript\_ADE2\_GAL\_HO plasmidi lineaarseks ainult *ADE2* markergeeni seest.

Restriksioonanalüüsiks valiti välja kolm võimalikku ensüümi: *EcoRV*, *AflIII* ja *StuI*. Plasmidi pBlueScript\_ADE2\_GAL\_HO lõikamisel selgus, et lisaks *ADE2* järjestusele oli GAL\_HO fragmendis veel 2 *EcoRV* lõikesaiti, sest plasmidi lõikamisel *EcoRV* restriiktaasiga ilmus geelil 3 erineva pikkusega fragmenti (joonis 11). Lineaarseks lõikamine õnnestus nii *AflIII* kui ka *StuI* restriiktaasidega, millest edasi otsustati kasutada *AflIII* ensüümi.



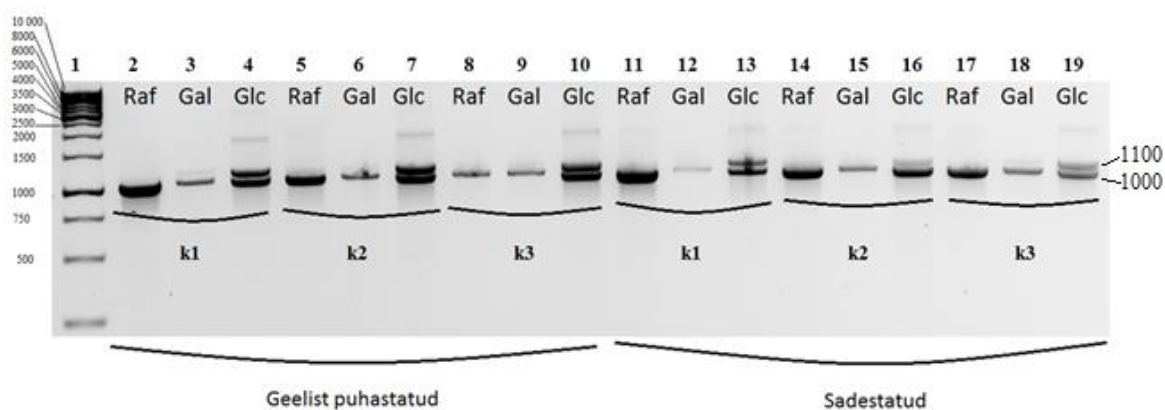
**Joonis 11.** Rajal 1 on marker (1kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder) väljatoodud suurustega. Radadel 2 ja 3 on plasmidi pBlueScript\_ADE2\_GAL\_HO lõigatud *AflIII* restriiktaasiga, radadel 4 ja 5 *EcoRV* restriiktaasiga ja radadel 6 ja 7 *StuI* restriiktaasiga. Iga restriiktaasiga kontrolliti kahest kolooniast puhastatud plasmidi.

Kuna polnud teada, kas pärmis transformeerimise efektiivsus sõltub sellest, kas kasutada geelist puhastatud või sadestatud DNA-d, kasutati pärmitüve tegemiseks mõlema meetodiga puhastatud *AflIII* ensüümiga lineariseeritud pBlueScript\_ADE2\_GAL\_HO plasmidi. Puhastatud lineaarsed plasmiidid transformeeriti liitiumatsetaadi meetodil AKY202

pärmitüvesse, kus need homoloogilise rekombinatsiooni abil integreerusid pärimi genoomi. Mõlema meetodiga puhastatud DNA-ga saadi adeniniita selektiivplaadil piisaval hulgal kolooniaid, seejuures oli sadestatud DNA-ga tehtud transformatsioon hinnanguliselt umbes kolmandiku võrra efektiivsem geelist puhastatud DNA-ga tehtud transformatsioonist.

### **2.3.4 Galaktoosiga indutseeritava HO-endonukleaasiga DNA kaheahelalist katket tegeva pärmitüve kontroll**

Selleks, et kontrollida, kas saadud pärmitüvi ekspresseerib galaktoosiga indutseeritavat kaheahelalist DNA katket tegevat HO-endonukleaasi, kasvatati pärimikolooniaid erinevate suhkrutega söötmetes. Esmalt kasvatati rakke rafinoosiga vedelsöötmes, mis on pärimi poolt antud suhkrutest kõige vähem eelistatud ning mille puhul pole galaktoosiga indutseeritav promootor aktiivne. Seejärel asendati rafinoosiga sööde galaktoosiga vedelsöötmega, mis aktiveerib ka HO-endonukleaasi ekspressiooni. Lõpuks vahetati sööde välja glükoosiga vedelsöötme vastu, mis on pärimile esimene süsinikuallika eelistus ning mis inaktiveerib ka galaktoosi promootori ja seega HO-endonukleaasi ekspressiooni. Suhkrute kasutamine antud järjekorras lihtsustas katse tegemist, kuna pärimirakke ei pidanud söötme vahetamisel eelnevalt söötmetest täielikult puhastama. Piisas supernatandi eemaldamisest ning uue söötme lisamisest, et pärimirakud süsinikuallika eelistuse alusel uut lisatud suhkrut kasutama hakkaksid. Kõigist kolmes erinevas söötmes kasvanud rakkudest eraldati DNA liitiumatsetaadi meetodil ning sellelt amplifitseeriti PCR-iga *MAT*-lookuse järjestus ning PCR-i reaktsioonid kanti 0,8% agarosgeelile (joonis 12). PCR-il kasutati HOcut\_CTRL *forward* ja HOcut\_CTRL *reverse* praimereid, millega võimendatakse  $\alpha$ -rakkudes 1,0 kb pikkust ning  $\alpha$ -rakkudes 1,1 kb pikkust järjestust *MAT*-lookuses. Kui HO-endonukleaas on *MAT*-lookusesse löike teinud, siis on PCR-i matriitsahelas katke ning PCR-i produkti ei ole võimalik saada. Seetõttu on ka galaktoosis kasvanud rakkudelt saadud signaal nõrgem, kuna nendes on HO-endonukleaasi ekspressioon pidevalt aktiivne. Kui aga galaktoosiga sööde vahetada glükoosiga söötme vastu, ei toodeta rakkudes enam HO-endonukleaasi ning rakkudel on võimalik katked ära parandada. See efekt väljendub glükoosiga rakkude tugevamas signaalis. Tekib ka  $\alpha$ -rakkudele iseloomulik pikem 1,1 kb produkt, mis tähendab, et toimunud on paardumistüübi vahetus.



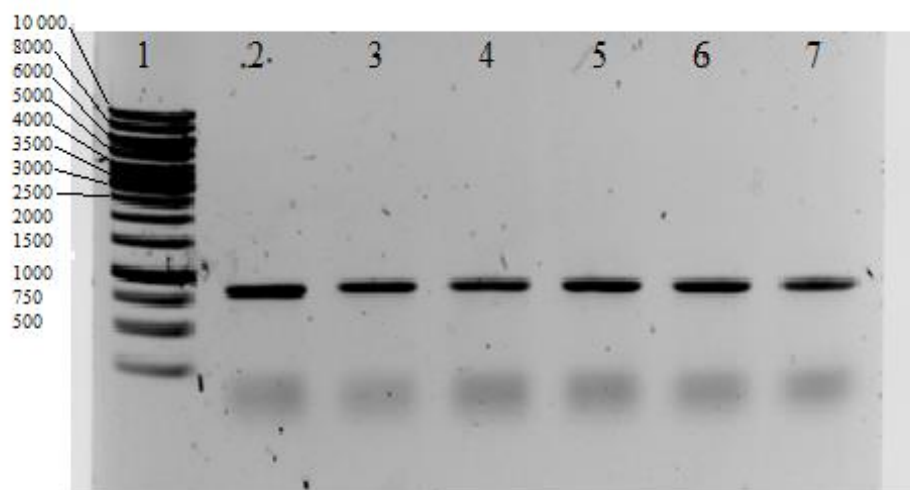
**Joonis 12.** Geelipildil on näha PCR produkte kolooniatest, mille DNA-lt amplifitseeriti *MAT*-lookus HOcut\_CTRLF ja HOcut\_CTRLR praimeritega. Rajal 1 on marker (*1kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*) väljatoodud suurustega. Valitud kolooniate rakkude genoomi oli sisestatud kahel erineval viisil puhastatud pBlueScript\_ADE2\_GAL\_HO plasmiid. Vasakult kolme esimesse kolooniasse (tähistatud k1, k2, k3, rajad 2-10) oli genoomi integreeritud geelist puhastatud lineaarne pBlueScript\_ADE2\_GAL\_HO plasmiid ning järgnevasse kolme kolooniasse (tähistatud k1, k2, k3, rajad 11-19) oli genoomi sisestatud lineaarne pBlueScript\_ADE2\_GAL\_HO plasmiid puhastatud sadestamise meetodil. Iga koloonia esimesel rajal on rafinoosiga vedelsöötmes, teisel rajal galaktoosiga vedelsöötmes ning kolmandal rajal glükoosiga vedelsöötmes kasvanud rakkudest puhastatud DNA pealt amplifitseeritud *MAT*-lookus. *MAT $\alpha$*  tüvel on võimendatud 1000 ap ning *MAT $\alpha$*  tüvel 1100 ap pikkune fragment.

Nagu näha joonisel 12, on galaktoosiga vedelsöötmes kasvanud rakkude *MAT*-lookuse signaal nõrgem, mis viitab HO-endonukleaasi ekspressiooni aktiveerumisele, kaheaahelalise katke toimumisele ja seetõttu ka väiksemale DNA hulga. Glükoosis kasvanud rakkudes, kus inhibeeritakse eelnevalt galaktoosis aktiveeritud HO-endonukleaasi ekspressioon, tekib lisaks  $\alpha$ -paardumistüübile iseloomulikule 1 kb PCR produktile ka  $\alpha$ -paardumistüübile vastav 1,1 kb pikkune fragment. Järelikult võib kindlalt väita, et galaktoosiga indutseeritava HO-endonukleaasi ekspressioonikasseti integreerimine pärmi genoomi õnnestus mõlemal viisil puhastatud DNA-ga. Seega õnnestus üks töö eesmärk, konstrueerida pärmitüvi, milles on galaktoosi lisamisega võimalik indutseerida HO-endonukleaasi lõikega kaheaahelaline DNA katke.

### 2.3.5 Plasmiidivahetus ja kontroll

Tüves AKY202, mille genoomi sisestati antud töö käigus galaktoosiga indutseeritava promootoriga HO-endonukleaasi ekspresseeriv järjestus ning konstrueeriti AKY1513 tüvi, on genoomsed H3 ja H4 geenid deleteeritud ning asuvad *URA3* markergeeni sisaldaval *YCP50:HHT2-HHF2* plasmiidil. Kuna selles töös soovitakse näidata kaheahelaliste katkete parandamise efektiivsust tüvedes, kus H3 valitud lüsiinijäägid on muteeritud arginiiniks (K9R, K14R, K23R ja kolmekordne mutant K9,14,23R), mis mimikeerivad atsetüleerimata lüsiine, tuleb sooritada plasmiidivahetus ning AKY1513 tüves vahetada *URA3* markeriga metsiktüüpi H3 histooni ekspresseeriv plasmiid mutantseid H3 geene kandvate *HIS3* markergeeniga plasmiididega (erinevad pRS413 plasmiidid). Et välistada plasmiidide erinevustest tulenevaid efekte, vahetati *YCP50:HHT2-HHF2* plasmiid välja ka metsiktüüpi H3 histooni kodeeriva pRS413 plasmiidiga. Selleks transformeeriti kas metsiktüüpi H3 histooni või erinevaid mutantseid H3 histooni kodeerivate aladega pRS413 plasmiidid selles töös valmistatud HO-endonukleaasi ekspresseerivasse tüvesse AKY1513 eelnevalt kirjeldatud liitumatsetaadi meetodil. Valmistatud kahe plasmiidiga tüved kasvatati üleöö 30°C juures YPD tassidel ning tembeldati järgmisel päeval edasi histidiinita 5-FOA tassidele. 5-FOA on pagaripärmile mittetoksiline ühend, kuid muutub toksiliseks *URA3* markergeeniga rakkudes. *URA3* geen kodeerib orotiin-5-monofosfaadi dekarboksülaasi, mis konverteerib 5-FOA rakkudele toksiliseks ühendiks fluorodeoksüuridiiniks (Boeke et al., 1984). AKY1513 tüves oleval algsel metsiktüüpi H3 ja H4 geenidega plasmiidil oli lisaks ka *URA3* marker, mistõttu kasvasid 5-FOA söötmel üles vaid rakud, kes olid algse metsiktüüpi histoonidega plasmidi rakkudest eemaldanud ning omasid vaid neisse transformeeritud mutatsioonidega või metsiktüüpi H3 histooniga *HIS3* markergeeniga plasmide. Saadud tüvedest eraldati plasmiidne DNA liitumatsetaadi meetodil.

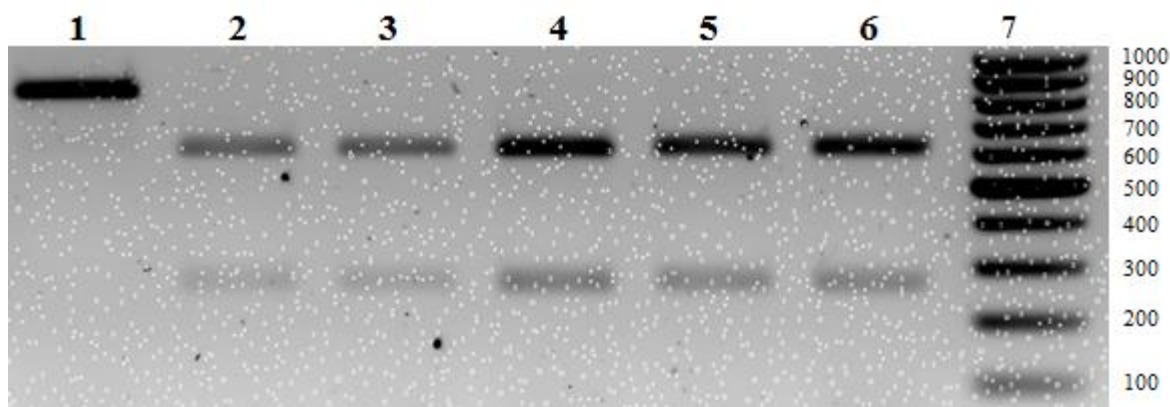
Kuna pRS413 plasmiidis olevatele H3 järjestustele on lisatud kolmekordne 1E2 epitoop, sooritati PCR kontroll HHT2F ja H3H4FOR1 praimeritega, et teada saada, kas metsiktüüpi histoonil H3 ja epitoobiga histoonil H3 on suuruse vahe näha. pRS413 plasmiididelt saadud PCR produktid on pikemad algselt *YCP50:HHT2-HHF2* plasmiidilt saadud produktist (joonis 13).



**Joonis 13.** PCR kontroll HHT2F ja H3H4FOR1 praimeritega 0,8% agarosgeelil. Rajal 1 on marker (*1kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*) väljatoodud suurustega, rajal 2 AKY1513, rajal 3 AKY1519, rajal 4 AKY1520, rajal 5 AKY1521, rajal 6 AKY1522, rajal 7 AKY1523 tüvedest eraldatud DNA-lt histoon H3 järjestusspetsiifiliste praimeritega tehtud PCR produktid.

Ülejäänud PCR segust sadestati DNA ning lõigati *ScaI* restriктаasiga.

*ScaI* restriктаasil puudub algses metsiktüüpi H3 histooni järjestuses lõikekoht ning algselt *YCP50:HHT2-HHF2* plasmiidilt saadud PCR produkti see ensüüm ei lõika. Välja vahetatud pRS413 plasmiidides on kõigile H3 histooni järjestustele kodeeriva ala lõppu lisatud kolmekordne 1E2 epitoop, mille ette on lisatud ka *ScaI* restriктаasi lõikekoht. Seega tekib pRS413 plasmiididelt saadud PCR produkti *ScaI* restriктаasiga lõikusel 222 ja 634 aluspaari pikkune fragment (joonis 14).



**Joonis 14.** Restriksioonanalüüs *ScaI* restriктаasiga 1,2% agarosgeelil, markeriks *100bp Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*. Rajal 1 AKY1513 tüvest algselt *YCP50:HHT2-HHF2* plasmiidilt saadud PCR produkt, rajal 2 AKY1519, rajal 3 AKY1520, rajal 4

AKY1521, rajal 5 AKY1522, rajal 6 AKY1523 tüvedest pRS413 plasmiididelt saadud PCR produkt ning rajal 7 marker.

Kuna *ScaI* lõike tagajärjel on joonisel 14 fragmentide pikkustes näha erinevusi uute pRS413 plasmiididelt saadud PCR produktide ja algselt *YCP50:HHT2-HHF2* plasmiidilt saadud PCR produkti vahel, on õnnestunud kõikides tehtud pärmitüvedes vahetada algne plasmiid uue vastu. Samuti kindlustab see kontrollrestriktsioon, et kõikidest saadud tüvedest on algne metsiktüüpi H3 histooni kodeeriv plasmiid täielikult kadunud ning rakkudes on vaid mutantsete histoonidega plasmiid.

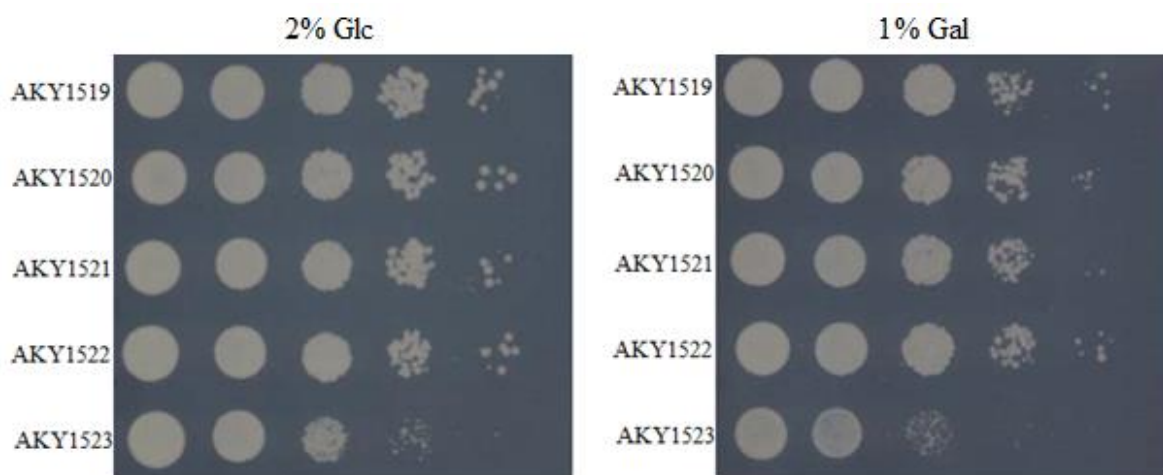
### 2.3.6 Lahjenduste rea analüüs

Lahjenduste rea analüüs võimaldab võrrelda erinevate pärmitüvede kasvuvõimekust erinevatel tingimustel. Esmalt teostati pärmirakkude lahjenduste ridade analüüs 2%-lise galaktoosiga tardsöötmega tassil ning tulemust võrreldi 2%-lise glükoosiga tardsöötmega tassiga. Tulemusest oli näha, et galaktoosi tassil, kus toimub pidev HO-endonukleaasi ekspressioon, on kaheaahelaliste katkete ning mutantsete histoonide koosul pärmirakkudele letaalne igas mutatsioonide kombinatsioonis. Sellel tassil ei suutnud ka metsiktüüpi histoonidega tüvi AKY1519 kasvada (joonis 15). Lisaks muutusid vähesed üles kasvanud kolooniad punaseks, mis viitab kas *ADE2* geeni ning sellega ka HO-endonukleaasi geeni eemaldumisele genoomist või mutatsioonile *ADE2* geenis. Punane pigment koguneb pärmirakkudesse *ADE2* geeni puudumisel, sest *ADE2* geeniproduct fosforibosüülaminoimidiasooli karboksülaas katalüüsib ühte sammu adeniini biosünteesil ning adeniini prekursori P-ribosüülaminoimidiasooli akumulatsioonil oksüdeerub see õhu käes punaseks (Fisher, 1969). See tähendab, et kolooniad, mis ellu jäid, tõenäoliselt HO-endonukleaasi ei ekspresseeri.



**Joonis 15.** Vasakul oleval plaadipildil on pärmikultuuride lahjenduste read 2%-lise glükoosiga söötmel ning paremal plaadipildil 2%-lise galaktoosiga söötmel. AKY1519 tüves on metsiktüüpi histoonidega plasmiid, tüvedes AKY1520, AKY1521, AKY1522 ja AKY1523 on vastavalt histoonil H3 muteeritud H3K9R, H3K14R, H3K23R ja H3K9,14,23R positsioonid.

Kuna 2% galaktoosiga söötmel ei suutnud isegi metsiktüüpi H3 histoonidega rakud elada, pani see otsima muud lahendust, kuidas erinevate tüvede kasvuvõimekust galaktoosi juuresolekul hinnata. Otsustati vähendada galaktoosi kontsentratsiooni ning tehti uued lahjenduste read 1%-lise galaktoosiga söötmel.



**Joonis 16.** Vasakul on näha 2%-lise glükoosiga söötmega tassi ning paremal 1%-lise galaktoosiga söötmega tassi. AKY1519 tüves on metsiktüüpi histoonidega plasmiid, tüvedes AKY1520, AKY1521, AKY1522 ja AKY1523 on vastavalt histoonil H3 muteeritud H3K9R, H3K14R, H3K23R ja H3K9,14,23R positsioonid.

Jooniselt nr 16 on näha, et ühegi üksikmutandi puhul ei ole HO-endonukleaasi ekspresseerivatel tüvedel kasvuvõimekuse osas suurt erinevust võrreldes metsiktüüpi H3 histooni ekspresseeriva tüvega võimalik märgata. Küll aga on halvemat kasvu näha kolmikmutandi AKY1523 tüve puhul. Üles kasvanud rakud on kasutanud kas glükoosi või on suutnud galaktoosi indutseeritud promootoriga HO-endonukleaasi tehtud kaheaheelalise katke ära parandada.

Käesolevas töös ei leitud ühte kindlat H3 histooni lüsiinjääki, mille muteerimine arginiiniks põhjustaks rakkude halvema ellujäämise kaheaheelalise DNA katke korral. Samas leiti, et kui on korruga muteeritud kolm erinevat lüsiinjääki (9., 14. ja 23. lüsiin) on rakkude ellujäämine kaheaheelalise DNA katke korral halvem metsiktüüpi H3 histooni kodeerivatest rakkudest. Antud töös tehtud katsete põhjal ei ole võimalik öelda, milline etapp on kaheaheelalise katke parandamisel sellises kolmekordse H3 mutandiga pärimises võrreldes metsiktüüpi H3 histoonidega pärmiga vähem efektiivne. On näidatud, et konstrueeritud pagaripärmi tüves, kus lisaks muteeritud histoonile H3 kombinatsioonis H3K14,23R oli deleteeritud ka histooni atsetültransferaas HAT1, ilmnes MMS-i tekitatud DNA kaheaheelalise katke rekombinatsioonilises parandamises viga Asf1p-sõltuval kromatiini assambleerumisel (Qin ja Parthun, 2002). On ka teada, et histoon H3 14. lüsiinjäägi atsetüleerimise tase suureneb kaheaheelalist DNA katket ümbritsevatel aladel ning on vajalik DNA kahjustuse kontrollpunkti aktivatsiooniks (Wang et al., 2012). Seega võib ka käesolevas töös tehtud katsetes defektne olla nii mõne reparatsioonil osaleva valgu funktsioon katke toimumiskohas või mõni signaalirada, mis rakus kaheaheelalise DNA katke kohta infot edastaks.

Küll aga sai käesoleva tööga konstrueeritud tüvi AKY1513, milles on HO-endonukleaas galaktoosiga indutseeritava promootori kontrolli all ning metsiktüüpi H3 ja H4 geenid *URA3* markeriga plasmiidil. Sellises tüves on võimalik 5-FOA plasmiidivahetussüsteemiga metsiktüüpi histooni geenidega plasmiid efektiivselt asendada erinevaid mutantseid histoone kodeerivate järjestustega plasmiididega. Kuna meie laboris on olemas nii mutantseid H3 kui H4 histoone kodeerivate plasmiidide kollektsioon, võimaldab see edaspidi analüüsida, millised erinevad mutantsed histoonid on HO-endonukleaasi poolt tehtavale kaheaheelisele DNA katkele tundlikud ning seega millised histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid võivad omada rolli DNA reparatsioonis.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eksperimentaalses osas konstrueeriti galaktoosiga indutseeritava promootori kontrolli all olev HO-endonukleaasi ekspresseeriv plasmiid. See integreeriti *Saccharomyces cerevisiae* tüvesse, milles metsiktüüpi H3 ja H4 geenid asuvad plasmiidil ning genoomsed H3 ja H4 järjestused on deleteeritud. Metsiktüüpi histoonide geenidega plasmiid asendati 5-FOA plasmiidivahetus süsteemiga mutantseid H3 histoonide ekspresseerivate plasmiididega (H3K9R, H3K14R, H3K23R, H3K9,14,23R ja kontrolliks metsiktüüpi H3 histooniga plasmiid). Lüsiinide arginiiniks muteerimine kujutab endast atsetüleerimata lüsiinide mimikeerimist. Nii loodi H3 atsetüleerimises defektsed pärmitüved ning neid võrreldi metsiktüüpi histoonidega HO-endonukleaasi ekspresseeriva tüvega. Leiti, et H3K9,14,23R kolmikmutant oli DNA kaheaahelalistele katketele kõige tundlikum, kuid üksikmutantide puhul efekti ei nähtud.

Antud töö tulemuste põhjal ei ole võimalik järeldada, milline mehhanism H3K9,14,23R kolmikmutantses tüves kaheaahelalise katke parandamise puhul häiritud on. Defekt võib seisneda nii mõnes katke kohta infot edastavas signaalirajas kui ka mõne reparatsioonivalgu funktsioonis katke toimumiskohas.

## **Construction of a *Saccharomyces cerevisiae* model system to study the importance of histone H3 acetylation in DNA double strand break repair**

Hanna Sein

### **Summary**

Yeast haploid cells can exist in one of two mating types, either a or  $\alpha$ . Two haploid cells can also mate with cells from the other mating type to form an a/ $\alpha$  diploid. With every cell cycle, yeasts are able to change their mating type. The mating type switch is induced by a double strand break in the MAT-locus made by the HO-endonuclease.

The DSB made by the HO-endonuclease is widely used in studying the repair mechanisms of DNA. In the cell nucleus, DNA is compactly packed with histones. It means, that the repair of DNA is highly dependent on the histone modifications, which make the DNA more accessible for the proteins that take part in the repair process. The modifications can change the strength of the interactions between histone and DNA molecules and the level of DNA condensation. One of the best studied modifications is acetylation, which is mostly connected with transcriptional activation.

In the experimental part of this study, a plasmid expressing the HO endonuclease under the control of galactose inducible promoter was constructed. It was integrated into a yeast strain, in which the wildtype histone H3 and H4 genes were situated on a plasmid and the genes of histone H3 and H4 in the genome were deleted. The plasmids containing the wildtype histone genes were then replaced using the 5-FOA plasmid shuffle system with another plasmids expressing different versions of mutated histone H3 (H3K9R, H3K14R, H3K23R, H3K9,14,23R and a plasmid with wildtype H3 as control). Changing the lysine residues into arginine residues mimics unacetylated lysines. The yeasts expressing histone H3 that are defect in acetylation, were then compared with a yeast strain expressing wildtype histones and also the HO-endonuclease. It was detected, that the triple mutant (H3K9,14,23R) was the most sensible one to the double strand break. No effect among the other tested mutants was detected.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Barlev, N. A., Poltoratsky, V., Owen-Hughes, T., Ying, C., Liu, L., Workman, J. L., & Berger, S. L. (1998). Repression of GCN5 Histone Acetyltransferase Activity via Bromodomain-Mediated Binding and Phosphorylation by the Ku–DNA-Dependent Protein Kinase Complex. *Molecular and Cellular Biology*, 18(3), 1349.
- Betz, R., Crabb, J. W., Meyer, H. E., Wittig, R., & Duntze, W. (1987). Amino acid sequences of a-factor mating peptides from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem.*, 262, 546–548.
- Blumer, K. J., Reneke, J. E., & Thorner, J. (1988). The STE2 gene product is the ligand-binding component of the a-factor receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*, 263, 10836–10842.
- Boeke, J. D., LaCroute, F., & Fink, G. R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Molecular & General Genetics : MGG*, 197(2), 345–6.
- Botstein, D., & Fink, G. R. (1988). Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4858), 1439–43.
- Bucking-Throm, E., Duntze, W., Hartwell, L. H., & Manney, T. R. (1973). Reversible arrest of haploid cells at the initiation of DNA synthesis by a diffusible sex factor. *Experimental Cell Research*, 76, 99–110.
- Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., Tomkinson, A. E., Lin, S. C., ... al., et. (2001). Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Molecular Cell*, 8(5), 1105–15.
- Cheung, P., Tanner, K. G., Cheung, W. L., Sassone-Corsi, P., Denu, J. M., Allis, C. D., ... Wang, H. . (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Molecular Cell*, 5(6), 905–15.
- Connolly, B., White, C. I., & Haber, J. E. (1988). Physical monitoring of mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 8(6), 2342–9.
- Downs, J. A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., ... Côté, J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Molecular Cell*, 16(6), 979–990.
- Duntze, W., MacKay, V., & Manney, T. R. (1970). *Saccharomyces cerevisiae*: a diffusible sex factor. *Science (New York, N.Y.)*, 168(3938), 1472–3.

- Esposito, R. E., & Klapholz, S. (1981). Meiosis and Ascospore Development. In *Cold Spring Harbor Monograph Archive* (Vol. 11A, pp. 211–287).
- Fisher, C. R. (1969). Enzymology of the pigmented adenine-requiring mutants of *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *34*(3), 306–10.
- Fishman-Lobell, J., Rudin, N., & Haber, J. E. (1992). Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(3), 1292–303.
- Freidkin, I., & Katcoff, D. J. (2001). Specific distribution of the *Saccharomyces cerevisiae* linker histone homolog HHO1p in the chromatin. *Nucleic Acids Research*, *29*(19), 4043–51.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., ... Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, *274*(5287), 563–7.
- Haber, J. E. (2012). Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *191*(1), 33–64.
- Hagen, D. C., McCaffrey, G., Sprague, G. F., & Jr. (1986). Evidence the yeast STE3 gene encodes a receptor for the peptide pheromone a factor: gene sequence and implications for the structure of the presumed receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(5), 1418–22.
- Harshman, S. W., Young, N. L., Parthun, M. R., & Freitas, M. A. (2013). H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic Acids Research*, *41*(21), 9593–609.
- Heinicke, S., Livstone, M. S., Lu, C., Oughtred, R., Kang, F., Angiuoli, S. V., ... Dolinski, K. (2007). The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): a comparative genomics analysis tool for biologists. *PloS One*, *2*(8), e766.
- Hereford, L., Fahrner, K., Woolford, J., Rosbash, M., & Kaback, D. B. (1979). Isolation of yeast histone genes H2A and H2B. *Cell*, *18*(4), 1261–71.
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, *52*(4), 536–553.
- Hicks, J. B., & Herskowitz, I. (1976). Direct observations of the action of the homothallism (HO) gene. *Genetics*, *83*, 245–258.
- Jazayeri, A., McAinsh, A. D., & Jackson, S. P. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* Sin3p facilitates DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of*

*Sciences of the United States of America*, 101(6), 1644–9.

- Jensen, R. E., & Herskowitz, I. (1984). Directionality and regulation of cassette substitution in yeast. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 49, 97–104.
- Jenuwein, T., Rea, S., Eisenhaber, F., O’Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z.-W., ... Allis, C. D. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406(6796), 593–599.
- Kasten, M., Szerlong, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Werner, M., & Cairns, B. R. (2004). Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *The EMBO Journal*, 23(6), 1348–59.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693–705.
- Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D., & Wolffe, A. P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, 72(1), 73–84.
- Lefrançois, P., Auerbach, R. K., Yellman, C. M., Roeder, G. S., & Snyder, M. (2013). Centromere-like regions in the budding yeast genome. *PLoS Genetics*, 9(1), e1003209.
- Liang, B., Qiu, J., Ratnakumar, K., & Laurent, B. C. (2007). RSC Functions as an Early Double-Strand-Break Sensor in the Cell’s Response to DNA Damage. *Current Biology*, 17(16), 1432–1437.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–260.
- Luger, K., & Richmond, T. J. (1998). The histone tails of the nucleosome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(2), 140–6.
- Löoke, M., Kristjuhan, K., & Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*, 50(5), 325–8.
- Mersfelder, E. L., & Parthun, M. R. (2006). The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Research*, 34(9), 2653–62.
- Nasmyth, K. (1987). The determination of mother cell-specific mating type switching in yeast by a specific regulator of HO transcription. *The EMBO Journal*, 6(1), 243–8.
- Nasmyth, K. A. (1982). The regulation of yeast mating type chromatin structure by SIR: an action at a distance affecting both transcription and transposition. *Cell*, 30, 567–78.

- Nickoloff, J. A., Chen, E. Y., & Heffron, F. (1986). A 24-base-pair DNA sequence from the MAT locus stimulates intergenic recombination in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(20), 7831–5.
- Pai, C.-C., Deegan, R. S., Subramanian, L., Gal, C., Sarkar, S., Blaikley, E. J., ... Humphrey, T. C. (2014). A histone H3K36 chromatin switch coordinates DNA double-strand break repair pathway choice. *Nature Communications*, 5, 4091.
- Panday, A., & Grove, A. (2016). The high mobility group protein HMO1 functions as a linker histone in yeast. *Epigenetics & Chromatin*, 9(1), 13.
- Patterton, H. G., Landel, C. C., Landsman, D., Peterson, C. L., & Simpson, R. T. (1998). The biochemical and phenotypic characterization of Hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7268–76.
- Pérez-Martín, J. (1999). Chromatin and transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(4), 503–523.
- PHILLIPS, D. M. (1963). The presence of acetyl groups of histones. *The Biochemical Journal*, 87(2), 258–63.
- Qin, S., & Parthun, M. R. (2002). Histone H3 and the histone acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology*, 22(23), 8353–65.
- Santisteban, M. S., Hang, M., & Smith, M. M. (2011). Histone Variant H2A.Z and RNA Polymerase II Transcription Elongation. *Molecular and Cellular Biology*, 31(9), 1848–1860.
- Sherman, F. (2002). Getting Started with Yeast. *Methods in Enzymology*, 350, 3–41.
- Smith, M. M., & Murray, K. (1983). Yeast H3 and H4 histone messenger RNAs are transcribed from two non-allelic gene sets. *Journal of Molecular Biology*, 169(3), 641–61.
- Smith, M. M., & Stirling, V. B. (1988). Histone H3 and H4 gene deletions in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology*, 106(3), 557–66.
- Smolle, M., & Workman, J. L. (2013). Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(1), 84–97.
- Sperling, R., & Bustin, M. (1976). Histone dimers: a fundamental unit in histone assembly. *Nucleic Acids Research*, 3(5), 1263–75.

- Srathern, J., Hicks, J., & Herskowitz, I. (1981). Control of cell type in yeast by the mating type locus: the a1-a2 hypothesis. *J. Mol. Biol.*, *147*, 357–372.
- Stozler, D., Kiltz, H.-H., & Duntze, W. (1976). Primary Structure of alpha-Factor Peptides from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, *69*(2), 397–400.
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, *403*(6765), 41–45.
- Strathern, J. N., Klar, A. J., Hicks, J. B., Abraham, J. A., Ivy, J. M., Nasmyth, K. A., & McGill, C. (1982). Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the MAT locus. *Cell*, *31*(1), 183–92.
- Sugawara, N., Wang, X., & Haber, J. E. (2003). In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Molecular Cell*, *12*(1), 209–19.
- Zhang, W. (2005). The JIL-1 histone H3S10 kinase regulates dimethyl H3K9 modifications and heterochromatic spreading in *Drosophila*. *Development*, *133*(2), 229–235.
- Zhang, X., Wen, H., & Shi, X. (2012). Lysine methylation: beyond histones. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *44*(1), 14–27.
- Tamaru, H. (2010). Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line. *Genes & Development*, *24*(14), 1465–78.
- Tamburini, B. A., & Tyler, J. K. (2005). Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(12), 4903–13.
- Thoma, F., Koller, T., & Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *The Journal of Cell Biology*, *83*(2).
- Thomas, B. J., & Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, *56*(4), 619–30.
- Turner, B. M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays*, *22*(9), 836–845.
- Ushinsky, S. C., Bussey, H., Ahmed, A. A., Wang, Y., Friesen, J., Williams, B. A., & Storms, R. K. (1997). Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, *13*(2), 151–61.
- Walter, P. P., Owen-Hughes, T. A., Cote, J., & Workman, J. L. (1995). Stimulation of Transcription Factor Binding and Histone Displacement by Nucleosome Assembly Protein 1 and Nucleoplasmin Requires Disruption of the Histone Octamer. *Molecular*

*and Cellular Biology*, 15(11), 6178–6187.

- Wan, J. S., Mann, R. K., & Grunstein, M. (1995). Yeast histone H3 and H4 N termini function through different GAL1 regulatory elements to repress and activate transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5664–8.
- van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B., & Gasser, S. M. (2004). Recruitment of the INO80 Complex by H2A Phosphorylation Links ATP-Dependent Chromatin Remodeling with DNA Double-Strand Break Repair. *Cell*, 119(6), 777–788.
- Wang, H., Huang, Z.-Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., ... Zhang, Y. (2001). Methylation of Histone H4 at Arginine 3 Facilitating Transcriptional Activation by Nuclear Hormone Receptor. *Science*, 293(5531).
- Wang, L., Mizzen, C., Ying, C., Candau, R., Barlev, N., Brownell, J., ... Berger, S. L. (1997). Histone acetyltransferase activity is conserved between yeast and human GCN5 and is required for complementation of growth and transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology*, 17(1), 519–27.
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J. A., Schones, D. E., Barski, A., Cuddapah, S., ... Zhao, K. (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature Genetics*, 40(7), 897–903.
- Wang, X., & Haber, J. E. (2004). Role of *Saccharomyces* single-stranded DNA-binding protein RPA in the strand invasion step of double-strand break repair. *PLoS Biology*, 2(1), E21.
- Wang, Y., Kallgren, S. P., Reddy, B. D., Kuntz, K., Lopez-Maury, L., Thompson, J., ... Jia, S. (2012). Histone H3 Lysine 14 Acetylation Is Required for Activation of a DNA Damage Checkpoint in Fission Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 287(6), 4386–4393.
- Weber, C. M., & Henikoff, S. (2014). Histone variants: dynamic punctuation in transcription. *Genes & Development*, 28(7), 672–82.
- Wei, Y., Mizzen, C. A., Cook, R. G., Gorovsky, M. A., & Allis, C. D. (1998). Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), 7480–4.
- Wilkinson, L. E., & Pringle, J. R. (1974). Transient G1 arrest of *S. cerevisiae* cells of mating

type alpha by a factor produced by cells of mating type a. *Experimental Cell Research*, 89(1), 175–87.

Winge, O., & Roberts, C. (1949). A gene for diploidization in yeast. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol*, 24, 341–346.

## LISAD

### Lisa 1

Järgnevas tabelis (Tabel 1) on välja toodud kõik antud töös kasutatud söötmed koos nende koostise ja kasutamise eesmärkidega.

**Tabel 1. Kasutatud söötmete koostis ja kasutamise eesmärk**

Sööde	Koostis	Milleks kasutati?
<b>YPD (yeast extract, peptone, dextrose)</b>	Tardsööde: Agar 20 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, glükoos 20 g/l. Vedelsööde: Mükoloogiline peptoon 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, glükoos 20g/l. Lisaks kasutati glükoosi asemel ka galaktoosi või rafinoosi kontsentratsiooniga 20 g/l.	Pärmirakkude kasvatamine
<b>LB sööde</b>	10g/l trüptooni, 5g/l pärmiekstrakti, 10g/l NaCl , millele lisati ampitsilliini lõpp-kontsentratsioonini 100 µg/ml.	Kasutati <i>E. coli tüve</i> DH5α kasvatamiseks.
<b>5 FOA –HIS</b>	Agar 20 g/l, YNB ( <i>Yeast Nitrogen Base</i> ) 6,7 g/l, glükoos 20 g/l, lüsiin 40 µg/ml, trüptofaan 40 µg/ml, uratsiil 80 µg/ml, adeniin 20 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml.	Kasutati plasmidi vahetus süsteemis.
<b>SC –ADE</b>	Agar 20 g/l, YNB 6,7 g/l, glükoos 20 g/l, DO-mix (–ADE –URA –LEU –TRP –HIS) 2 g/l, trüptofaan 40 µg/ml, histidiin 40 µg/ml.	Kasutati GAL-HO ekspressioonikassetti integreerumise kontrolliks.
<b>SC 2% Glc</b>	Agar 20 g/l, YNB 6,7 g/l, glükoos 20 g/l, DO-mix (–ADE –URA –LEU –TRP –HIS), uratsiil 80 µg/ml, histidiin, leutsiin 80 µg/ml,	Kasutati lahjenduste reaanalüüsiks.

	trüptofaan 40 µg/ml, adeniin 20 µg/ml, lüsiin 40 µg/ml.	
<b>SC 2% Gal</b>	Agar 20 g/l, YNB 6,7 g/l, galaktoos 20 g/l, DO-mix (-ADE -URA -LEU -TRP -HIS), uratsiil 80 µg/ml, histidiin, leutsiin 80 µg/ml, trüptofaan 40 µg/ml, adeniin 20 µg/ml, lüsiin 40 µg/ml.	Kasutati lahjenduste rea analüüsiks.
<b>SC 1% Gal</b>	Agar 20 g/l, YNB 6,7 g/l, galaktoos 10 g/l, DO-mix (-ADE -URA -LEU -TRP -HIS), uratsiil 80 µg/ml, histidiin, leutsiin 80 µg/ml, trüptofaan 40 µg/ml, adeniin 20 µg/ml, lüsiin 40 µg/ml.	Kasutati lahjenduste rea analüüsiks.
<b>DO-MIX</b>	Alaniin, arginiin, asparagiin, aspartaat, tsüsteiin, glutamiin, glutamaat, glütsiin, inositol, isoleutsiin, lüsiin, metioniin, para-aminobensoehape, fenüülalaniin, proliin, seriin, treoniin, türosiin, valiin.  Segust kasutatakse 1 liitri söötme kohta 2g.	Kasutati söötmetes aminohapete allikana.

## Lisa 2

Järgnevas tabelis (Tabel 2) on välja toodud kõik käesolevas töös kasutatud tüved koos nende genotüüpide kirjeldustega ning autoritega.

**Tabel 2. Kasutatud tüvede genotüübid ja autorid**

<b>Tüvi</b>	<b>Kirjeldus</b>	<b>Autor</b>
AKY202	W303, MAT A, <i>hht1-hhf1D(LEU2)hht2-hhf2D(KanMX) [YCP50:HHT2-HHF2(URA3)]</i>	Jesper Svejstrup
AKY1513	W303, MAT A, <i>hht1-hhf1D(LEU2)hht2-hhf2D(KanMX) [YCP50:HHT2-HHF2(URA3)]</i>	Valmistatud antud töö käigus
AKY1519	W303, MAT A <i>hht1-hhf1D(LEU2) hht2-hhf2D(KanMX) GAL-HO::ADE2 [pRS413-H3H4-3F12-wtH3(HIS3)]</i>	Valmistatud antud töö käigus
AKY1520	W303, MAT A <i>hht1-hhf1D(LEU2) hht2-hhf2D(KanMX) GAL-HO::ADE2 [pRS413-H3H4-3F12-H3 K9R(HIS3)]</i>	Valmistatud antud töö käigus
AKY1521	W303, MAT A <i>hht1-hhf1D(LEU2) hht2-hhf2D(KanMX) GAL-HO::ADE2 [pRS413-H3H4-3F12-H3 K14R(HIS3)]</i>	Valmistatud antud töö käigus
AKY1522	W303, MAT A <i>hht1-hhf1D(LEU2) hht2-hhf2D(KanMX) GAL-HO::ADE2 [pRS413-H3H4-3F12-H3 K23R(HIS3)]</i>	Valmistatud antud töö käigus
AKY1523	W303, MAT A <i>hht1-hhf1D(LEU2) hht2-hhf2D(KanMX) GAL-HO::ADE2 [pRS413-H3H4-3F12-H3 K9,14,23R(HIS3)]</i>	Valmistatud antud töö käigus

### Lisa 3

Järgnevas tabelis (Tabel 3) on välja toodud kõik käesolevas töös kasutatud plasmiidide nimetused koos nende genotüüpide kirjelduste ja päritoluga.

**Tabel 3. Kasutatud plasmiidide kirjeldus ja päritolu**

<b>Plasmiid</b>	<b>Kirjeldus</b>	<b>Päritolu</b>
pBlueScriptSK	<i>E. coli Ori</i> , Amp <sup>r</sup>	Universaalne klonereimisvektor firmalt Stratagene
pRS412_GAL_HO	ARS/CEN, <i>ADE2</i> , GAL-HO	Saadud Dr. Jeff Thompsoni käest
pRS413-H3H4-3F12	ARS/CEN, <i>HIS3</i> , H3-3F12; H4	Labori plasmiidide kollektsioon
pRS413-H3H4-3F12-H3K9R	ARS/CEN, <i>HIS3</i> , H3K9R-3F12; H4	Labori plasmiidide kollektsioon
pRS413-H3H4-3F12-H3K14R	ARS/CEN, <i>HIS3</i> , H3K14R-3F12; H4	Labori plasmiidide kollektsioon
pRS413-H3H4-3F12-H3K23R	ARS/CEN, <i>HIS3</i> , H3K23R-3F12; H4	Labori plasmiidide kollektsioon
pRS413-H3H4-3F12-H3K9,14,23R	ARS/CEN, <i>HIS3</i> , H3K9,14,23R-3F12; H4	Labori plasmiidide kollektsioon

#### Lisa 4

Järgnevas tabelites on välja toodud kõik käesolevas töös tehtud PCR reaktsioonide programmid (Tabel 4) ning nendes kasutatud praimerid koos järjestuste ning kasutamise eesmärkidega (Tabel 5).

**Tabel 4. PCR reaktsioonide programmid**

	1.	2.	3.	4.	5.
<b>Reaktsiooni praimerid</b>	<b>I DNA ahelate denaturatsioon</b>	<b>II DNA ahelate denaturatsioon</b>	<b>Praimerite seondumine</b>	<b>DNA süntees</b>	<b>Lõpetav DNA süntees</b>
PRS413F PRS413R	3 min 95°C	25 s 95°C	30 s 54°C	2 min 72°C	5 min 72°C
HOCUT_CTRLF HOCUT_CTRLR	3 min 95°C	30 s 95°C	25 s 56°C	1,5 min 72°C	5 min 72°C
HHT2F H3H4FOR1	3 min 95°C	30 s 95°C	30 s 50°C	45 s 72°C	5 min 72°C

2.-4. osa korrati igal PCR-i reaktsioonil 30 korda.

**Tabel 5. PCR praimerite järjestused ja kasutamise eesmärgid**

<b>Praimeri nimetus</b>	<b>Järjestus</b>	<b>Milleks kasutati?</b>
PRS 413F	5'GCGTAATACGACTCACTATAGG3'	ADE2 markergeeni plasmidi sisenemise kontroll
PRS 413R	5'AACAGCTATGACCATGATTACG3'	ADE2 markergeeni plasmidi sisenemise kontroll
HOcut_CTRLF	5'CTCTGGTAACTTAGGTAAATTACAGC3'	MAT lookuses tekkiva

		kaheaheelalise DNA katke kontroll
HOcut_CTRLR	5'GAATGATGCTAAGAATTGATTGTTTGC3'	<i>MAT</i> lookuses tekkiva kaheaheelalise DNA katke kontroll
HHT2F	5'CTCGGTGTCAAAACATAGTTTG3'	Plasmiidivahetuse kontroll
H3H4FOR1	5'GCTCTAGACATGGTTTCTTGGGTTAT3'	Plasmiidivahetuse kontroll

## **Tänuavaldused**

Sooviksin südamest tänada oma juhendaja Kadrit kannatliku meele eest ning valmidusest alati aidata hoolimata nädalapäevast või kellaajast. Tahaksin tänada ka Arnold Kristjuhanit heade nõuannete eest ning tervet rakubioloogia õppetooli meeldiva seltskonna ning abivalmiduse eest.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Hanna Sein (sünnikuupäev 17.07.1995)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„*Saccharomyces cerevisiae* mudelsüsteemi konstrueerimine uurimaks histoon H3 atsetüleerimise olulisust kaheaheelalise DNA katke parandamises“

mille juhendaja on Kadri Peil,

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

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

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

Tartus, 29.05.2017

