

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

**Transkriptsiooni regulaatorvalgu Yaf9 NuA4- ja SWR1-sõltumatu
homodimeriseerumine pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Paula Ojala

Juhendaja PhD Signe Värv

TARTU 2026

INFOLEHT

Transkriptsiooni regulaatorvalgu Yaf9 NuA4- ja SWR1-sõltumatu homodimeriseerumine pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*)

Transkriptsiooni reguleerimine on geeniekspressioonis oluline etapp, milles omab võtmetähtsust kromatiinistruktuuri muutmine. Pagaripärmi kromatiiniregulatsiooniga seotud valkkomplekside töömehhanismide uurimine aitab paremini mõista ka kõrgemates eukarüootides toimuvat geeniekspressiooni regulatsiooni. Käesolev töö uurib pagaripärmi kromatiini reguleerivate komplekside - NuA4 ja SWR1 - võimalikku interaktsiooni mõlemasse kompleksi kuuluva Yaf9 valgu homodimeriseerumisel koimmunosadestamise katsega. Samuti uuritakse Yaf9 C-terminaalse domeeni rolli selles ning spekulatsioonid Yaf9 potentsiaalsete kompleksidest sõltumatute funktsioonide üle.

Märksõnad: Yaf9, kromatiini struktuur, interaktsioon, Swc4, NuA4, SWR1

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

NuA4- and SWR1-independent homodimerization of transcriptional regulatory protein Yaf9 in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

Regulation of transcription is an important step in gene expression, in which remodeling of chromatin structure plays a key role. Studying the mechanisms of chromatin regulatory protein complexes in baker's yeast contributes to a better understanding of gene expression regulation in higher eukaryotes. This study investigates the potential interaction between two chromatin regulatory complexes in baker's yeast — NuA4 and SWR1 — through homodimerization of Yaf9, a subunit shared between both complexes, using co-immunoprecipitation. The role of the Yaf9 C-terminal domain in this interaction is also examined, and the potential complex-independent functions of Yaf9 are discussed.

Keywords: Yaf9, chromatin structure, interaction, Swc4, NuA4, SWR1

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Eukariootne transkriptsioon	7
1.2. Kromatiin ja transkriptsiooni regulatsioon	7
1.2.1. Histonide post-translatsiooniline modifitseerimine	8
1.2.2. Kromatiini remodelleerimine	9
1.3. NuA4 kompleks	11
1.4. SWR1 kompleks.....	12
1.5. Yaf9 valk	13
1.6. Swc4 valk.....	18
1.7. Yaf9 interaktsioon Swc4 valguga	19
1.8. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kui mudelorganism	20
1.8.1. Pagaripärmi ploidsus ja paardumistüübid.....	21
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	22
2.1. Töö eesmärgid	22
2.2. Materjal ja meetodika.....	23
2.2.1. Kasutatud tüved	23
2.2.2. Kasutatud söötmed	23
2.2.3. Pärimistüvede ristamine	23
2.2.4. <i>Western blot</i> valkude ekspressiooni kontrollimiseks	26
2.2.5. Koimmunopretsipitatsioon.....	27
2.2.6. 1E2-epitoobi lisamine YAF9 geenile	28
2.3. TULEMUSED	31
2.3.1. Metsiktüüpi ja mutantset Swc4 valku ning erinevate afiinsusmärgistega Yaf9 valke ekspresseerivate pärimistüvede konstrueerimine	31
2.3.2 Yaf9 ja Swc4 valgud ekspresseeruvad mõlemas ristamise tulemusena saadud tüves..	33
2.3.3. Yaf9 homodimeriseerub interaktsiooni puudumisel Swc4-ga	35
2.3.4. Yaf9 C-terminaalne domeen on vajalik kahe Yaf9 interaktsiooniks	38
2.4. ARUTELU	45

KOKKUVÕTE	49
Summary.....	50
TÄNUSÕNAD	52
KIRJANDUSE LOETELU	53
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	58
LISAD	59
LISA 1.....	59
LISA 2.....	60
LIHTLITSENTS	61

KASUTATUD LÜHENDID

ChIP – *chromatin immunoprecipitation* (kromatiini immunosadestamine)

MAT – *mating type* (paardumistüüp)

NuA4 – *Nucleosome Acetyltransferase of H4* (histooni H4 atsetüültransferaas)

Sir-kompleks – *silent information regulator complex* (geenivaigistuskompleks heterokromatiinses alas, koosneb Sir2-, Sir3- ja Sir4-valkudest)

SWR1 – *SWI2/SNF2-Related 1 Chromatin Remodeling Complex* (SWI/SNF2

remodelleerimiskompleksi alamperekonnaga seotud kromatiini remodelleerimiskompleks, mis paigutab pärmis histoonivarianti Htz1 kromatiini)

TIP60 – *Tat-interactive protein, 60 kDa, complex* (kromatiini modifitseerimis- ja remodelleerimiskompleks inimeses)

YEATS – Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5 (nimetatud valkudes sisalduv spetsiifiline valgudomeen)

YPD – *yeast extract, peptone, dextrose* (pärmieksrakts, pepton, dekstroos; pärmirakkude kasvatamiseks kasutatav rikassööde)

SISSEJUHATUS

Õigesti reguleeritud geenide avaldumine on tähtis elusorganismi kõikide essentsiaalsete protsesside normaalseks toimimiseks. Geeniekspressiooni esmane reguleerimine toimub transkriptsiooni tasemel, kus DNA-lt sünteesitakse RNA molekul. DNA on pakitud rakutuumas tihedaks DNA-valk-kompleksiks — kromatiiniks. Kromatiinistruktuuri reguleerimine on dünaamiline ja keerukalt koordineeritud protsess, mida viivad läbi selleks välja kujunenud valkkompleksid, mis mõjutavad DNA ja nukleosoomide vahelisi elektrokeemilisi interaktsioone histoonisabadele modifikatsioonide lisamisega või nukleosoomide liigutamisega kromatiinil.

Kuna kromatiini regulatsioonihäired on seotud mitmete haiguslike seisunditega inimeses (näiteks vähkkasvaja), on oluline kromatiini modifitseerimis- ja remodelleerimiskomplekside töömehhanismide põhjalikum uurimine (Valencia ja Kadoch, 2019). Näiteks mutatsioonid inimese rakkudele elutähtsas TIP60 (*Tat-interactive protein, 60 kDa*) kompleksis, mis teostab histoonisabade atsetüleerimist ja histoonivariandi H2A.Z paigutamist kromatiini, on seotud vähi ja neurodegeneratiivsete haigustega. Sealjuures on nii järjestuspõhine analüüs kui ka struktuuriuuringud näidanud, et TIP60 on evolutsiooni käigus tekkinud pärmi NuA4 histooni atsetüültransferaasi kompleksi ja SWR1 histoonivariandi vahetamiskompleksi ühinemisel (Yang *et al.*, 2024). Käesolev töö käsitleb pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* NuA4 ja SWR1 komplekside töömehhanismi. Kuna pärmiliigis *Candida albicans* on näidatud NuA4 ja SWR1 komplekside interaktsiooni otseselt transkriptsiooni regulaatorvalgu Yaf9 kaudu (X. Wang *et al.*, 2018), uurib käesolev töö Yaf9 potentsiaalset rolli mainitud komplekside töös pagaripärmis. Seejuures kuulub Yaf9 pagaripärmis mõlemasse kompleksi, millega seondumist vahendab komplekside teine alaühik — Swc4 valk, mille C-terminaalne domeen seondub Yaf9 C-terminaalse domeeniga.

Käesoleva töö eesmärk on teada saada, kas transkriptsiooni regulaatorvalk Yaf9 omab pagaripärmis NuA4 ja SWR1 kompleksidest sõltumatut võimet omavahel seonduda, kasutades koimmunosadestamise meetodit. Samuti uuritakse Yaf9 C-terminaalse domeeni rolli selles.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Eukarüootne transkriptsioon

Transkriptsioon ehk RNA sünteesimine DNA matriitsahelalt on geeniekspressiooni esimene etapp, mis toimub eukarüootse raku tuumas. Transkriptsiooni viib läbi DNA-sõltuv RNA polümeraas koos paljude transkriptsioonifaktorite jm valkude ja valgukompleksidega, mis reguleerivad geeniekspressiooni vastusena signaalidele raku sise- ja väliskeskkonnast, mis on hädavajalik raku elulisteks protsessideks (Venters ja Pugh, 2009). Eukarüootsetes rakkudes teostavad RNA sünteesi kolm spetsialiseerunud RNA polümeraasi: RNA polümeraas I, mis transkribeerib ribosomaalset RNA-d (rRNA), RNA polümeraas II, mis sünteesib informatsiooni-RNA-d (mRNA) ja regulatoorseid mittekodeerivaid RNA-sid, ning RNA polümeraas III, mis sünteesib lühikesi RNA-sid, sh transport-RNA-d (tRNA). Kõigi polümeraaside teostatava transkriptsiooni põhietapid on sarnased: preinitsiatsiooni kompleksi/suletud kompleksi moodustumine, DNA ahelate lahknemine promootoril, initsiatsioon, varajane transkriptsioon, elongatsioon ja terminatsioon. Siiski vajab RNA polümeraas II põhine transkriptsioon enim kofaktoreid, mis võimaldab geeniekspressiooni ulatuslikumat reguleerimist võrreldes teiste polümeraaside põhise transkriptsiooniga (Girbig *et al.*, 2022).

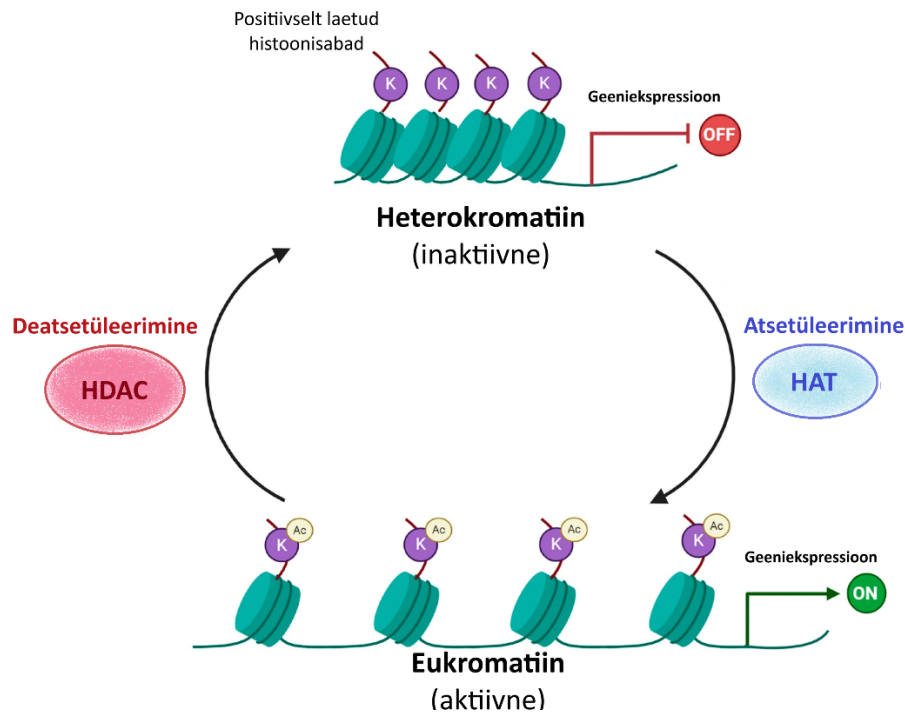
1.2. Kromatiin ja transkriptsiooni regulatsioon

Eukarüootse raku genoom on pakitud tuuma kromatiini kujul. Kromatiin tähendab genoomset DNA-d, mis on seotud valkudega. Kromatiini põhiühikuks on nukleosoom, mille keskmes on histoonivalkude oktameer (H2A, H2B, H3, H4 — igaühel kaks koopiat), ning mille ümber on keerdunud 147 aluspaari (ap) DNA-d. Nukleosoomide vahele jääb linker-DNA, mille pikkus jääb 10-80 ap vahemikku (Gross *et al.*, 2015). Kromatiini madalama astme 10 nm läbimõõduga struktuuri nimetatakse „pärlid keel“ struktuuriks, kuna selline kromatiin on avatud ja seega transkriptsiooniliselt aktiivne (eukromatiin). *In vitro* tingimustes moodustub ka 30 nm läbimõõduga kõrgema astme kromatiinistruktuur. Uuemad mikroskoopia-uuringud aga näitavad, et *in vivo* seesugust korrapärast transkriptsiooniliselt vaigistatud heterokromatiinset struktuuri ei moodustu. Selle asemel on kromatiin ebakorrapärase diameerti ja struktuuriga, moodustades nukleosoomide kogumikke (Sokolova *et al.*, 2023).

Transkriptsiooni algatamiseks peavad mitmed järjestusspetsiifilised transkriptsiooniaktivaatorid seonduma DNA reguleerijatele elementidele, kuid tihedalt pakitud kromatiinstruktuur on sellele takistuseks (Venters ja Pugh, 2009). Samuti on nukleosoomid takistuseks transkriptsiooni elongatsioonil. Seetõttu on kromatiinstruktuuri muutmine geeniekspressiooni reguleerimiseks väga vajalik. Kromatiinstruktuuri muutmist teostavad rakkudes histoonide modifitseerimiskompleksid ja kromatiini remodelleerimiskompleksid, mis värvatakse kromatiinile transkriptsiooni aktivaatorite poolt (Gottesfeld, 2019).

1.2.1. Histoonide post-translatsiooniline modifitseerimine

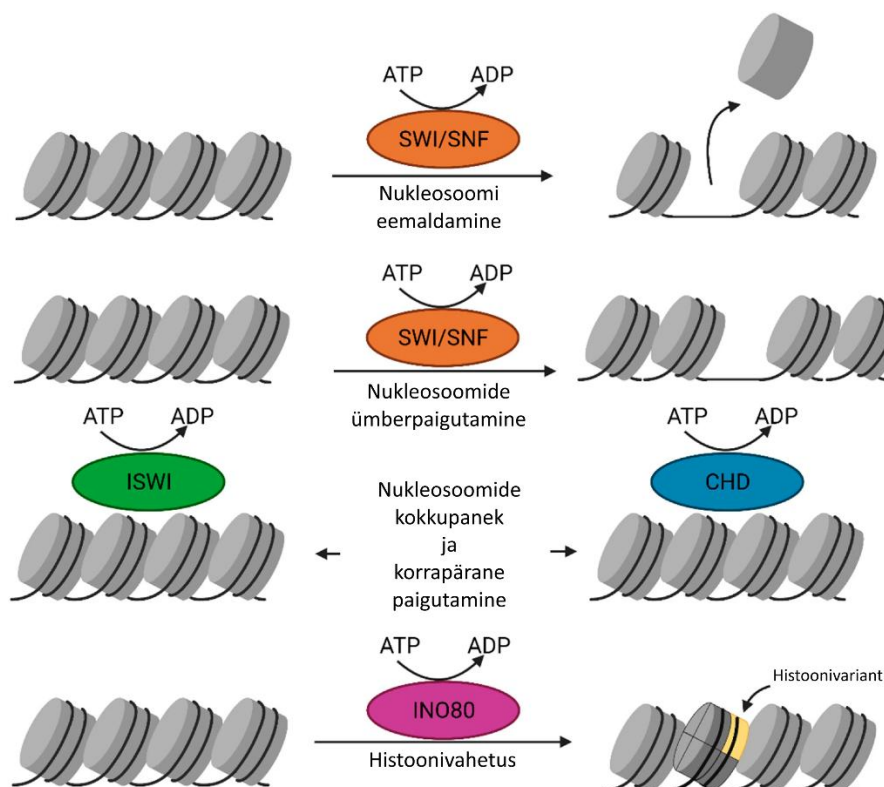
Histoonidel modifitseeritakse enamasti N-terminaalseid sabasid, mis ulatuvad nukleosoomist välja ja on tugeva positiivse laenguga tänu mitmete lüsiinijääkide olemasolule, mis interakteerudes negatiivselt laetud DNA-ga stabiliseerivad nukleosoomi (Peterson ja Laniel, 2004; Robert ja Jeronimo, 2023). Histoonisabade post-translatsioonilisi modifikatsioone on erinevaid: atsetüleerimine, metüleerimine, fosforüleerimine, ubikvitineerimine, sumoüleerimine, histooni saba lõikamine jpt. Atsetüleerimine ja fosforüleerimine vähendavad teadaolevalt histoonide positiivset laengut, mis nõrgestab elektrostaatilisi interaktsioone DNA ja histoonide vahel, muutes kromatiini avatumaks ka transkriptsiooni masinavärgile (Joonis 1). Teisalt saab lüsiinijääkide metüleerimine olla seotud kas transkriptsiooni aktiveerimisega või repressiooniga olenevalt, millistel aminohappejääkide positsioonidel modifikatsioon on. Samuti võivad erinevad modifikatsioonid üksteist vastastikku mõjutada nii soodustavalt kui pärssivalt. Lisaks on mitmed modifikatsioonid seondumiskohtadeks teistele valkudele, mis „loevad“ neid modifikatsioone reguleerides omakorda geeniekspressiooni (Bannister ja Kouzarides, 2011). Käesolevas töös käsitletakse eraldi peatükis põhjalikumalt pagaripärmi Yaf9 ja Swc4 valkused sisaldavat histooni atsetüültransferaasi NuA4.



Joonis 1. Histoonide atsetüleerimise ja deatsetüleerimise skeem. Histoonisabade positiivselt laetud lüsiinijääke (K) atsetüleerib histooni atsetüültransferaas (HAT) lisades neile atsetüülrühmad (Ac). See vähendab DNA ja histoonide elektrostaatilisi interaktsioone, mille tulemusel kromatiinistruktuur muutub avatumaks eukromatiinseks alaks, mis on transkriptsiooniliselt aktiivne. Histooni deatsetülaasi kompleks (HDAC) vastupidiselt eemaldab histoonisabadelt atsetüülrühmasid, mis taastugevdab DNA ja histoonide vahelisi interaktsioone. Selline kromatiinistruktuur muudab DNA transkriptsiooniaktivaatoritele raskesti ligipääsetavaks, mistõttu on see ala transkriptsiooniliselt inaktiivne. Modifitseeritud joonis allikast (Miziak *et al.*, 2024).

1.2.2. Kromatiini remodelleerimine

Kovalentseid histoonimodifikatsioone tunnevad ära kromatiini remodelleerivad kompleksid spetsiaalsete valgudomeenide kaudu. Näiteks bromodomeenid tunnevad ära atsetüleeritud lüsiine, kromodomeenid aga metüleeritud lüsiine. Lisaks saavad transkriptsiooniaktivaatorid ja repressorid värvata genoomile remodelleerimiskomplekse seondudes nendega otse. Kõik kromatiini remodelleerimiskompleksid kasutavad ATP hüdrolyüsi energiat, et lõhkuda histooni-DNA vahelist sidet ning muuta nukleosoomide paigutust, stabiilsust ja koostist kromatiinis (Joonis 2). (Clapier *et al.*, 2017; Clapier ja Cairns, 2009)



Joonis 2. ATP-sõltuvate remodelleerimiskomplekside töömehhanismid. SWI/SNF alamperekond muudab kromatiini ligipääsetavaks nukleosoomide eemaldamise või ümberpaigutamise abil. ISWI ja CHD alamperekonnad tegelevad nukleosoomide assambleerimisega ja/või korrapärase paigutamisega kromatiinil. INO80 alamperekond vahetab histoone alternatiivsete histoonivariantide vastu. Modifitseeritud joonis allikast (Morrison ja Thakur, 2021).

ATPaasi põhised remodelleerimiskompleksid on liigitatud RNA/DNA helikaasi superperekonda 2, mis jaguneb katalüütilise alaühiku domeenide põhjal neljaks alamperekonnaks: ISWI (*imitation switch*), CHD (*chromodomain, helicase, DNA binding*), SWI/SNF (*switching defective/sucrose nonfermenting*) ja INO80 (*inositol requiring 80*) alamperekonnad. SWI/SNF alamperekond muudab kromatiini ligipääsetavaks tänu nukleosoomide ümberpaigutamisele või eemaldamisele. ISWI alamperekond tegeleb nukleosoomide assambleerimisega ja korrapärase paigutamisega. CHD alamperekond tegeleb peamiselt kromatiini kokkupanekuga, kuid imetajates omab mitmekesisemat funktsiooni. INO80 alamperekond vahetab harilikke histoone alternatiivsete histoonivariantide vastu. Viimasesse alamperekonda kuulub ka peamiselt leiduv H2A-H2B dimeeri H2A.Z-H2B dimeeride vastu vahetav SWR1 kompleks (Clapier *et al.*, 2017; Clapier ja Cairns, 2009), mille alaühikuteks on nii Yaf9 kui ka Swc4 valk, ja mida käsitletakse antud töös põhjalikumalt eraldi peatükis.

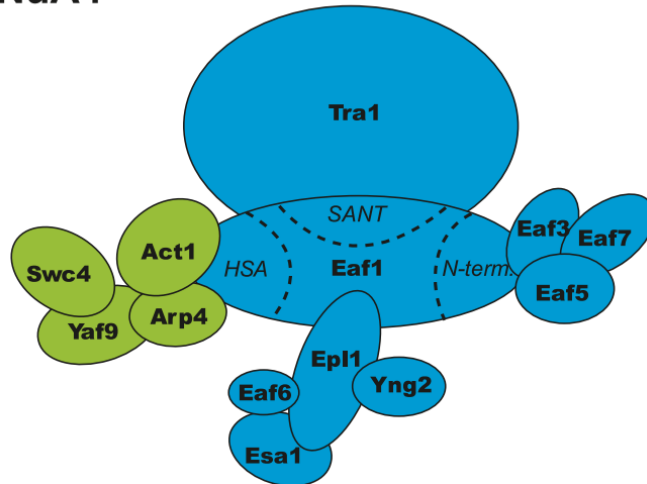
1.3. NuA4 kompleks

NuA4 (*Nucleosome Acetyltransferase of H4*) on histooni atsetüültransferaasi aktiivsusega kompleks pagaripärmis, mis vastutab peamiselt histooni H4 atsetüleerimise eest, ja vähesemal määral atsetüleerib histooni H2A (Allard *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 1999). Samuti atsetüleerib NuA4 enamus histoonivariandi Htz1 (H2A.Z pärmis) lüsiinijääke (Babiarz *et al.*, 2006). ChIP analüüs (ingl *chromatin immunoprecipitation* — kromatiini immunosadestamine) PHO5 geeni põhjal on näidanud, et NuA4-sõltuv H4 atsetüleerimine promootoralal soodustab histoonivariandi Htz1 inkorporeerimist kromatiinile SWR1 kompleksi poolt, kuigi ei ole selleks hädavajalik. Vastupidiselt SWR1 kompleksi poolne Htz1 paigutamine kromatiinile ei mõjuta oluliselt NuA4 poolset H4 atsetüleerimist (Auger *et al.*, 2008). Lisaks on leitud, et NuA4 kompleks on seotud DNA replikatsiooniga ja DNA kahjustustele vastamisega (Kobor *et al.*, 2004).

Kuna NuA4 kompleksi suurim alaühik Tra1 (Joonis 3) interakteerub koht-spetsiifiliste transkriptsioonifaktoritega (Brown *et al.*, 2001), on välja pakutud mudel, mille kohaselt transkriptsioonifaktorid seonduvad Tra1-ga, värvates NuA4 kompleksi transkribeeritavate geenide promootoraladele, mille tulemusel histoonisabade „lugejavalgud“ suunavad kompleksi spetsiifilisemalt nukleosoomidele ning atsetüültransferaasi moodul saab atsetüleerida histoonisabad, et säilitada piirkonnas aktiivset transkriptsiooni (Zukin *et al.*, 2022).

NuA4 koosneb 13 alaühikust: Esa1, Tra1 (Allard *et al.*, 1999), Act1, Arp4, Epl1 (Galarneau *et al.*, 2000), Eaf3 (Eisen *et al.*, 2001), Yng2 (Nourani *et al.*, 2001), Yaf9 (Le Masson *et al.*, 2003), Eaf1, Eaf2, Swc4 (Krogan *et al.*, 2004), Eaf5 ja Eaf6 (Auger *et al.*, 2008) (Joonis 3). Esa1 on NuA4 kompleksi katalüütiline alaühik ja essentsiaalne valk, mis on vajalik rakutsükli normaalseks progressiooniks (Clarke *et al.*, 1999). NuA4 saab eksisteerida ka väiksema, nn Piccolo-NuA4 kompleksina, millesse kuuluvad Esa1, Yng2, Eaf6 ja Epl1 alaühikud (Auger *et al.*, 2008; Boudreault *et al.*, 2003). Samuti on leitud, et Eaf5/7/3 trimeerne moodul esineb pärmirakus iseseisvalt NuA4 kompleksist sõltumatult (Rossetto *et al.*, 2014). NuA4 kokkupaneku platvormiks on Eaf1, mis on NuA4-spetsiifiline ja interakteerub nelja funktsionaalse mooduliga: Piccolo-NuA4, Eaf5/7/3 trimeer, Tra1 ning SWR1 ja INO80 kompleksidega jagatud alaühikute moodul (Arp4/Act1/Swc4/Yaf9) (Auger *et al.*, 2008).

NuA4



Joonis 3. NuA4 kompleksi skemaatiline ülesehitus. Katkendjoonega on näidatud Eaf1 valgu domeenid, millega teised kompleksi alaühikud arvatavalt seonduvad. Rohelisega on märgitud NuA4 ühised alaühikud SWR1 kompleksiga. Joonis pärineb allikast (Lu *et al.*, 2009).

1.4. SWR1 kompleks

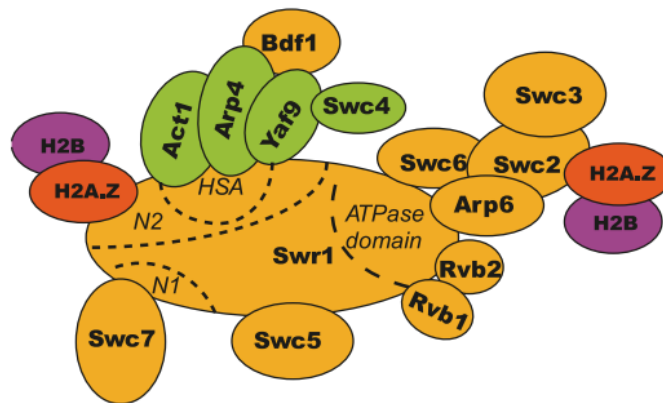
SWR1 (*SWI2/SNF2-Related 1 Chromatin Remodeling Complex*) on ATPaasse aktiivsusega kromatiini remodelleerimiskompleks, mille Swr1 alaühik kasutab ATP hüdrolyüsist saadavat energiat, et katalüüsida histoonivariandi Htz1 (H2A.Z pagaripärmis) paigutamist eukromatiinsesse piirkonda (Kobor *et al.*, 2004; Mizuguchi *et al.*, 2004). Kuna *swr1Δ* tüves on Htz1 tase normaalsest palju madalam, viitab see, et SWR1 kompleks kaitseb histoonivarianti Htz1 ka degradatsioonist eest (Kobor *et al.*, 2004).

Normaalselt paiknevad pärmirakus Sir-vaigistuskompleksi valgud [NAD-sõltuv histooni deatsetülaas Sir2, Sir3 ja Sir4 (Imai *et al.*, 2000)] heterokromatiinis, näiteks telomeerides ja vaigistatud paardumistüübilookusetes (Hecht *et al.*, 1996; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1997). Histoonivariant Htz1 on vajalik heterokromatiini piiril, et takistada vaigistavate Sir-valkude levikut aktiivselt transkribeeritavatesse lookustesse (Meneghini *et al.*, 2003). Sir-valkude leviku takistamiseks eukromatiinsesse alasse on lisaks Htz1 olemasolule kromatiinis vajalik ka selle atsetüleerimine. Samuti on kinnitatud, et histoonivariandi Htz1 atsetüleerimine NuA4 poolt nõuab eelnevat SWR1 kompleksi poolset Htz1 paigutamist kromatiinile (Babiarz *et al.*, 2006).

SWR1 kompleksil on oluline roll ka DNA replikatsioonis ja reparatsioonis, kuna nii *swr1Δ* kui ka *htz1Δ* tüved on tundlikud hüdroksüüureale (deoksünukleosiidtrifosfaadi sünteesi inhibiitor), benomüülile (mikrotuubulite destabiliseerija) ja formamiidile (põhjustab DNA kahjustusi) (Kobor *et al.*, 2004). Veel on leitud, et külmatundlikkus pärmis on seotud eelkõige SWR1 kompleksi funktsioonidega, kuna *swr1Δ*, *htz1Δ* ja *yaf9Δ* tüved on külmatundlikud, kuid mitte NuA4 kompleksi-spetsiifiliste alaühikute mutatsioonidega tüved. (H. Zhang *et al.*, 2004).

SWR1 koosneb 14 alaühikust: Swc1, Swc2, Swc3, Swc4, Swc5, Swc6, Swc7, Bdf1, Yaf9, Arp4, Arp6, Rvb1, Rvb2 ja Act1 (Kobor *et al.*, 2004; Krogan *et al.*, 2003; Mizuguchi *et al.*, 2004) (Joonis 4). Swr1 on 1514-aminohappeline suur SWR1 alaühik, mis lisaks katalüütilisele aktiivsusele, on platvormiks ka mitmete teiste alaühikute seondumisele (Lin *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2005, 2009).

SWR1-C



Joonis 4. SWR1 kompleksi skemaatiline ülesehitus. Katkendjoonega on näidatud Swr1 valgu domeenid, millega teised kompleksi alaühikud arvatavalt seonduvad. Rohelisega on märgitud SWR1 ühised alaühikud NuA4 kompleksiga. Samuti on näidatud SWR1 kompleksi kaks H2A.Z-H2B dimeeriga seondumiskohta. Joonis pärineb allikast (Lu *et al.*, 2009).

1.5. Yaf9 valk

Yaf9 kuulub histoonivarianti Htz1 kromatiinile paigutavasse SWR1 kompleksi ja histooni atsetüültransferaasi kompleksi NuA4 (Kobor *et al.*, 2004; H. Zhang *et al.*, 2004). Nendes kompleksides on Yaf9 teadaolevaks funktsiooniks histooni atsetüüllüsiini „lugemine“ aidates värvata antud komplekse kromatiinil spetsiifilistesse piirkondadesse oma N-terminaalse YEATS-domeeni kaudu (J. Zhang *et al.*, 2021). Siiski uuritakse praegu aktiivselt ka Yaf9 teisi

potentsiaalseid funktsioone pärmirakus, mis ei ole YEATS-domeeniga seotud (Jürgens *et al.*, 2026).

Yaf9 YEATS-domeen

Yaf9 YEATS-domeeni konserveerunud funktsiooniks on histooni H3 atsetüülüsiinmärgi lugemine. Peptiididega seondumise katsed (ingl *peptide pulldown assay*) on näidanud, et pagaripärmi Yaf9 YEATS-domeen seondub atsetüülmärkidega nii histooni H3 9. positsiooni lüsiinil (H3K9ac) kui ka 27. positsiooni lüsiinil (H3K27ac), kuid eelistab seondumist H3K27ac modifikatsiooniga (Klein *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2014). Lisaks on leitud, et Yaf9 YEATS-domeen suudab seonduda ka krotonüülitud histooni H3 modifikatsioonidega (H3K9cr ja H3K27cr), kuid nõrgemalt kui atsetüülmärgistega samadel positsioonidel (J. Zhang *et al.*, 2021).

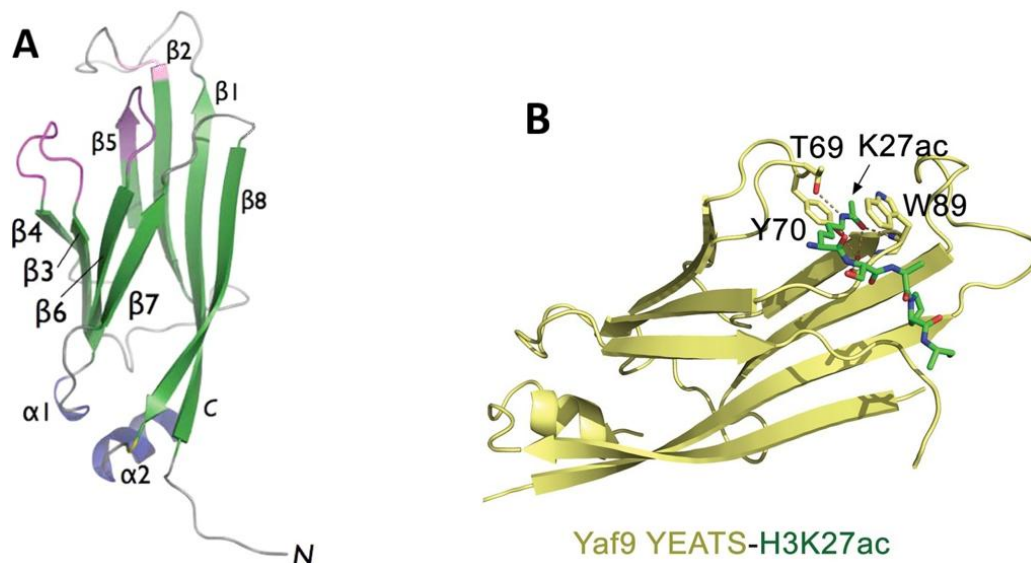
Yaf9 kuulub koos Taf14 ja Sas5 valkudega YEATS-domeeniga valkude perekonda pärmis (Schulze *et al.*, 2009), kusjuures *yaf9Δtaf14Δsas5Δ* kolmikmutatsioon on letaalne, kuigi ükski kolmest geenist eraldi ei ole essentsiaalne (H. Zhang *et al.*, 2004). YEATS-domeeniga valke leidub rohkem kui 70 eukarüootses liigis, sh inimeses, ning nende liikmeid on üle 100 (Schulze *et al.*, 2009). Inimese YEATS-domeeni sisaldavatest valkudest on järjestuselt pagaripärmi Yaf9 valgule kõige sarnasem Gas41 (Le Masson *et al.*, 2003), mille YEATS-domeen suudab seonduda nii atsetüleeritud H3K27-ga kui ka H3K14-ga (Hsu *et al.*, 2018). Yaf9 YEATS-domeen paikneb N-terminaalselt ligikaudu aminohappepositsioonidel 40-120 (Joonis 5) (J. Zhang *et al.*, 2021).



Joonis 5. Yaf9 valgu skeem. Numbrid tähistavad aminohappejääkide positsioone Yaf9 valgus. Sinise kastiga on märgitud Yaf9 aminohapete vahemik, mis moodustab YEATS-domeeni ning punase kastiga on märgitud aminohapete vahemik, mis moodustab lõim-põim (ingl *coiled-coil*) domeeni. Domeenide asukohad pärinevad allikast (J. Zhang *et al.*, 2021).

Yaf9 YEATS-domeen koosneb kaheksast antiparalleelsest β -lehest, mis moodustavad nn β -võileiva konformatsiooni, mis on omane immunoglobuliini voltumisele (Joonis 6A) (A. Y. Wang *et al.*, 2009). YEATS-domeenil esineb kolm konserveerunud struktuurset ala: lõhe (ingl *cleft*) kahe α -

heeliksi vastasotsas β -võileivas, hüdfoobne madal süvend (ingl *groove*) YEATS-domeeni N- ja C-terminaalse otsa lähedal ja positiivse laenguga piirkond lõhe ja süvendi vahel (A. Y. Wang *et al.*, 2009). Röntgenkristallograafia abil koostatud rekonstruktsioon Yaf9 YEATS-domeeni kristallstruktuurist koos H3K27ac peptiidiga näitab, et K27ac atsetüülrühm inserteerub YEATS-domeeni kahe aromaatsse aminohappe Y70 ja W89 vahele, mis moodustavad nn aromaatsse puuri (ingl *aromatic cage*) (Klein *et al.*, 2018). Seejuures 70. positsioonil paiknev türosiin asub kolmanda ja neljanda β -lehe vahel ning 89. positsioonil paiknev trüptofaan asub viienda ja kuuenda β -lehe vahelises aasas, konserveerunud lõhe piirkonnas (Joonis 6B) (Klein *et al.*, 2018; A. Y. Wang *et al.*, 2009).



Joonis 6. Yaf9 valgu struktuur ja atsetüleeritud histooni H3K27ac siduv struktuur YEATS-domeenis. (A) Yaf9 β -võileiva struktuur. Näidatud on aasadega ühendatud β -lehtede paiknemine ning kaks α -heeliksit, mis on suunatud N- ja C-terminaalse otsa poole. Modifitseeritud joonis allikast (A. Y. Wang *et al.*, 2009). (B) Yaf9 struktuur koos K27ac peptiidiga, mis asetub Yaf9 YEATS-domeeni. Näidatud on Yaf9 olulised aminohapped (T69, Y70, W89), mis on vajalikud atsetüleeritud K27 peptiidi sidumiseks. Modifitseeritud joonis allikast (Klein *et al.*, 2018).

Yaf9 YEATS-sõltumatud funktsioonid

YEATS-domeeni W89A punktmutatsioon kaotab Yaf9 YEATS-domeeni seondumise H3K27ac-ga *in vitro*. Selle tagajärjel väheneb histoonivariandi Htz1 inkorporeerimine kromatiinile ja vähesel määral H4 hüperatsetüleerimine *in vivo* ning esinevad kasvudefektid, mis on sarnased YAF9 täisdeletsiooni fenotüübile (Klein *et al.*, 2018). Ometi ei ole sellise Yaf9 punktmutatsiooniga tüvi

isegi koos atsetüleerimatu H4 histooniga (H4K5,8,12R) letaalne, kuigi *yaf9Δ* + H4K5,8,12R tüvi on letaalne. See viitab, et Yaf9 YEATS-domeeni aktiivsus ei ole H4 hüpoatsetüleerimisel nii oluline kui Yaf9 muud funktsioonid, ning Yaf9 essentsiaalne funktsioon sõltub millestki muust peale histoonimodifikatsioonide lugemise (Jürgens *et al.*, 2026).

Lisaks esineb Yaf9 W89A mutandis hilinemist pärmi metaboolses rakutsükklis, kuid täieliku YAF9 deletsiooniga tüves ei teki üldse metaboolsele tsüklile omaseid kõrge ja madala hapnikutarbimise faase. Samuti on täieliku YAF9 deletsiooniga tüvi palju tundlikum DNA-d kahjustavate ühendite suhtes kui W89A mutatsiooniga tüvi (J. Zhang *et al.*, 2021), mis on kooskõlas leiuga, et Yaf9-l on roll spontaanse DNA kahjustuse vastuses (Jürgens *et al.*, 2026). See toetab järeldust, et YEATS-domeen on vajalik vaid osade Yaf9 funktsioonide jaoks, samas kui Yaf9 valk tervikuna on palju olulisem. Lisaks omab Yaf9 rolli homoloogilise rekombinatsiooni rajas kaheaahelaliste DNA katkete parandamisel NuA4 ja SWR1 komplekside koosseisus (Jürgens *et al.*, 2026).

Yaf9 lõim-põim (*coiled-coil*) domeen

Yaf9 C-terminaalne lõim-põim domeen (ingl *coiled-coil*) on vajalik nii NuA4-ga kui SWR1-C-ga seondumiseks (H. Zhang *et al.*, 2004; A. Y. Wang *et al.*, 2009), ja seda läbi interaktsiooni Swc4 valgu C-terminusega, mis kuulub samuti mõlemasse kompleksi (Bittner *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2010). Yaf9 lõim-põim domeen asub valgu C-terminuses ligikaudu aminohappepositsioonidel 185-220 (Joonis 5) (Le Masson *et al.*, 2003; J. Zhang *et al.*, 2021). Et Yaf9 funktsiooniks on oluline Swc4 valguga seondumine, näitab see, et pärmitüvi, milles Yaf9 ja Swc4 üksteisega ei seondu, on mõõdukalt tundlik mikrotuubuleid destabiliseeriva ühendi benomüüli suhtes (Bittner *et al.*, 2004).

Yaf9-GAS41 hübriidvalgud, mis sisaldavad minimaalselt Yaf9 lõim-põim domeeni, suudavad päästa *yaf9Δ* tüve kasvudefektid formamiidi, benomüüli ja hüdroksüurea juuresolekul, kuid GAS41 lõim-põim domeeni sisaldavad hübriidid ei suuda. Samuti puhastuvad nii SWR1-C subühikutega kui ka NuA4 kompleksi subühikutega koos hübriidvalgud, mis omavad minimaalselt Yaf9 lõim-põim domeeni (A. Y. Wang *et al.*, 2009), mis kinnitab, et Yaf9 lõim-põim domeen on funktsionaalselt spetsiifiline ja selle funktsioon sõltub nii SWR1 kui ka NuA4 kompleksi seondumisest.

Koht-spetsiifilise mutatsiooniga Yaf9 tüvi, mille YEATS-domeeni piirkonnas olevad aminohappejäägid positsioonidel 80-82 on vahetatudalaniini vastu, omab vaid osalist tundlikkust madala temperatuuri ja UV-kiirguse suhtes ning kõrget tundlikkust metüülmetaansulfonaadi suhtes. Samas kui nii *yaf9Δ* tüvi kui ka Yaf9 C-terminaalse deletsiooniga tüvi on mõlemad väga tundlikud nii madala temperatuuri kui ka erinevate DNA reparatsiooni ja metabolismi häirivate tegurite suhtes (H. Zhang *et al.*, 2004), mistõttu on Yaf9 C-terminusel ellujäämiseks stressitingimustes ulatuslikum roll kui tema YEATS-domeenil.

yaf9Δ

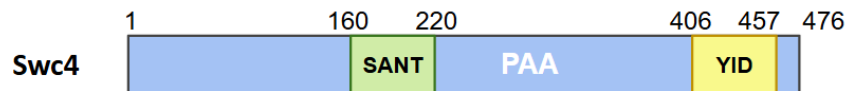
YAF9 deletsioon muudab rakud väga tundlikuks mikrotoubuleid depolümeriseerivate ainete suhtes (Le Masson *et al.*, 2003). See on kooskõlas leiuga, et Yaf9 on vajalik kromosoomide normaalseks segregatsiooniks raku jagunemisel, kuna see on häiritud *yaf9Δ* tüves (Krogan *et al.*, 2004).

Yaf9 ei ole vajalik NuA4 kompleksi terviklikkuseks, samuti mitte NuA4 histooni H4 atsetüültransferaasi aktiivsuseks, kuna *yaf9Δ* tüves ei ole raku üldine H4 atsetülatsioonitase erinev võrreldes metsiktüübiga (Le Masson *et al.*, 2003; H. Zhang *et al.*, 2004). Siiski on ChIP-qPCR analüüs (kromatiini immunosadestamine koos kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooniga) näidanud, et *yaf9Δ* tüves võrreldes metsiktüübiga on H4 atsetülatsioon telomeeride lähedal oluliselt vähenenud (H. Zhang *et al.*, 2004). Lisaks on *yaf9Δ* ja *esa1-L327S* (NuA4 katalüütiline alaühik) topeltmutant surmav, kuid kumbki mutatsioon eraldi mitte, mistõttu Yaf9 on oluline NuA4 funktsiooniks (H. Zhang *et al.*, 2004).

Samuti on histoonivariandi Htz1 kontsentratsioon *yaf9Δ* tüves telomeeride lähedastes lookustes palju madalam kui metsiktüübil, mistõttu on Yaf9 oluline ka SWR1-C vahendatud Htz1 paigutamiseks kromatiinile nendes piirkondades (H. Zhang *et al.*, 2004). YAF9 puudumisel toimub Sir2/3/4-vaigistuskompleksi levimine telomeeride lähedal asuvatesse lookustesse, mis vaigistab sealsed geenid histoonide deatsetüülimise kaudu, kuid Yaf9 olemasolu võimaldab säilitada telomeeride lähedal paiknevate geenide ekspressioonitaset nii NuA4 kui ka SWR1 kaudu, mis omakorda aitavad hoida piiri hetero- ja eukromatiini vahel (Babiarz *et al.*, 2006; Meneghini *et al.*, 2003; H. Zhang *et al.*, 2004).

1.6. Swc4 valk

Swc4 on valk-valk interaktsioone vahendav struktuurivalk, mis ei oma ensümaatilist aktiivsust. See kuulub nii NuA4 kui ka SWR1 kompleksi (Krogan *et al.*, 2003, 2004) ja on oluline nende kokkupanekuks (Zukin *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2009). Swc4 omab N-terminaalset SANT-domeeni, mis paikneb aminohappejääkide 160-220 vahemikus, ja Yaf9-ga seondumise domeeni C-terminuse aminohappejääkide 406-457 vahemikus (Joonis 7) (Jürgens *et al.*, 2026). Kuna SANT-domeenide pinnalaeng on negatiivne, suudavad need üldiselt seonduda kas histoonisabadega või muude aluseliste valkudega (Boyer *et al.*, 2004). Krüoelektronmikroskoopilise (krüo-EM) analüüsi põhjal on Swc4 tihedalt integreeritud NuA4 kompleksi keskmesse ning omab ulatuslikke kontaktpindu mitme teise alaühikuga, mis tõendab Swc4 struktuurset rolli kompleksi terviklikkuse säilitamisel. Kusjuures NuA4 kompleksis keerdub Swc4 ümber Act1-Arp4 dimeeri valguosaga, mis omab ka SANT-domeeni (Joonis 3) (Zukin *et al.*, 2022).



Joonis 7. Swc4 valgu skeem. Numbrid tähistavad aminohappepositsioone Swc4 valgus. Rohelise kastiga on märgitud SANT-domeen ja kollase kastiga Yaf9 valguga interakteerumise domeen (YID). Domeenide asukohad pärinevad allikast (Jürgens *et al.*, 2026). Valge „PAA“ tähistusega on märgitud SANT-domeenist C-terminaalsel pool paiknev polüaluseline aas, mis sisaldab palju aluselisi aminohappeid (Qu *et al.*, 2022).

Pikalt oldi arvamisel, et Swc4 valk on pärmiraku elumuseks hädavajalik (Bittner *et al.*, 2004), ning leitud, et ellujäämiseks vajalik osa Swc4-st on N-terminuse 269-aminohappeline valgulõik (Miciałkiewicz ja Chełstowska, 2008). Sellist lõiku ekspresseeriv tüvi on võrreldes metsiktüübiga tundlikum metüülmetaansulfonaadi, hüdroksüüurea ja benomüüli suhtes, samas püsib sellises mutanttüves histooni H4 üldine atsetüleerituse tase normaalsena (Miciałkiewicz ja Chełstowska, 2008). Sellest võib järeldada, et Swc4 on seotud mitmete kromatiinipõhiste protsessidega, nagu DNA reparatsioon, replikatsioon ja kromosoomide segregatsioon. Siiski näitab *yaf9Δ* tüvi väga sarnaseid fenotüüpe samades tingimustes (Le Masson *et al.*, 2003; Miciałkiewicz ja Chełstowska, 2008), mistõttu võivad seesuguse C-terminaalse deletsiooniga Swc4-ga tüve antud fenotüübid

tuleneda ka Yaf9 puudumisest NuA4 ja SWR1 kompleksidest, kuna Swc4 C-terminaalse osa kaudu seondub Yaf9 mõlemasse kompleksi (Bittner *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2010).

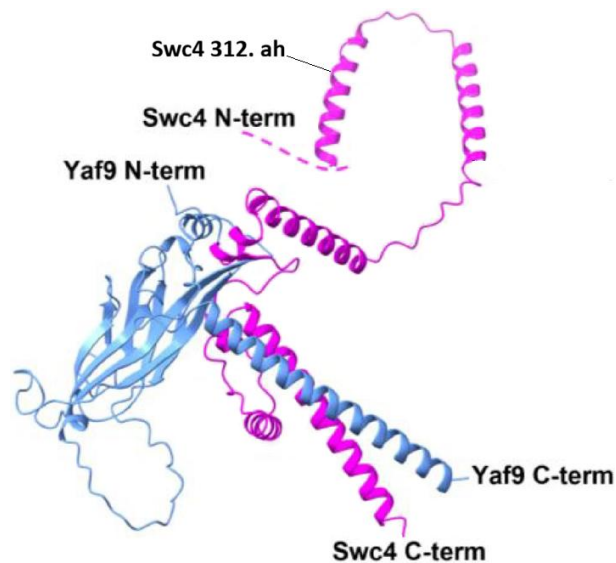
Hilisemates katsetes on selgunud, et *swc4Δ* tüve rakud siiski suudavad kasvada, kuid nende kasv on väga vaevaline. Kasvukiirus taastub, kui rakkudesse tagasi viia metsiktüüpi SWC4 geen. See on võimaldanud lähemalt uurida, milliste eluks vajalike protsessidega Swc4 valk seotud on. Näiteks ilmneb *swc4Δ* tüves kromosoomide segregatsioonihäireid, kromosomaalseid ümberkorraldusi ning aneuploidiat NuA4 ja SWR1 kompleksidest ja Yaf9 valgust sõltumatult. Lisaks on tuvastatud, et *swc4Δ* tüve rakud on palju suuremad võrreldes metsiktüüpi rakkudega ning mitmed neist on hantlikujulised või kasvavad 3-4 kupa koos viidates tsütokineesiprobleemidele. (Pan *et al.*, 2023)

Nukleosoomiga seotud NuA4 kompleksi struktuurianalüüs on näidanud, et Swc4 SANT-domeenist C-terminaalsemalt paikneva, mitmetest aluselistest aminohappejääkidest koosneva aasa (Joonis 7) tugevalt konserveerunud lüsiinijäägid K311, K314 ja K316 on eksponeeritud linker-DNA suunas. See viitab võimalikule elektrostaatilisele interaktsioonile nimetatud lüsiinijääkide ja DNA negatiivselt laetud fosfaatrühmade vahel (Qu *et al.*, 2022). Antud tähelepanek on kooskõlas ChIP-seq-analüüsi (ingl *chromatin immunoprecipitation sequencing*) tulemustega, mille kohaselt seondub Swc4 peamiselt kromatiini nukleosoomivabade piirkondadega, sealhulgas 5S rRNA-d kodeerivast järjestusest allavoolu paikneva mittetranskribeeritava alaga, tRNA-geenidega ning telomeersete piirkondadega. Sealjuures toimub Swc4 seondumine nendele aladele sõltumatult Yaf9-st, Eaf1-st ja Swr1-st. Kuna *swc4Δ* tüves on need lookused rekombinatsioonile vastuvõtlikud ja genoomselt ebastabiilsed, on tõenäoline, et üheks Swc4 funktsiooniks on nukleosoomivabade piirkondade kaitsmine kahjustuste eest (Pan *et al.*, 2023).

1.7. Yaf9 interaktsioon Swc4 valguga

Pagaripärmi kaksikhübridiüsteemi (ingl *two-hybrid system*) katsed on näidanud, et Yaf9 ja Swc4 seondumine toimub mõlema valgu C-terminaalse osa kaudu, ning Yaf9 YEATS-domeen ei ole interaktsiooniks vajalik. Sealjuures on Swc4 valgu viimased 100 aminohapet piisavad, et seonduda spetsiifiliselt täispika Yaf9-ga ning Yaf9 valgu viimased 44 aminohapet piisavad, et

seonduda iseseisvalt täispika Swc4-ga. Lisaks on tõestanud nii *in vitro* interaktsioonikatsed kui ka *in vivo* koimmunopretsipitatsioonikatsed, et Yaf9 ja Swc4 interaktsioon on otsene (Bittner *et al.*, 2004). Hiljem on täpsustatud, et Swc4 valgu Yaf9-ga seondumise domeen on selle C-terminaalsetel aminoahapetel 406-457 (Zhou *et al.*, 2010). AlphaFold programmiga modelleeritud struktuurilt on näha, et Yaf9 ja Swc4 C-terminaalsed domeenid moodustavad seondumisel lõim-põim struktuuri (Joonis 8) (Jürgens *et al.*, 2026; Zukin *et al.*, 2022). Lõim-põim struktuurid tekivad kahe või enama α -heeliksi keerdumisel ümber üksteise ja valkude lõim-põim domeenid on üldiselt tuntud valk-valk interaktsioonide vahendajatena (Truebestein ja Leonard, 2016), mis toetab asjaolu, et Yaf9 lõim-põim domeen seondub Swc4 C-terminusega. Kuna käesolevas uurimistöös on kasutatud alates 312. aminohappejärgist deleteeritud C-terminusega Swc4 tüve, on Joonisel 8 märgitud Swc4 312. aminohappejäägi paiknemine.



Joonis 8. AlphaFold 3 ennustatud struktuur Yaf9 ja Swc4 interaktsioonist. Joonisel on näidatud Yaf9 ja Swc4 N- ja C-terminused ning Swc4 312. aminohappejääk. Punktiiriga on tähistatud Swc4 N-terminaalse osa jätkumine. Modifitseeritud joonis allikast (Jürgens *et al.*, 2026).

1.8. *Saccharomyces cerevisiae* kui mudelorganism

S. cerevisiae ehk pagaripärm on üherakuline eukarüootne organism, mis on levinud geeni- ja valgu-uuringute mudel. Väheste nõudlikkuse tõttu saab pärmirakke lihtsalt ja kiiresti kasvatada agariga söötmetassidel ning mugavalt säilitada glütseroolis külmutatuna -80°C juures aastaid. (Duina *et al.*, 2014)

Üheks põhjuseks, miks pärm on hea geneetiliste uuringute mudel, on asjaolu, et pärmi ja kõrgemate eukarüootide valkude aminohappelised järjestused ja funktsioonid on omavahel tugevalt konserveerunud. Seda kinnitab ka asjaolu, et ligi pooled pärmi essentiaalsetest geenidest on võimalik asendada inimese homologiga (Vanderwaeren *et al.*, 2022). Samuti on pärmirakkudesse transformatsiooni teel lihtne sisestada plasmiide ja lineaarseid geenijärjestusi, mis saavad tänu pärmi efektiivsele homologilisele rekombinatsioonile integreeruda genoomi. Koos mitmete biotehnoloogiliste meetoditega võimaldab see uurida nii geenide põhjustatud fenotüüpe kui ka nende funktsioone. Lisaks on pagaripärmi genoom põhjalikult annoteeritud avalikus pärmigenoomi andmebaasis *Saccharomyces Genome Database* (SGD), mis võimaldab teadlastel ligipääsu suurele hulgale pagaripärmiga seotud informatsioonile (Duina *et al.*, 2014).

1.8.1. Pagaripärmi ploidsus ja paardumistüübid

Pagaripärm, mis paljuneb mitoosi teel pungudes, saab eksisteerida nii haploidsena (16 kromosoomiga) kui ka diploidsena. Haploidne pärmirakk saab olla kas paardumistüübist a (määratud MAT a alleeliga) või paardumistüübist α (määratud MAT α alleeliga). Kahe erineva paardumistüübiga haploidse raku ristumisel tekib diploid, mis omab mõlemat, nii MAT a kui ka MAT α , alleeli. Diploidne rakk aga ristuda ei saa. Selle asemel saab diploid toitainete vaestes tingimustes läbida meioosi, mille tulemusel tekib neli haploidset spoori, millest kaks omavad MAT a ja kaks MAT α alleeli. (Duina *et al.*, 2014)

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Elusorganismi optimaalseks geeniekspressiooniks on vajalik transkriptsiooni korrektne regulatsioon, mis toimub suuresti kromatiinstruktuuri reorganiseerimise kaudu. Kromatiinistruktuuri reguleeritakse paljude valkkomplekside koostoime tulemusena. Käesolevas töös uuritakse pagaripärmi NuA4 histooni atsetüültransferaasi kompleksi ja SWR1 histoonivariandi väljavahetamise kompleksi koostoime mehhanismi nende võimaliku interakteerumise kaudu, mida varasemad teadusuuringud tuvastanud ei ole. Siiski on alust seda eeldada mitmel põhjusel. Näiteks on inimese TIP60 kompleksi keskne valk p400 pärmi Eaf1 (NuA4 kompleksist) ja Swr1 (SWR1 kompleksist) valkude ühinemise tulemus (Auger *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2024). Pärmis *C. albicans* interakteerub SWR1 kompleksi koosseisu kuuluv Yaf9 YEATS-domeen NuA4 kompleksi koosseisus oleva Eaf1 valgu K173ac modifikatsiooniga (X. Wang *et al.*, 2018). Antud töös uuritakse Yaf9 rolli pagaripärmi NuA4 ja SWR1 komplekside seondumisel. Seejuures seondub Yaf9 mõlemasse kompleksi interaktsiooni vahendusel Swc4 valgu C-terminaalse domeeniga. Käesoleva uurimuse eesmärk on teha kindlaks, kas Yaf9 valgud seonduvad omavahel ka siis, kui need ei ole liitunud antud kompleksidesse, misjuhuil võib Yaf9 kompleksidega seondumise funktsiooniks olla komplekside üksteisele lähemale toomine läbi omavahelise seondumise. Samuti küsiti, kas Yaf9 valgul võiks olla NuA4 ja SWR1 kompleksidest muid eraldiseisvaid funktsioone.

Töö alaeesmärgid:

- Konstrueerida kaks pärmitüve, mis ekspresseerivad kahe erineva afiinsusmärgisega Yaf9 valke, kuid millest üks ekspresseerib täispikka Swc4 valku ja teine C-terminaalse deletsiooniga Swc4 valku. Viia konstrueeritud tüvedega läbi koimmunosadestamise katse Yaf9 valkude homodimeriseerumise testimiseks.
- Konstrueerida tüvi, mis ekspresseerib täispikka ja C-terminaalse deletsiooniga Yaf9 valku, mis on erinevate afiinsusmärgistega. Viia konstrueeritud pärmitüvega läbi koimmunosadestamise katse täispikka ja C-terminaalse deletsiooniga Yaf9 valkude homodimeriseerumise testimiseks.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud tüved

Töös kasutatud pärmitüved on valmistatud tüve W303 põhjal (Thomas ja Rothstein, 1989). Kõigi töös kasutatud ja töö käigus valminud pärmitüvede genotüübid ja päritolu on kirjas Tabelis 1. Kõiki pärmitüvesid kasvatati 30°C juures.

Tüved AKY2857 ja AKY2859 (mõlemas on 3xFLAG-Yaf9 ja Yaf9-3x3F12, esimeses ka Swc4-3x1E2, teises *swc4Δ312*-3x1E2) saadi kahekordse ristamise abil. Esmalt ristati tüvi AKY2818 (MATa) tüvega AKY2067 (MATα), ning saadi uus tüvi AKY2851 (MATα). Järgnevalt ristati tüvi AKY2851 (MATα) tüvega AKY2732 (MATa), mille tulemusel saadi tüvi AKY2857. Eraldi ristati tüvi AKY2851 (MATα) tüvega AKY2735 (MATa), mille tulemusel saadi tüvi AKY2859. Kontrolltüvena koimmunopretsipitatsioonikatses (Joonised 11 ja 12) kasutati tüve AKY2834.

Uurimaks Yaf9 C-terminaalse domeeni olulisust kahe Yaf9 valgu seondumisel transformeeriti tüve AKY2830 (sisaldab FLAG-Yaf9Δ186 ja endogeenset ilma märgiseta Yaf9 valku) polümeraasi ahelreaktsiooni (ingl *polymerase chain reaction* — PCR) meetodil plasmiidilt amplifitseeritud 3x1E2-epitoopti ja KanMX markergeeni järjestust sisaldava DNA-fragmendiga. Transformatsioonil saadud koloonia nr 3 rakud säilitati edasiseks kasutamiseks –80°C juures uue tüvenimega AKY2912.

2.2.2. Kasutatud söötmed

Rikassöötmena kasutati pärm-peptoon-dekstroosi (ingl *yeast extract, peptone, dextrose* — YPD) tard- ja vedelsöötmeid. YPD-vedelsöötmetes rakkude kasvatamiseks kasutati loksutit (*New Brunswick Scientific Excella E25 Incubator Shaker Series*) kiirusel 200 pööret minutis (rpm). Kasutatud söötmed ja nende koostised on toodud Tabelis 2.

2.2.3. Pärmitüvede ristamine

Kahe Yaf9 seondumise uurimiseks Swc4-ga seondumise olemasolul ja selle puudumisel konstrueeriti ristamise teel tüved AKY2857 ja AKY2859. Selleks ristati esmalt tüvi AKY2818 tüvega AKY2067 YPD-tardsöötmel. Ristamistass tembeldati +HGB (200 µg/ml) ja +NAT (100 µg/ml) selektiivtassile. Diploidsed rakud kanti lahjenduskülviga toitainevaesele

Tabel 1. Kasutatud pärimüvede genotüüp ja päritolu.

Tüvi	Genotüüp	Päritolu
W303	<i>S. cerevisiae</i> , MAT A, <i>ura3 leu2-3, 112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100 lys2Δ</i>	(Thomas ja Rothstein, 1989)
AKY2067	W303, MAT α, <i>swr1Δ::NAT</i>	Kadri Peil
AKY2732	W303, MAT A, <i>Swc4-3x1E2::KanMX</i>	Signe Värvi
AKY2735	W303, MAT A, <i>Swc4-Δ312-476-3x1E2::KanMX</i>	Signe Värvi
AKY2818	W303, MAT A, <i>pBSAde2-3xFLAG-Yaf9::ADE2, Yaf9-3x3F12::HygrR</i>	Henel Jürgens
AKY2830	W303, MAT A, <i>pBSAde2-3xFLAG-Yaf9-Δ186-226::ADE2</i>	Henel Jürgens
AKY2834	W303, MAT A, <i>Yaf9-3x3F12::HygrR</i>	Henel Jürgens
AKY2851	W303, MAT α, <i>pBSAde2-3xFLAG-Yaf9::ADE2, Yaf9-3x3F12::HygrR</i>	Käesolev töö
AKY2857	W303, MAT A, <i>Swc4-3x1E2::KanMX, pBSAde2-3xFLAG-Yaf9::ADE2, Yaf9-3x3F12::HygrR</i>	Käesolev töö
AKY2859	W303, MAT A, <i>Swc4-Δ312-476-3x1E2::KanMX, pBSAde2-3xFLAG-Yaf9::ADE2, Yaf9-3x3F12::HygrR</i>	Käesolev töö
AKY2912	W303, MAT A, <i>pBSAde2-3xFLAG-Yaf9-Δ186-226::ADE2, Yaf9-3x1E2::KanMX</i>	Käesolev töö

Tabel 2. Kasutatud söötmete koostised

Sööde	Koostisosad
YPD-tardsööde	Agar 20 g/l; pärmiekstrakt 10 g/l; mükoloogiline peptoon 20g/l; glükoos 20 g/l; vesi.
YPD-vedelsööde	Pärmiekstrakt 10 g/l; mükoloogiline peptoon 20 g/l; glükoos20 g/l; vesi.
Sporulatsioonisööde	Glükoos 0,5 g/l, pärmiekstrakt 1 g/l, kaaliumatsetaat 10 g/l, agar 20 g/l, adeniin 10 µg/ml, uratsiil 10 µg/ml, histidiin 10 µg/ml, trüptofaan 10 µg/ml, leutsiin 20 µg/ml, lüsiin 20 µg/ml.
+NAT tardsööde	<i>Nourseothricin</i> 100 µg/ml, agar 20 g/l; pärmiekstrakt 10 g/l; mükoloogiline peptoon 20 g/l; glükoos 20 g/l; vesi.
+HGB tardsööde	Hügromütsiin-B 200 µg/ml, agar 20 g/l; pärmiekstrakt 10 g/l; mükoloogiline peptoon 20 g/l; glükoos 20 g/l; vesi.
+G-418 tardsööde	<i>Geneticin</i> 100 µg/ml, agar 20 g/l; pärmiekstrakt 10 g/l; mükoloogiline peptoon 20 g/l; glükoos 20 g/l; vesi.
-ADE tardsööde	Agar 20 g/l; pärmiekstrakt 10 g/l; glükoos 20 g/l; lüsiin 0,08 g/l; leutsiin 0,08 g/l; trüptofaan 0,08 g/l; histidiin 0,08 g/l; uratsiil 0,2 g/l; vesi.

sporulatsioonitassile, rakkudest tekkisid meioosi teel neli spoori. Pärast 6-päevast 30°C juures inkubeerimist eraldati sporulatsioonitassil moodustunud tetraadid mikroskoobi (*Singer Instruments MSM 400*) all, kandes individuaalsed spoorid laiali YPD-söötmega tassile. Spoorid tembeldati järgmistele selektiivtassidele: +HGB ja +NAT ja -ADE. Uus tüvi AKY2851 saadi spoorikolooniast, mis kasvas (+HGB)-söötmel (Yaf9-3x3F12 selektiivmarker) ja (-ADE)-söötmel (FLAG-Yaf9 selektiivmarker), kuid mitte (+NAT)-söötmel (*swr1Δ* selektiivmarker).

Järgmisena ristati tüvi AKY2851 tüvedega AKY2732 ja AKY2735 YPD-tardsöötmele. Ristamistass tembeldatai +HGB (200 µg/ml) ja +G-418 (100 µg/ml) sisaldavale selektiivtassile. Mõlema ristamise tulemusena saadud diploididest tehti lahjenduskülv sporulatsioonitassile. Pärast 4-päevast 30°C juures inkubeerimist eraldati sporulatsioonitassidel moodustunud tetraadid mikroskoobi (*Singer Instruments MSM 400*) all, kandes individuaalsed spoorid laiali YPD-söötmele tassile. YPD-söötmele tembeldatai spoorid selektiivtassidele: +HGB, +G-418 ja -ADE. Tüvi AKY2857 saadi AKY2851 ja AKY2732 ristamisel ja tüvi AKY2859 saadi AKY2851 ja AKY2735 ristamisel spoorikolooniatest, mis kasvasid nii (+HGB)-söötmele (Yaf9-3x3F12), (+G-418)-söötmele (AKY2857 puhul Swc4-3x1E2 ja AKY2859 puhul swc4Δ312-3x1E2) kui ka (-ADE)-söötmele (FLAG-Yaf9).

2.2.4. Western blot valkude ekspressiooni kontrollimiseks

Rakulüsaatide valmistamine

Rakulüsaatide valmistamiseks kasvatati rakke üleöö (ca 16 h) 15 ml-s YPD-vedelsöötmes ja tsentrifuugiti (*Eppendorf Centrifuge 5415R*; 1 min; 5000 rpm; 4°C). Rakusadet pesti 1 ml jääkülma Milli-Q veega ja suspendeeriti 1 ml-s jääkülmas 2 M LiOAc lahuses. Rakususpensiooni inkubeeriti 5 minutit jääl, rakud tsentrifuugiti (1 min; 5000 rpm; 4°C). Rakusade suspendeeriti 1 ml-s jääkülmas 0,4 M NaOH lahuses ja inkubeeriti jääl 5 minutit. Tsentrifugiti (1 min; 5000 rpm; 4°C) ning eemaldati supernatant. Valkude denatureerimiseks suspendeeriti rakke 100 µl-s 2xSDS-puhvris (4% SDS; 20% glütserool; 0,01% bromofenool sinine; 100 mM Tris pH 6,8; 100 mM β-merkaptoetanool) ja sonikeeriti 30 sekundit [*Diagenode Bioruptor*; sonikeerimistugevus H (*high*)]. Proove inkubeeriti 5 minutit 95°C juures, segati vortex-segajal 10 sekundit maksimumtugevusel ja tsentrifuugiti (*Eppendorf Centrifuge 5415R*; 5 min; maksimaalsed pöörded). 100 µl supernatanti kummastki proovist pipeteeriti uutesse 1,5 ml-sse katsutitesse. Proovid säilitati -20°C juures.

Western blot

Rakulüsaadiproovidest valkude lahutamiseks molekulmassi järgi geelelektroforeesil valmistati 12% SDS-polüakrüülamiidgeel (Sambrook *et al.*, 1989, lk 18.52). Geelile kanti 10-15 µl proove. Valgud lahutati geelelektroforeesil 1xSDS-jooksupuhvris (0.1% SDS; 25 mM Tris-HCl pH 6,8; 192

mM glütsiin). Valgud kanti akrüülamiidgeelist üle PVDF (*polyvinylidene difluoride*) -membraanile (*Thermo Scientific PVDF Transfer Membrane*; 0,2 µm) poolmärja ülekande masinas (*BIO-RAD Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*) pingel 15 V 90 minutit. PVDF-membraan blokeeriti 5% lõssilahusega [lõssipulber (*CARL ROTH Skimmed milk powder*); 1xPBS (*Phosphate-Buffered Saline*); 0,05% Tween20].

Kasutati primaarseid antikehasid: Yaf9-3x3F12 puhul 5E11-antikeha [*Icosagen Mouse mAb to BPV type 1 E2-protein (clone 5E11)*, lahjendus 1:5000, algkontsentratsioon 1 mg/ml]; FLAG-Yaf9 ja FLAG-yaf9Δ186 puhul FLAG-antikeha (*Merck ANTI-FLAG M2 antibody, Mouse monoclonal*, lahjendus 1:5000, algkontsentratsioon 1 mg/ml); Swc4-3x1E2, swc4Δ312-3x1E2 ja Yaf9-3x1E2 puhul 1E2-antikeha [*Icosagen Mouse mAb to BPV type 1 E2 protein (clone 1E2)*, algkontsentratsioon 1 mg/ml]. Kusjuures Swc4-3x1E2 ja swc4Δ312-3x1E2 puhul oli antikeha lahjendus 1:10 000, kuid Yaf9-3x1E2 puhul oli antikeha lahjendus 1:5000.

Valgud visualiseeriti sekundaarse antikehaga [*Invitrogen Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP*, lahjendus 1:20 000, algkontsentratsioon 1 mg/ml]. Membraane pesti 1x PBS; 0,05% Tween20 lahusega. Keemilise luminescentsireaktsioon käivitati *MILLIPORE Immobilon Western* reagentidega (*HRP Substrate Luminol* ja *HRP Substrate Peroxide*, suhtes 1:1). Signaali detekteerimiseks kasutati *BIO-RAD ChemiDoc XRS+ System* masinat ja *Image Lab* tarkvara.

2.2.5. Koimmunopretsipitatsioon

Koimmunopretsipitatsiooni meetodit kasutati nii kahe Yaf9 seondumise uurimiseks Swc4-ga seondumise olemasolul ja selle puudumisel (tüved AKY2857, AKY2859, AKY2834) kui ka täispika ja C-terminaalse deletsiooniga Yaf9 valkude homodimeriseerumise uurimiseks (tüved AKY2830, kolooniad 1, 3 — AKY2912, 4).

Lähteproovide valmistamine

Pärmirakke kasvatati 50 ml-s YPD-vedelsöötmes üleöö (ca 15 h), tsentrifuugiti (5 min; 2500 rcf; toatemperatuuril). Rakusadet pesti 35 ml Milli-Q veega. Edasised etapid toimusid jääl või 4°C juures. Rakusade suspendeeriti 900 µl-s lüüsipuhvris (50 mM HEPES puhver pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 10% glütserool; 0,5 mM DTT; 1x proteaasi inhibiitorite kokteil), mis jagati kahte turvakorgiga 1,5 ml-sse katsutisse. Proovidele lisati klaaskuulid ning

asetati väristajale 4°C juurde 15 minutiks. Katsutite põhja tehti naaskliga auk, auguga katsutid pandi suurematesse 2 ml-sse katsutitesse ja tsentrifuugiti (*Eppendorf Centrifuge* 5415R, 2000 rpm; 30 sek). Klaaskuulidest puhastatud lüsaadid tõsteti kahest katsutist kokku ühte 1,5 ml-sse katsutisse (iga proovi puhul). Tsentrifuugiti 5 minutit maksimaalsete pöörete juures, supernatandid pandi uutesse katsutitesse, millest 50 µl eraldati *western blot*'i (WB) katseteks („INPUT” ehk lähteproovid), ülejäänud jäeti koimmunopretsipitatsiooni (IP) proovide tegemiseks.

Koimmunopretsipitatsiooni proovide valmistamine ja immunodetektsioon

FLAG-antikehaga (FLAG-epitooop) sadestamiseks kasutati antikehaga konjugeeritud agarooskerakesi (*ANTI-FLAG M2 Affinity Agarose Gel*), mida võeti 30 µl proovi kohta (kasutati kogu valmistatud rakulüsaat). 5E11-antikehaga (3x3F12-epitooop) ja 1E2-antikehaga (3x1E2-epitooop) sadestamine viidi läbi kahes etapis: lüsaati inkubeeriti 2 µl antikehaga 2 h, seejärel lisati proovile 50 µl *protein-A*-ga seotud agarooskerakesi (*rProtein A Sepharose Fast Flow, Cytiva*).

Proovid tsentrifuugiti (1 min; 5000 rpm) ja eemaldati supernatant. Kerakesi pesti pesulahusega 1 (50 mM HEPES puhver (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 5% glütserool; 0,5 mM DTT) kolm korda ja neljas kord pesulahusega 2 (50 mM HEPES puhver (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5% glütserool). Kerakesed tsentrifuugiti (1 min; 5000 rpm), supernatant eemaldati. INPUT- ja IP-proovidele lisati 2xSDS-puhvrit (suhtes 1:1), proovid inkubeeriti (5 min; 95°C). Proovid segati *vortex*-segajal maksimumtugevusel (10 sek). IP-proovide kerakesed tsentrifuugiti (1 min, 5000 rpm), supernatant eraldati geelelektroforeesiks.

INPUT- ja IP-proovide valgud lahutati 12% SDS-polüakrüülamiidgeelil, kanti poolmärja ülekandemeetodiga PVDF-membraanile ja visualiseeriti primaarsete antikehadega: FLAG-, 5E11- ja 1E2-antikehad.

2.2.6. 1E2-epitoobi lisamine YAF9 geenile

Yaf9 C-terminaalse domeeni rolli uurimiseks kahe Yaf9 seondumisel konstrueeriti uus pärmitüvi. Kasutades olemasolevat tüve, milles ekspresseeritakse ektoopiliselt (alates 189. ah) deleteeritud C-terminusega Yaf9 valku (AKY2830), lisati selle endogeense Yaf9 C-terminaalsesse otsa 3x1E2-afiinsusmärgis. (Skeemid Joonistel 13 ja 15)

PCR plasmiidilt

3x1E2-epitoobi lisamiseks amplifitseeriti pBluescript-3x1E2-KanMX plasmiidilt PCR-meetodil DNA-fragment, mis sisaldas homoloogset ala YAF9 C-terminusega, 3x1E2-epitoojärjestust, FBA1 terminaatorjärjestust, KanMX markergeenijärjestust ja YAF9 50 aluspaari (ap) terminaatorjärjestusest. PCR-i jaoks kasutati praimereid Yaf9_tag_F ja Yaf9_tag_R. Praimerite järjestused on toodud Lisas 1, Tabelis 1.

50 µl PCR-reaktsioonisegu komponendid koos lõppkontsentratsioonidega olid: 29,25 µl Milli-Q vett; 5 µl dNTP (200 µM); 1,5 µl DMSO (dimetüülsulfoksiid) (3%); 0,5 µl MgCl₂ (0,5 mM); 2,5 µl praimereid (10 µM); 1 µl plasmiidilahust (0,2 ng/µl); 10 µl puhvrit (5x *Thermo Scientific Phusion Green HF Buffer*); 0,25 µl DNA-polümeraasi (0,01 U/µl *Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*). PCR-programm (*SimpliAmp Thermal Cycler*) oli järgmine: algne denaturatsioon 40 sek, 98°C; 32 tsüklit järgmisi etappe (denaturatsioon 20 sek, 98°C; praimerite seondumine 30 sek, 55°C; praimerite ekstentsioon 1 min, 72°C); järelsüntees 5 min, 72°C.

Agaroos-geelelektroforees

DNA-fragmentide sünteesi kontrolliti 1% agaroos-geelelektroforeesil 1xTAE (pH 8; 40 mM Tris; 20 mM atsetaat; 1 mM EDTA) puhvris, 0,5 µg/ml EtBr juuresolekul.

Transformatsioon

Transformatsiooniks kasutatav PCR-produkt sadestati. Selleks lisati 1,5 ml katsutis 45 µl PCR-produktile 200 µl 96% etanooli ja 20 µl 3 M naatriumatsetaati ning inkubeeriti 15 minutit –20°C juures. Proov tsentrifuugiti (*Eppendorf Centrifuge 5415R*; 15 min; maksimumpöörded), supernatant eemaldati. Sadet pesti 400 µl 70% etanooliga. Proov tsentrifuugiti (15 min; maksimumpöörded), supernatant eemaldati. DNA-sademel lasti katsutis ilma korgita toatemperatuuril kuivada. Kuivanud DNA suspendeeriti 20 µl-s TE (10 mM TrisHCl, pH 7.5; 10 mM EDTA) puhvris.

AKY2030 rakke kasvatati üleöö (ca 17 h) 25 ml-s YPD-vedelsöötmes. Pärmirakud tsentrifuugiti (*Sigma 4K15C*; 3 min; 5000 rpm). Rakusade suspendeeriti 500 µl-s LiOAc+TE-puhvris (0,1 M LiOAc; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA). Rakud tsentrifuugiti (3 min; 5000 rpm), supernatant eemaldati. Rakusade suspendeeriti 40 µl-s LiOAc+TE-puhvris, millele lisati 5 µl

kandja-DNA-d (10 mg/ml), mis oli eelnevalt 6 minutit 95°C juures denatureeritud ja kiirelt jääl jahutatud. Saadi kompetentsed pärmirakud, millest 50 µl lisati transformatsioonisegusse. Segusse lisati ka 10 µl transformeeritavat DNA-fragmenti. Transformatsioonisegu inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Proovile lisati 300 µl LiOAc+PEG4000 lahust (0,1 M LiOAc; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 40% PEG4000), proov segati *vortex*-segajal ning inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril. Proovile lisati 30 µl DMSO-d ja segati *vortex*'il. Transformatsiooni toimumiseks tehti rakkudele kuumašokk inkubeerides 10 minutit 42°C juures, seejärel tõsteti rakud 1 minutiks jääle. Rakud tsentrifuugiti (3 min; 3000 rpm), supernatant eemaldati. Rakusade suspendeeriti 150 µl Milli-Q vees ning plaaditi YPD-tassile, millel kasvanud rakud tembeldati antibiootikumi +G-418 selektiivtassile selekteerimaks välja rakud, millesse transformeerus edukalt 3x1E2-epitoobi ja KanMX markergeeni järjestusega DNA-fragment.

PCR kolooniate genoomselt DNA-lt

PCR-i tegemiseks eraldati +G-418 selektiivtassil kasvanud neljast väljavalitud kolooniast genoomne DNA. Igast kolooniast saadud rakud suspendeeriti 100 µl-s lüüsilahuses (200 mM LiOAc; 1% SDS). Suspensiooni inkubeeriti 5 minutit 70°C juures. Proovile lisati 300 µl 96% etanooli ja segati *vorteks*'il. DNA ja rakumaterjal sadestati tsentrifuugimides (3 min; 15 000 rcf). Supernatant eemaldati ja sadet pesti 70% etanooliga. Pestud sade suspendeeriti 100 µl-s TE-puhvris. Rakumaterjal tsentrifuugiti (3 min; 15 000 rcf). Saadud DNA-d sisaldavat supernatanti (1µl) kasutati PCR-i tegemiseks. (Lööke *et al.*, 2011)

Igast kolooniast eraldatud DNA-lt tehti PCR YAF9 C-terminaalse piirkonna ja 3x1E2-epitoojärjestuse amplifitseerimiseks. PCR-i tegemiseks kasutati praimereid Yaf9-tag-ctrl ja FBA1_ctrl_2. Praimerite järjestused on toodud Lisas 1, Tabelis 1.

10 µl PCR-reaktsioonilahuste komponendid koos lõppkontsentratsioonidega olid: 6,5 µl Milli-Q vett; 2 µl PCR-puhvrit [5x *Solis BioDyne FIREPol Master Mix Ready to Load (Taq polymerase FIREPol, MgCl₂, dNTP)*]; 1 µl genoomset DNA-d; 0,5 µl praimereid (10 µM). PCR-programm (*SimpliAmp Thermal Cycler*) oli järgnev: algne denaturatsioon 3 min, 96°C; 33 tsüklit järgmisi etappe (denaturatsioon 15 sek, 96°C; praimerite seondumine 20 sek, 57°C; praimerite ekstentsioon 30 sek, 72°C); järelsüntees 5 min, 72°C.

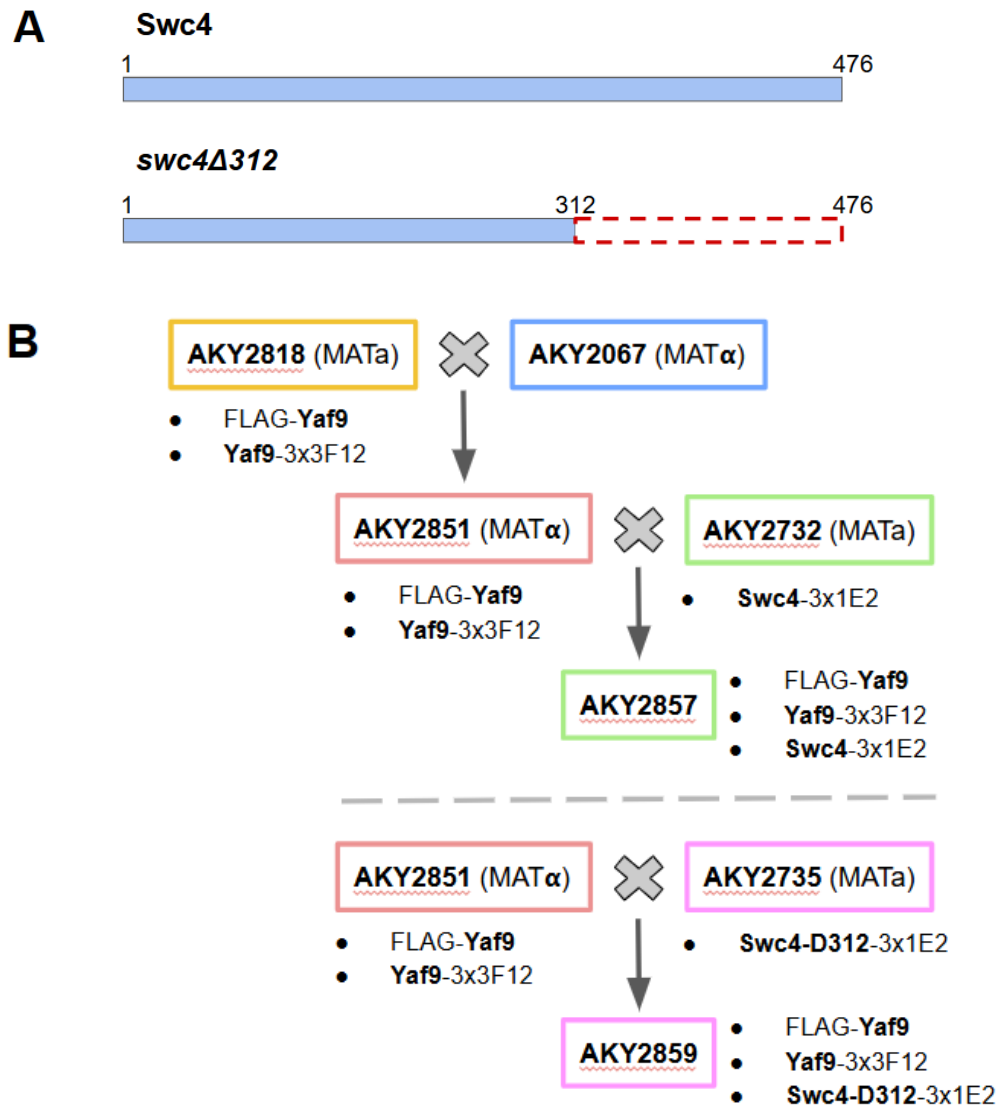
2.3. TULEMUSED

2.3.1. Metsiktüüpi ja mutantset Swc4 valku ning erinevate afiinsusmärgistega Yaf9 valke ekspresseerivate pärmitüvede konstrueerimine

Yaf9 valk inkorporeeritakse NuA4 ja SWR1 kompleksidesse läbi interaktsiooni Swc4 valguga, mis on osa mõlemast kompleksist (Kobor *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2010). Yaf9 C-terminus interakteerub Swc4 C-terminaalse osaga (Bittner *et al.*, 2004). Töörühma varasematest katsetest on teada, et kaks Yaf9 valku koimmuunosadestuvad (avaldamata andmed). Käesoleva töö üheks eesmärgiks oli uurida, kas kahe Yaf9 valgu seondumine on otsene või vahendatud läbi seondumise Swc4 valguga. Selleks, et uurida kahe Yaf9 seondumist juhul, kui Swc4 saab seonduda Yaf9-ga, ning juhul, kui Swc4 ei saa seonduda Yaf9-ga, konstrueeriti kaks pärmitüve: tüvi (AKY2857), mis ekspresseerib täispikka Swc4 (3x1E2-epitoobiga) ja kahe erineva afiinsusmärgisega Yaf9 valku (3xFLAG- ja 3x3F12-epitoobiga), ning tüvi (AKY2859), mis ekspresseerib C-terminaalse deletsiooniga (alates 312. ah) Swc4 (3x1E2-epitoobiga) ja kahe erineva afiinsusmärgisega Yaf9 valku (3xFLAG- ja 3x3F12-epitoobiga).

Antud kahe tüve saamiseks oli vaja ristata varasemalt töögrupi poolt konstrueeritud pärmitüvesid: kahe erineva epitoobiga (3xFLAG- ja 3x3F12-epitoobid) Yaf9 valkudega tüvi (AKY2818; MATa) oli vaja ristata esmalt täispikka Swc4 (3x1E2-epitoop) ekspresseeriva tüvega (Joonis 9A) (AKY2732; MATa) ning eraldi C-terminaalse deletsiooniga (alates 312. ah) Swc4 (3x1E2-epitoop) ekspresseeriva tüvega (Joonis 9A) (AKY2735; MATa). Kuna kõik olemasolevad tüved olid samast paardumistüübist (MATa) oli vaja tüve AKY2818 paardumistüüpi vahetada. Selleks teostati tüve AKY2818 (MATa) ristamine tüvega AKY2067 (MAT α), ning diploidide sporulatsiooni ja spooritetraadide analüüsi kaudu saadi uus tüvi (AKY2851; MAT α), mis ekspresseerib samuti 3xFLAG- ja 3x3F12-epitoopidega Yaf9 valke nagu AKY2818, kuid on MAT α paardumistüübist. Järgnevalt ristati saadud tüvi AKY2851 (MAT α) tüvega AKY2732 (MATa) ning diploidide sporulatsiooni ja tetraadide analüüsi teel saadi uus tüvi (AKY2857), mis ekspresseerib 3xFLAG- ja 3x3F12-epitoopidega Yaf9 valke ning 3x1E2-epitoobiga täispikka Swc4. Eraldi ristati tüve AKY2851 (MAT α) tüvega AKY2735 (MATa) ning diploidide sporulatsiooni ja tetraadide analüüsi teel saadi uus tüvi (AKY2859), mis ekspresseerib 3xFLAG- ja 3x3F12-epitoopidega Yaf9

valke ning 3x1E2-epitoobiga C-terminaalse deletsiooniga Swc4. Ristamisskeem on toodud Joonisel 9B.



Joonis 9. Täispika ja C-terminaalse deletsiooniga Swc4 valgu skeem ning ristamisskeem. (A) Swc4 täispika (AKY2857) ja C-terminaalse deletsiooniga (alates 132. ah; AKY2859) valkude skeemid. Punane katkendjoon tähistab deleteeritud osa. (B) Ristamisskeem. Näidatud on tüvede nimed ja ristatud tüvede paardumistüübid. Samuti on toodud katse seisukohast relevantseid tüves ekspresseeritavad afiinsusmärgistega valgud tüvenime all või kõrval. Tüvede kergeks eristamiseks on tüved ümbritsetud erinevat värvi kastidega. Hall rist kahe tüve vahel tähistab nende ristamist ja nool viitab kahe tüve ristamisel saadud uue tüve poole.

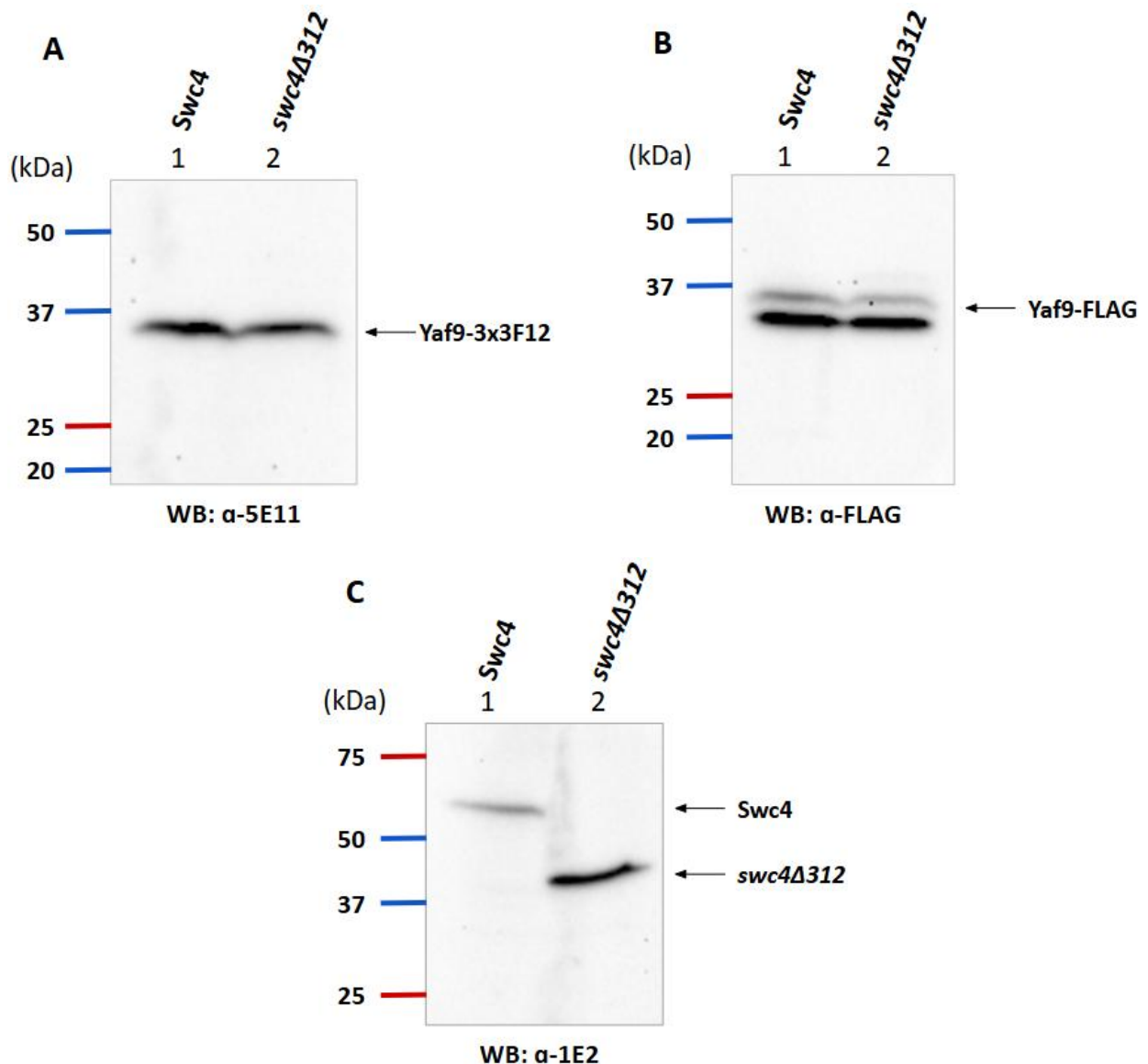
2.3.2 Yaf9 ja Swc4 valgud ekspresseeruvad mõlemas ristamise tulemusena saadud tüves

Mõlema saadud pärmitüve puhul — nii täispikka Swc4 ekspresseerival (AKY2857) kui ka C-terminaalse deletsiooniga (alates 312. ah) Swc4 ekspresseerival (AKY2859) tüvel — kontrolliti nii endogeense YAF9 geeni (3x3F12-epitoot) kui ka lisakoopia genoomi sisestatud YAF9 geeni (FLAG-epitoot) ekspressiooni immunodetektsiooni (*western blot*) meetodi abil. Samuti kontrolliti nendes tüvedes immunodetektsiooni meetodil täispikka Swc4 ekspressiooni (tüves AKY2857) kui ka *swc4Δ312* ekspressiooni (tüves AKY2859).

Teadadolevalt on *S. cerevisiae* Yaf9 valk 226 aminohapet pikk ning arvutusliku molekulmassiga 25,97 kilodaltonit (kDa) (The *Saccharomyces* Genome Database, *n.d*). 3x3F12-epitootiga Yaf9 valgusignaal detekteeriti 25 kDa ja 37 kDa suurusmarkerite vahel (Joonis 10A). Kusjuures 3x3F12-epitoot on arvutusliku molekulmassiga 10,50 kDa. FLAG-epitootiga Yaf9 ekspresseerus samuti mõlemas tüves (FLAG-epitoot on arvutusliku molekulmassiga 8,55 kDa), kuid mõlemal juhul oli visualiseerimisel näha kahe erineva suurusega produkti, kusjuures mõlemad produktid detekteeriti 25 kDa ja 37 kDa suurusmarkerite vahel (Joonis 10B). Suurem produkt, mida oli tekkinud vähem, oli umbes sama suur kui 3x3F12-epitootiga Yaf9 produkt (Joonis 10A), ning väiksem produkt, mida oli tekkinud mõlemas tüves rohkem, oli umbes paari kDa võrra väiksem (Joonis 10B). Tegemist võib olla Yaf9 posttranslatsiooniliste modifikatsioonidega, samuti on töögrupi varasemates katsetes tekkinud mitu eri suurusega produkti FLAG-epitooti abil valgu visualiseerimisel. Arvestades, et mõlemad immunodetektsioonikatsed näitasid Yaf9 molekulmassi koos sellele lisatud epitootiga, on visualiseeritud produktide suurused eeldatavad.

S. cerevisiae Swc4 valk on 476 aminohapet pikk ning arvutusliku molekulmassiga 55,23 kDa (The *Saccharomyces* Genome Database, *n.d*). Täispikka SWC4 geeni sisaldas tüves ekspresseerus täispikk Swc4 valk (1E2-epitoot), mille signaal detekteeriti 50 kDa ja 75 kDa suurusmarkerite vahel (Joonis 10C). Kusjuures 1E2-epitoot on arvutusliku molekulmassiga 11,00 kDa. *swc4Δ312* valgu arvutuslik molekulmass ProtParam programmi põhjal on 35,97 kDa (Gasteiger *et al.*, 2005). *swc4Δ312* geeni sisaldas tüves ekspresseerus *swc4Δ312* valk (1E2-epitoot), mille signaal detekteeriti 37 kDa ja 50 kDa suurusmarkerite vahel (Joonis 10C). Seega on nii täispikka Swc4 kui

ka deletsiooniga *swc4Δ312* valgu suurused katses eeldatavad arvestades valkudele lisatud epitoopi.

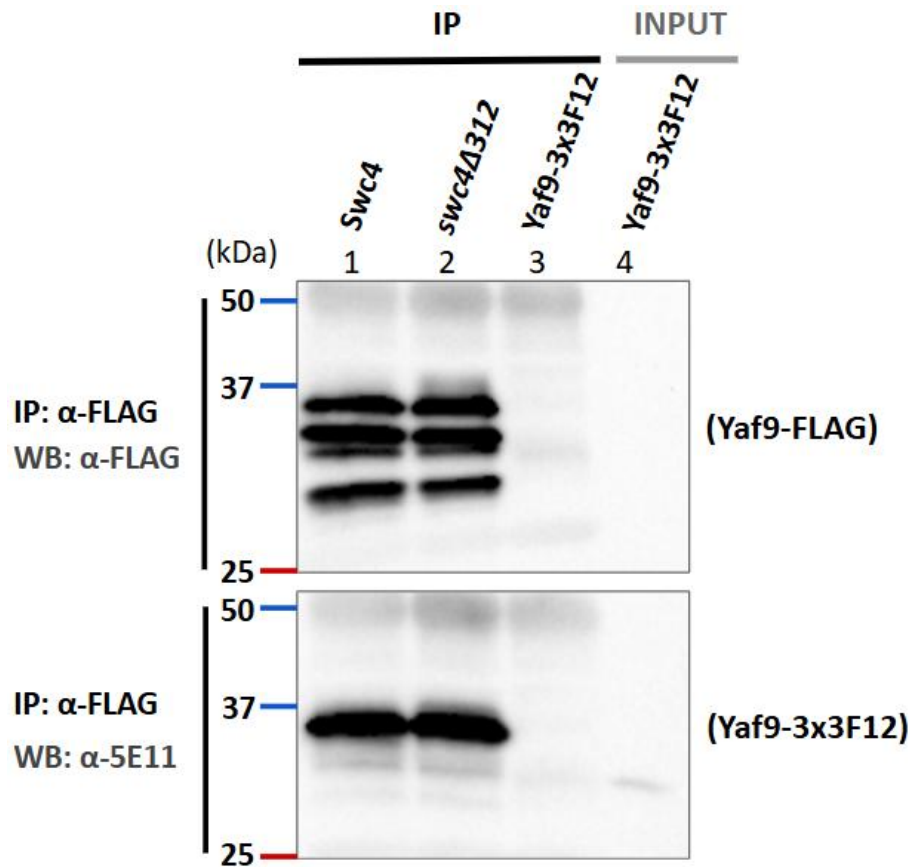


Joonis 10. Yaf9 valkude ja metsiktüüpi Swc4 valgu ning C-terminaalse deletsiooniga Swc4 valgu ekspressiooni kontrollimine *western blot* meetodil. 3x3F12 afiinsusmärgisega Yaf9 (A) ja 3xFLAG afiinsusmärgisega Yaf9 (B) valgud on visualiseeritud nii täispika Swc4-ga tüves (rada 1; AKY2857) kui ka C-terminaalse deletsiooniga *swc4Δ312* tüves (rada 2; AKY2859). (A) Kasutati anti-5E11-antikeha (tunneb ära 3x3F12-epitoopi). (B) Kasutati FLAG-vastast antikeha. Yaf9 eeldatav suurus koos 3x3F12-epitoobiga on 36,47 kDa ja koos 3xFLAG-epitoobiga 34,52 kDa. (C) Rajal 1 on visualiseeritud 3x1E2-epitoobiga täispikk Swc4, mille eeldatav suurus koos epitoobiga on 66,23 kDa. Rajal 2 on visualiseeritud samuti 3x1E2-epitoobiga märgistatud, kuid C-terminaalse deletsiooniga Swc4 valk, mille eeldatav suurus koos epitoobiga on 46,97 kDa. Mõlema valgu visualiseerimiseks kasutati 1E2-vastast antikeha. Suurusmarkerina kasutati *Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards* markerit.

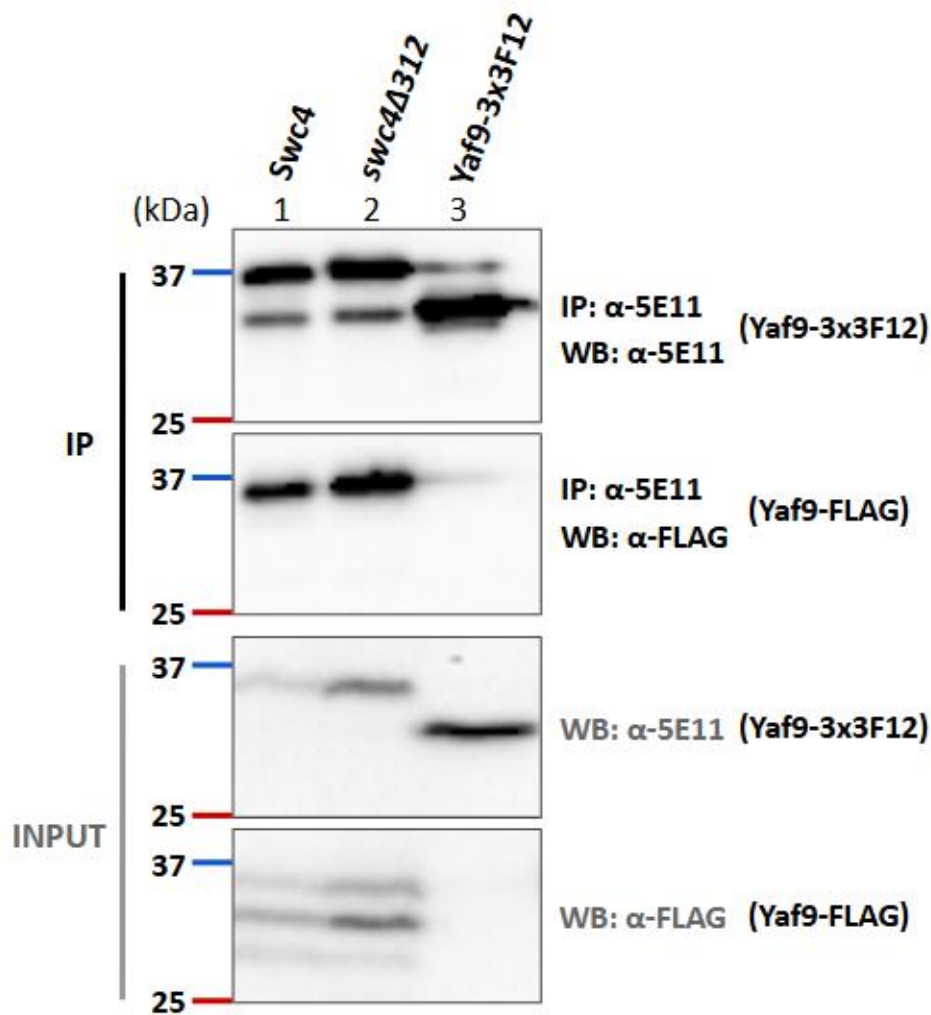
2.3.3. Yaf9 homodimeriseerub interaktsiooni puudumisel Swc4-ga

Kahe Yaf9 omavahelist seondumist uuriti koimmunopretsipitatsiooni katsega, kasutades täispika Swc4-ga tüve ja *swc4Δ312* tüve ning kontrolltüve *Yaf9-3x3F12* (AKY2834). Ühel juhul kasutati primaarse antigeenina FLAG-epitoobiga Yaf9 valku, kusjuures kõikides sadestatud proovides visualiseeriti valgud nii anti-FLAG-antikeha kui ka anti-5E11-antikeha kasutades (Joonis 11). Teisel juhul kasutati primaarse antigeenina 3x3F12-epitoobiga Yaf9 valku ja kõikides sadestatud proovides visualiseeriti valgud samuti nii anti-FLAG-antikeha kui ka anti-5E11-antikeha kasutades (Joonis 12).

Joonisel 11 (ülemine paneel) on koimmunopretsipitatsiooni katse, kus agarooskerakeste külge kinnitus FLAG-epitoobiga Yaf9. Joonise 11 (ülemine paneel) radadel 1-3 visualiseeriti sadestunud (FLAG-epitoobiga) Yaf9 valk. Immuunodetektsioonil nähti kõigil radadel, kus olid FLAG-epitoobiga Yaf9 valku sisaldavad proovid (rajad 1-2), nelja erineva suurusega valgusignaali. Rajal 4 olevas kontrolltüve proovis, mis ei sisalda FLAG-epitoopt, valgusignaali ei nähtud. Joonis 11 (alumine paneel) näitab samuti koimmunopretsipitatsiooni katset, kus agarooskerakeste külge kinnitus FLAG-epitoobiga Yaf9, kuid radadel 1-3 visualiseeriti kopretsipiteerunud (3x3F12-epitoobiga) Yaf9 valk. Immuunodetektsioonil nähti 3x3F12-epitoobiga Yaf9 signaali radadel 1-2, millel olevad proovid sisaldasid ka FLAG-epitoobiga Yaf9 valku (nagu nähtub Jooniselt 11 — ülemine paneel). Rajal 3 olevas kontrolltüve proovis FLAG-epitoobiga Yaf9 signaali ei nähtud. Seega näitab Joonis 11 (alumine paneel), et nii täispika Swc4-ga tüves (Swc4; rada 1) kui ka C-terminaalse deletsiooniga Swc4-ga tüves (*swc4Δ312*; rada 2) suudavad kaks Yaf9 valku omavahel interakteeruda, kuna visualiseerides anti-FLAG-agarooskerakestega lähteproovidest välja sadestatud valke anti-5E11-antikehaga (tunneb ära 3x3F12-epitoopt) detekteeriti mõlemal juhul 3x3F12-epitoobiga Yaf9 signaal. Sellest tulenevalt tuvastati antud koimmunopretsipitatsiooni katsega, et ka juhul, kui Swc4 valk pole võimeline interakteeruma Yaf9 valguga (tüves *swc4Δ312*), interakteeruvad rakkudes erinevate epitopidega (FLAG- ja 3x3F12-epitobid) Yaf9 valgud. Sama tulemus selgus ka vastupidises katses, kus täispika Swc4-ga tüvest ja *swc4Δ312* tüvest sadestati välja 3x3F12-epitoobiga Yaf9 valk anti-5E11-agarooskerakestega ning visualiseeriti anti-FLAG-antikehaga (Joonis 12 — ülevalt teine paneel).



Joonis 11. Yaf9 valkude koimmunopretsipitatsioon anti-FLAG-agarooskerakestega täispika ja C-terminaalse deletsiooniga Swc4 valgu juuresolekul. Radadel 1-3 on anti-FLAG-agarooskerakesi kasutades saadud koimmunopretsipitatsiooni proovid tüvedest: *Swc4* (rada 1; AKY2857), *swc4Δ312* (rada 2; AKY2859) ning kontrolltüvest *Yaf9-3x3F12* (rada 3; AKY2834). Neljandal rajal on lähteproov kontrolltüvest (input 5,5%). (Ülemine paneel) Valgud kõigil neljal rajal on visualiseeritud anti-FLAG-antikeha kasutades. (Alumine paneel) Valgud kõigil neljal rajal on visualiseeritud anti-5E11-antikeha kasutades (tunneb ära 3x3F12-epitoopi). „IP“ — koimmunopretsipitatsiooni proov. „INPUT“ — lähteproov.



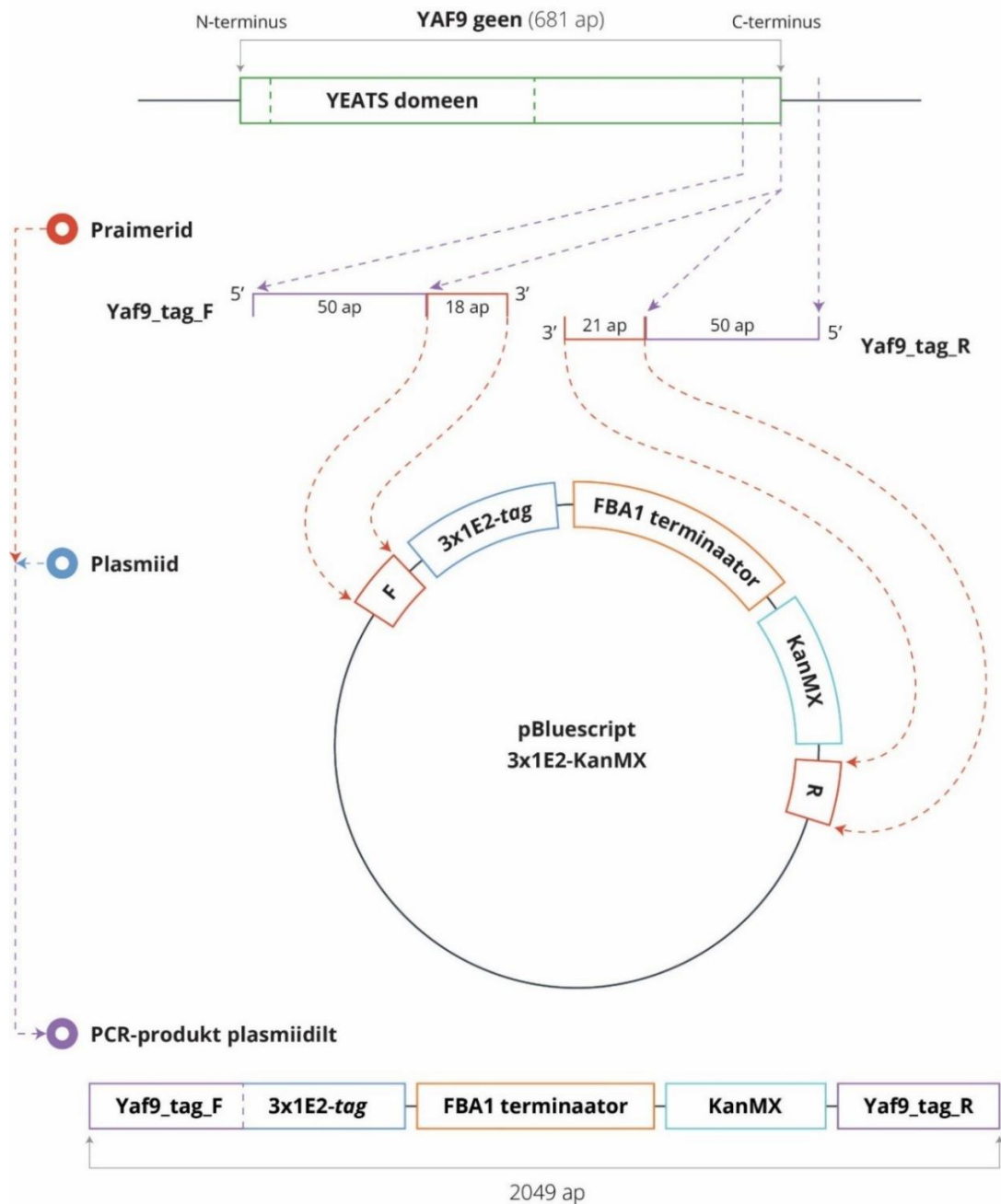
Joonis 12. Yaf9 valkude koimmunopretsipitatsioon anti-5E11-agarooskerakestega täispika ja C-terminaalse deletsiooniga Swc4 valgu juuresolekul. (Kaks ülemist paneeli) Kõigil radadel on koimmunopretsipitatsiooni proovid (saadud anti-5E11-agarooskerakesi kasutades) tüvedest: *Swc4* (rada 1; AKY2857), *swc4Δ312* (rada 2; AKY2859) ja kontrolltüvest *Yaf9-3x3F12* (rada 3; AKY2834). (Kõige ülemine paneel) Kõigil radadel olevad valgud on visualiseeritud anti-5E11-antikeha kasutades (tunneb ära 3x3F12-epitoopt). (Ülevalt teine paneel) Kõigil radadel olevad valgud on visualiseeritud anti-FLAG-antikeha kasutades. (Kaks alumist paneeli) Kõigil radadel on lähteproovid (input 5,5%) tüvedest: *Swc4* (rada 1; AKY2857), *swc4Δ312* (rada 2; AKY2859) ning kontrolltüvest *Yaf9-3x3F12* (rada 3; AKY2834). (Alt teine paneel) Kõik lähteproovid on visualiseeritud anti-5E11-antikeha kasutades (tunneb ära 3x3F12-epitoopt). (Kõige alumine paneel) Kõik lähteproovid on visualiseeritud anti-FLAG-antikeha kasutades. „IP“ — koimmunopretsipitatsiooni proov. „INPUT“ — lähteproov.

2.3.4. Yaf9 C-terminaalne domeen on vajalik kahe Yaf9 interaktsiooniks

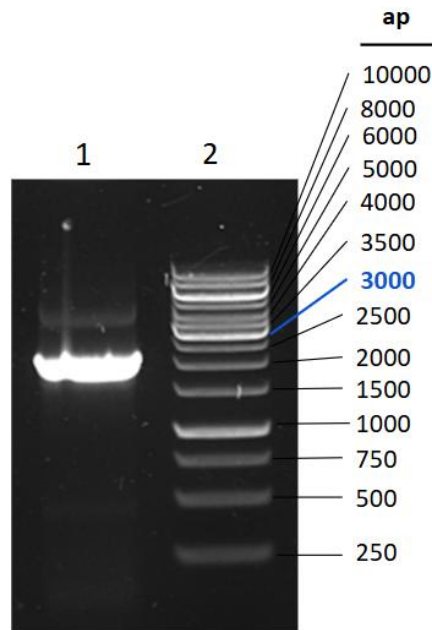
Saades teada, et vähemalt kaks Yaf9 valku suudavad omavahel iseseisvalt interakteeruda, esitati küsimus, kas Yaf9 valgud interakteeruvad N- või C-terminaalse osa kaudu. Käesolevas töös keskenduti karboksüterminaalse domeeni rollile Yaf9 valkude interaktsioonil. Selleks konstrueeriti uus tüvi kasutades olemasolevat pärmitüve AKY2830, mille ADE2 markergeeni lookuses oli juba C-terminaalse deletsiooniga (alates 186. ah) FLAG-epitoobiga Yaf9, ning milles oli endogeenne ilma epitoobita täispikk Yaf9. Tüve konstrueerimiseks lisati endogeensele YAF9 geenile C-terminaalsesse otsa 3x1E2-epitoomärgis transformeerides tüve AKY2830 DNA-fragmendiga, mis koosnes: Yaf9 C-terminaalse osaga homoloogsest 50 aluspaari pikkusest järjestusest, 3x1E2-epitoomärgisest, FBA1 terminaatorjärjestusest, kanamütsiinile resistentsust tagavast markergeeni järjestusest (KanMX) ja Yaf9 terminaatorpiirkonnaga homoloogsest 50 aluspaari pikkusest alast (Joonis 13). Antud fragment sünteesiti pBluescript-3x1E2-KanMX plasmiidilt PCR-meetodil. PCR-i tegemiseks kasutati praimereid Yaf9_tag_F ning Yaf9_tag_R. Primer Yaf9_tag_F koosneb 5'-otsast YAF9 C-terminaalse osaga komplementaarsest 50 aluspaari pikkusest järjestusest ning 3'-otsast 18 aluspaari pikkusest järjestusest, mis on komplementaarne 3x1E2-epitooopi kodeerivast järjestusest ülesvoolu paikneva alaga plasmiidil. Primer Yaf9_tag_R koosneb 5'-otsast YAF9 terminaatorpiirkonnaga homoloogsest 50 aluspaari pikkusest alast ning 3'-otsast 21 aluspaari pikkusest järjestusest, mis on komplementaarne KanMX markergeeni kodeerivast järjestusest allavoolu paikneva alaga plasmiidil. Selgitav skeem transformatsiooniks kasutatava DNA-fragmendi sünteesimisest on kujutatud Joonisel 13.

PCR-meetodiga plasmiidilt amplifitseeritud DNA-fragmenti kontrolliti agarosgeel-elektroforeesiga ning tulemused visualiseeriti UV-kiirguse abil (Joonis 14). Jooniselt 14 nähtub, et amplifitseeritud PCR-produkt paikneb 2000 aluspaari suurusmarkeri juures, mis on kooskõlas produkti eeldatava suurusega (2049 aluspaari).

Täispikk YAF9 geen (*S. cerevisiae* kromosoom XIV vahemik 420098..420778)



Joonis 13. Transformatsiooniks kasutatava DNA-fragmendi sünteesimise skeem. Skeemil on kujutatud YAF9 geeni ülesehitus (roheline rõngas), plasmiidilt soovitud DNA-fragmendi amplifitseerimiseks kasutatud praimerid (punane rõngas), kusjuures 50 aluspaari (ap) YAF9 C-terminaalset otsast on homoloogne praimer Yaf9_tag_F 5'-otsaga (lilla) ja 50 ap YAF9 C-terminaalset otsa kodeerivast alast allavoolu (terminaatorala) on homoloogne praimer Yaf9_tag_R 5'-otsaga (lilla). Praimerite 3'-otsad (punased) on komplementaarsed pBluescript-3x1E2-KanMX plasmiidil (sinine rõngas) paiknevate aladega. Praimerite abil plasmiidilt sünteesitud PCR-produkt (lilla rõngas) on kujutatud skeemi allosas. Joonis on illustreeriv ja sellel olevad elemendid ei ole suurusepõhistes proportsioonides. Muudetud joonis allikast (Rikk, 2022).

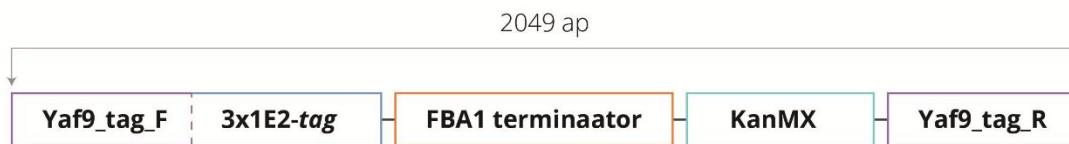


Joonis 14. pBluescript-3x1E2-KanMX plasmiidilt sünteesitud PCR-produkti kontrollimine. Rajal 1 on proov pBluescript-3x1E2-KanMX plasmiidilt amplifitseeritud PCR-produktiga, mille eeldatav suurus on 2049 aluspaari. Rajal 2 on DNA-suurusmarker *Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder*. PCR-fragmenti jookutati 1% TAE-agarosgeelis ja visualiseeriti etiidumbromiidiga UV-valguses.

3x1E2-epitoomärgist ja KanMX markergeeni sisaldavate järjestustega PCR-produkt sadestati ning transformeeriti liitiumatsetaadi meetodil tüvesse AKY2830. PCR-produkti ja transformeeritud tüve genoomi vahelise homologilise rekombinatsiooni toimumise ja selle kontrollimise skeem on kujutatud Joonisel 15.

Transformeeritud rakud plaaditi esmalt rikka söötmega (YPD) tassile ning tembeldati seejärel G-418 antibiootikumi sisaldavale selektiivtassile (mis võimaldab kasvada ainult kanamütsiini resistentsusgeeni (KanMX) sisaldavatel rakkudel). Selektiivtassilt valiti transformatsiooni kontrolliks välja neli kolooniat, millest eraldati DNA liitiumatsetaadi meetodil. Igast kolooniast eraldatud DNA pealt viidi läbi PCR YAF9 C-terminaalse piirkonna ja afiinsusmärgise (3x1E2) amplifitseerimiseks (Joonis 15). PCR-i tegemiseks kasutati praimereid Yaf9-tag-ctrl (23 aluspaari) ja FBA1_ctrl_2 (21 aluspaari) (Joonis 15). PCR-meetodiga kolooniate genoomselt DNA-lt amplifitseeritud fragmenti kontrolliti agarosgeelelektroforeesiga ning tulemused visualiseeriti

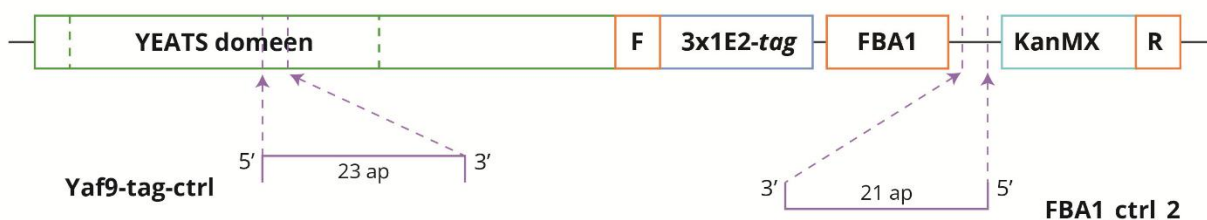
● PCR-produkt plasmiidilt



● Täispikk YAF9 geen



● 3x1E2-tag inserdiga YAF9 geen

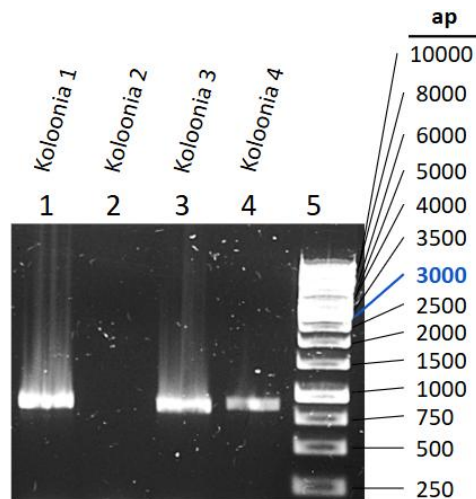


● Kontrollitav PCR-produkt genoomilt



Joonis 15. PCR-produkti ja transformeeritud tüve genoomi vahelise homoloogilise rekombinatsiooni toimumise ja selle kontrollimise skeem. Skeemil on kujutatud 3x1E2-epitooipi ja KanMX markergeeni sisaldava PCR-produkti (lilla rõngas) sisenemist YAF9 geeni (roheline rõngas) C-terminuse otsa. Homoloogilise rekombinatsiooni tulemusena tekib inserdiga YAF9 geen (rohe-sinine rõngas), mille C-terminust kodeeriva ala järel paikneb 3x1E2-epitooipjärjestus. Lisaks kandub genoomi üle ka praimer Yaf9_tag_F 3'-otsa 18-aluspaarine järjestus („F“) (Joonis 12), praimer Yaf9_tag_R 3'-otsa 21-aluspaarine järjestus („R“) (Joonis 12), FBA1 terminaatorjärjestus ning KanMX markergeeni järjestus. Homoloogilise rekombinatsiooni toimumist kontrolliti PCR-i abil, kasutades primereid Yaf9-tag-ctrl ja FBA1_ctrl_2, mille abil amplifitseeriti YAF9 C-terminuse piirkond (punane rõngas). Joonis on illustreeriv ja sellel olevad elemendid ei ole suurusepõhistes proportsioonides. Muudetud joonis allikast (Rikk, 2022).

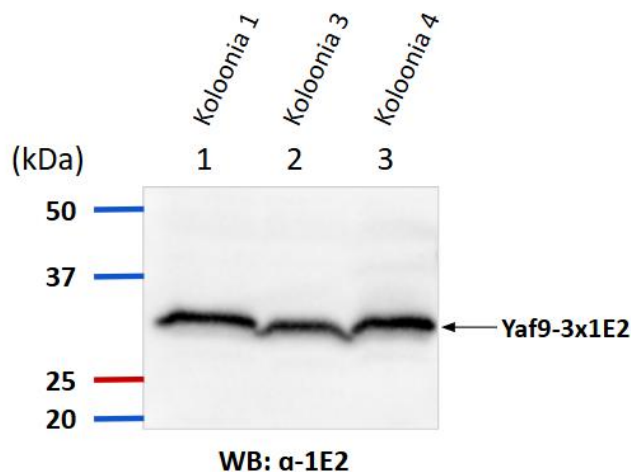
UV-kiirguse abil (Joonis 16). Jooniselt 16 nähtub, et kolooniate 1, 3 ja 4 genoomselt DNA-lt sünteesiti kontroll-PCR-i produkt. Kõik sünteesitud PCR-produktid detekteeriti 750-1000 aluspaari suurusmarkerite vahemikus, mis on kooskõlas produkti eeldatava suurusega (908 aluspaari).



Joonis 16. Transformeeritud kolooniate genoomselt DNA-lt saadud PCR-produktide kontrollimine. Radadel 1-4 on vastavalt transformatsiooni kolooniate 1, 2, 3 ja 4 genoomselt DNA-lt amplifitseeritud PCR-produkti proovid. Kõigi produktide eeldatav suurus on 908 aluspaari. Rajal 5 on DNA-suurusmarker *Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder*. PCR-fragmenti jooksutati 1% TAE-agarosgeelis ja visualiseeriti etiidiumbromiidiga UV-valguses.

Järgnevalt viidi PCR-produkti signaali andnud kolme kolooniaga (kolooniad 1, 3 ja 4) läbi *western blot* katse kontrollimaks C-terminaalse 3x1E2-epitoobiga Yaf9 valgu ekspressiooni antud kolooniates. Jooniselt 17 nähtub, et kõigis kolmes koloonias ekspresseerus 3x1E2-märgisega täispikk Yaf9. Kõigi kolooniate proovid andsid 1E2-vastase antikehaga visualiseerides signaali 25 kDa ja 37 kDa suurusmarkerite vahel, mis on kooskõlas Yaf9 eeldatava suurusega (25,97 kDa). Transformatsiooni koloonia 3 rakud säilitati edasiseks kasutamiseks -80°C juures uue tüvenimega AKY2912 (Tabel 1).

Olles kindlaks teinud, et 3x1E2-epitoobi lisamine täispika Yaf9 C-terminusesse oli edukas, viidi transformeeritud kolooniatega 1, 3 ja 4 ning algse transformeerimata tüvega (AKY2830) läbi koimmunopretsipitatsiooni katse, et teha kindlaks Yaf9 C-terminaalse domeeni olulisus kahe Yaf9 interaktsioonil.

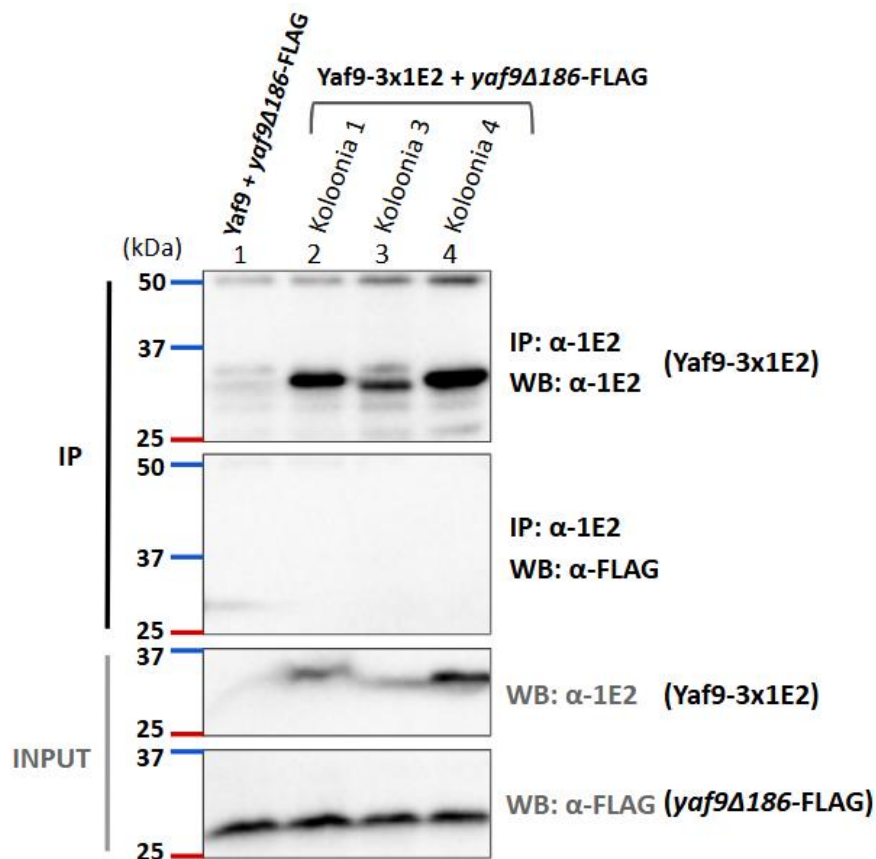


Joonis 17. Transformeeritud kolooniates 3x1E2-epitoobiga Yaf9 valgu ekspressiooni kontrollimine *western blot* meetodil. Radadel 1-3 on vastavalt transformatsiooni kolooniade 1, 3 ja 4 valguproovid. Kõikidest proovidest on visualiseeritud 3x1E2-epitoobiga täispikk Yaf9 kasutades 1E2-vastast antikeha. Yaf9 eeldatav suurus ilma epitoobita on 25,97 kDa (The *Saccharomyces* Genome Database, *n.d*).

Esimesel juhul sadestati kõigist lähteproovidest (*Yaf9+yaf9Δ186-FLAG* (AKY2830) ja *Yaf9-3x1E2+yaf9Δ186-FLAG* (kolooniad 1, 3 ja 4) välja täispikk Yaf9 kasutades anti-1E2-agaroskerakesi ning sadestatud valgud visualiseeriti anti-1E2-antikehaga (Joonis 18 — kõige ülemine paneel). Kõik 3x1E2-epitoobiga Yaf9-valku ekspresseerivad kolooniad näitasid täispika Yaf9 signaali 25 kDa ja 37 kDa suurusmarkerite vahel, mis ühtib Yaf9 eeldatava suurusega (25,97 kDa) (Joonis 18 — kõige ülemine ja alt teine paneel). Seega töötasid anti-1E2-agaroskerakesed 3x1E2-epitoobiga Yaf9 valgu sadestamisel efektiivselt.

Teisel juhul (Joonis 18 — ülalt teine paneel) kasutati samu koimmunopretsipitatsiooni proove, mida kasutati esimesel juhul (Joonis 18 — kõige ülemine paneel), kuid täispika Yaf9 ja C-terminaalse deletsiooniga Yaf9 potentsiaalse interaktsiooni uurimiseks visualiseeriti anti-1E2-agaroskerakestega lähteproovidest välja sadestatud valke anti-FLAG-antikehaga. Lähteproovide visualiseerimine anti-FLAG-antikehaga näitas, et kõik kolm *Yaf9-3x1E2+yaf9Δ186-FLAG* kolooniad ekspresseerisid FLAG-epitoobiga C-terminaalse deletsiooniga Yaf9 valku (Joonis 18 — kõige alumine paneel), kuid koimmunopretsipitatsiooni proovide visualiseerimisel anti-FLAG-antikehaga ei ilmnenud üheski proovis signaali valguprodukti kohta (Joonis 18 — ülalt teine paneel). Seega tõendab katse koimmunopretsipitatsiooni proovidega antud kolmest

transformatsiooni kolooniast üheselt, et kahe Yaf9 omavaheliseks interakteerumiseks on vajalik vähemalt ühe Yaf9 C-terminaalne domeen.



Joonis 18. Täispika ja C-terminaalse deletsiooniga Yaf9 valkude koimmunopretsipitatsioon. (Kaks ülemist paneeli) Radadel 1-4 on vastavalt koimmunopretsipitatsiooni proovid: *Yaf9+yaf9Δ186-FLAG* (AKY2830) ja *Yaf9-3x1E2+yaf9Δ186-FLAG* kolooniad 1, 3 ja 4. Kõik proovid on saadud anti-1E2-agarooskerakestega lähteproovidest täispika Yaf9 välja sadestamisel. (Kõige ülemine paneel) Sadestatud Yaf9 on visualiseeritud anti-1E2-antikehaga. (Ülalt teine paneel) Sadestatud valgud on visualiseeritud anti-FLAG-antikehaga, mis saab seonduda FLAG-epitoobiga C-terminaalse deletsiooniga Yaf9-ga. (Kaks alumist paneeli) Radadel 1-4 on vastavalt lähteproovid (input 5,5%): *Yaf9+yaf9Δ186-FLAG* (AKY2830) ja *Yaf9-3x1E2+yaf9Δ186-FLAG* kolooniad 1, 3 ja 4. (Alt teine paneel) Kõigil radadel on anti-1E2-antikehaga visualiseeritud täispikk Yaf9. (Kõige alumine paneel) Kõigil radadel on anti-FLAG-antikehaga visualiseeritud C-terminaalse deletsiooniga Yaf9. „IP“ — koimmunopretsipitatsiooni proov. „INPUT“ — lähteproov.

2.4. ARUTELU

Transkriptsiooni regulatsioon eukarüootse raku tuumas on geeniekspressiooni regulatsiooni esmase etapina fundamentaalse tähtsusega organismi paljudeks rakulisteks protsessideks. Transkriptsiooni regulatsioonis mängib keskset rolli kromatiinistruktuuri muutmine, mida teostavad erinevad kromatiini modifitseerivad ja remodelleerivad kompleksid. Sealjuures on oluline selliste komplekside omavaheline koostöö ja koordineeritus. Käesolev töö keskendub pagaripärmi *S. cerevisiae* NuA4 histooni atsetüültransferaasi kompleksi ja SWR1 histoonivariandi Htz1 väljavahetamise kompleksi potentsiaalsele interakteerumisele mõlemasse kompleksi kuuluva alaühiku Yaf9 kaudu. Varasemast on teada, et pagaripärmis on NuA4 ja SWR1 komplekside funktsioonid koordineeritud (Auger *et al.*, 2008; Babiarz *et al.*, 2006), ning hulkraksetes on need kaks kompleksi evolutsioonis ühinenud TIP60 kompleksiks, omades mõlema algse kompleksi funktsioone (Yang *et al.*, 2024). See annab aluse eelduseks, et pagaripärmi NuA4 ja SWR1 kompleksid võivad ka füüsiliselt rakkudes interakteeruda. Seejuures pakuti antud komplekside seondumise vahendajaks Yaf9 transkriptsiooni regulaatorvalku peamiselt põhjusel, et pärmi *C. albicans* näitel on NuA4 ja SWR1 komplekside seondumine vahendatud Yaf9 valgu kaudu (X. Wang *et al.*, 2018). Ideed Yaf9 valgust NuA4 ja SWR1 komplekside vahendajana toetab ka leid tööühma avaldamata andmetest, et pagaripärmis koimmunopretsipiteeruvad kaks Yaf9 valku.

Teadaolevalt vahendab Yaf9 seondumist NuA4 ja SWR1 kompleksidesse mõlemasse kompleksi kuuluv Swc4 valk, mille C-terminaalne domeen interakteerub Yaf9 C-terminaalse lõim-põim domeeniga (Bittner *et al.*, 2004; H. Zhang *et al.*, 2004; A. Y. Wang *et al.*, 2009). Käesoleva uurimistöö katsetest selgus, et kaks Yaf9 valku seonduvad üksteisega ka juhul, kui Yaf9 valku ei inkorporeerita kompleksidesse Swc4-ga seondumise abil. Asjaolu, et kahel Yaf9 valgul on ka NuA4 ja SWR1 kompleksidest sõltumatu võime homodimeriseeruda, toetab võimalust, et antud kompleksid interakteeruvad mõlemasse kompleksi kuuluva Yaf9 kaudu. Lisaks kinnitati tööühma varasemat leidu kahe Yaf9 koimmunosadestumisest, näidates, et kaks Yaf9 valku seonduvad omavahel olukorras, kui Yaf9 saab seonduda Swc4-ga ega ole takistatud NuA4 ja SWR1 kompleksidesse seondumisel. See toetab samamoodi eeldust, et Yaf9 võib vahendada NuA4 ja SWR1 komplekside interakteerumist pagaripärmis. Samas ei välista see võimalust, et kahe Yaf9 seondumisel tuuakse kokku kaks SWR1 kompleksi või kaks NuA4 kompleksi. Siiski ei anna

käesoleva töö katsetulemused kinnitust, et pagaripärmi NuA4 ja SWR1 komplekside arvatav interaktsioon toimub spetsiifiliselt Yaf9 kaudu, mistõttu võivad arvatavat interakteerumist vahendada ka muud tegurid. Näiteks võivad interaktsiooni vahendada ka teised NuA4 ja SWR1 komplekside ühised alaühikud (Swc4, Arp4, Act1). Samuti võivad kompleksid olla ajutiselt seoses vaid seetõttu, et mõlemad toimivad aktiivse transkriptsiooni lookustes ning nende värbamine kromatiinile on seotud H3 ja H4 atsetüleerimisega.

Märkimist väärib koimmunopretsipitatsiooni katsete puhul, et mitmel juhul (FLAG-vastase antikehaga sadestamine ja visualiseerimine ning 5E11-vastase antikehaga sadestamine ja visualiseerimine) tekkis Yaf9 visualiseerimisel mitu valgusignaali. Kaks valgusignaali andis ka rakulüsaatidest Yaf9 visualiseerimine anti-FLAG-antikehaga. Kuna sarnaseid tulemusi on näinud kolleegid kromatiini töögurpist, võib tegu olla Yaf9 veel identifitseerimata post-translatsioonilise modifikatsiooniga. Nähtava suuruse vahe võivad tekitada näiteks ubikvitinüleerimine või sumoüleerimine, mis on seotud valgu eluea regulatsiooniga vastusena muutustele rakkude kasvukeskkonnas. Seda hüpoteesi pole veel testitud, kuid korduv mitmekordse signaali detektsioon vajab edasist uurimist.

Põhjuseks, miks NuA4 ja SWR1 komplekside interakteerumist pagaripärmis ei ole senini katseliselt näidatud, võib olla komplekside nõrk või lühiajaline seondumine, mistõttu on seondumise tõestamine raskendatud. Sealjuures võib NuA4 ja SWR1 komplekside kokkutoomine olla tingimuslik. Seda põhjusel, et kuigi *yaf9Δ* tüves on telomeeride lähedastes lookustes nii NuA4 teostatav H4 atsetülatsioon kui ka SWR1 teostatav Htz1 paigutamine kromatiinile vähenenud, siis kasvavad *yaf9Δ* rakud optimaalsetes tingimustes normaalselt. Seevastu avalduvad *yaf9Δ* tüves kasvuprobleemid stressitingimustes (Le Masson *et al.*, 2003; H. Zhang *et al.*, 2004). Seega võib NuA4 ja SWR1 komplekside kokkutoomine Yaf9 valkude seondumisel olla hüpoteetiliselt vajalik rakustressi olukorras. Selleks, et kontrollida komplekside nõrka või lühiajalist interaktsiooni tavatingimustes võiks potentsiaalselt kasutada *in vivo* valkude kovalentset ristsidestamist ning seejärel teha koimmunopretsipitatsioonikatse, kus sadestamiseks kasutatakse ainult ühele kompleksile spetsiifilise alaühiku vastast antikeha (näiteks NuA4-spetsiifiline Eaf1), ning immunodetektsioonil vaadata, kas proovis on ka teise kompleksi spetsiifilise alaühiku (näiteks SWR1-spetsiifiline Swr1) signaal. Yaf9 rolli komplekside kokkutoomisel saaks kontrollida sama katse kordamisega *yaf9Δ* tüves, kus signaali kadumine

viitaks, et Yaf9 on komplekside vahelise silla moodustajaks. Samasugusel viisil ristsidestamist ja koimmunopretsipitatsiooni tegemist saaks kasutada NuA4 ja SWR1 komplekside interaktsiooni uurimiseks stressitingimustes, proovides tabada hetke, kui Yaf9 valkude abil komplekside seondumist oleks vaja. Siiski võib sellise katse puhul olla keeruline optimeerida ristsidestamise kestust, kuna erinevalt imetajarakkudest on pärmirakkudel tihe rakusein, mistõttu liiga lühike ristsidestamise aeg võib olla ebaefektiivne, kuid liiga pikk aeg võib põhjustada epitoobi varjamist ristsidemete poolt või anda ka vale-positiivseid tulemusi, kus ristsidestatakse kõik valgud huvipakkuva kompleksi ümbruses.

Lisaks tõestati käesolevas uurimistöös, et kahe Yaf9 homodimeriseerumiseks on vajalik vähemalt ühe Yaf9 karboksüterminaalne domeen, kuna tüves, kus oli nii C-terminaalse deletsiooniga Yaf9 kui ka täispikk Yaf9, ei näidanud koimmunopretsipitatsiooni katse nende vahelist seondumist. See on ootuspärane, kuna lõim-põim domeenid (sh Yaf9 C-terminuses) on teadaolevad valkude vaheliste interaktsioonide vahendajad. Teisalt on teada, et Yaf9 seondub lõim-põim domeeni kaudu ka Swc4 valguga, mistõttu tekib küsimus, kas Yaf9 ja Swc4 valgud võivad konkureerida rakus Yaf9 lõim-põim domeeniga seondumise üle. Samuti võib Yaf9 valkude iseseisvast homodimeriseerumisest tulenevalt küsida, kas Yaf9 valgul on veel mõni NuA4 ja SWR1 kompleksidest sõltumatu funktsioon lisaks komplekside potentsiaalse interaktsiooni vahendamisele. Seda toetab ka asjaolu, et Yaf9 paiknemine NuA4 kompleksi krüo-EM struktuuris on määratlemata, mis viitab, et Yaf9 on antud kompleksis küllaltki dünaamiline alaühik ega ole vajalik kompleksi struktuurseks terviklikkuseks (Qu *et al.*, 2022).

Teades, et kaks Yaf9 valku suudavad *in vivo* edukalt seonduda, on võimalus, et ka rohkem kui kaks Yaf9 valku interakteeruvad omavahel. AlphaFold3 (Abramson *et al.*, 2024) struktuuriennustused kahe, kolme ja nelja Yaf9 valgu omavahelisest interakteerumisest (Lisa 2, Joonis 1) näitasid, et nii kogu kompleksi ennustuse täpsuse (*predicted template modeling* — pTM) väärtus kui ka alaühikute omavahelise paigutuse täpsuse (*interface predicted template modeling* — ipTM) väärtus olid kahe Yaf9 seondumisel alla usaldusväärsuse piiri, kuigi antud töös on katseliselt tõestatud, et Yaf9 homodimeriseerub rakkudes iseseisvalt. Homodimeriseerumisele sarnast ipTM-väärtust ja veel madalamat pTM-väärtust omas nelja Yaf9 seondumise struktuur. Huvitavalt oli Yaf9 trimeerse struktuuri ennustus koos selle alaühikute paigutusega kõige usaldusväärsem, mis annab põhjust tulevastes katsetes uurida, kas Yaf9

trimeeril võiks pärmirakkudes esineda muudest kompleksidest sõltumatuid funktsioone, ning kuidas võiks trimeriseerumine mõjutada NuA4 ja SWR1 komplekside võimalikku ühendamist. Ühe võimaliku hüpoteesina olemasolevate teadmiste põhjal võiks välja pakkuda mehhanismi, kus üks eraldiseisev Yaf9 monomeer tunneb ära histoonimärgise kromatiinil värvates sellele omakorda kahe Yaf9 interaktsioonil kokkutoodud NuA4 ja SWR1 kompleksid, moodustades kromatiini ja komplekside vahel Yaf9 trimeeri.

KOKKUVÕTE

Geeniekspressiooni esmase etapi ehk transkriptsiooni regulatsioon kromatiinstruktuuri muutuste kaudu on komplekselt kontrollitud mehhanism, mida reguleerivad koht-spetsiifiliste transkriptsioonifaktorite poolt geenilookustesse värvatavad kromatiini modifitseerimis- ja remodelleerimiskompleksid. Käesoleva töö eesmärk oli kindlaks teha, kas pagaripärmi transkriptsiooni regulatsioonis osalev Yaf9 valk suudab homodimeriseeruda NuA4 histooni atsetüültransferaasi kompleksist ja SWR1 histoonivariandi vahetust läbiviivast kompleksist sõltumatult ning milline on selles Yaf9 karboksüterminaalse domeeni roll.

Yaf9 homodimerisatsiooni uurimiseks konstrueeriti käesolevas töös kaks pärmitüve, millest mõlemad ekspresseerivad kahe erineva afiinsusmärgisega Yaf9 valke, kuid üks ekspresseerib lisaks täispikka Swc4 valku ja teine C-terminaalse deletsiooniga Swc4 valku (Joonised 9 ja 10). Sellised tüved konstrueeriti, kuna Yaf9 inkorporeerub NuA4 ja SWR1 kompleksidesse oma C-terminuse kaudu, seondudes mõlemasse kompleksi kuuluva Swc4 valgu C-terminaalse domeeniga. Koimmunosadestamise katse antud tüvedega (Joonised 11 ja 12) näitas, et kaks Yaf9 valku homodimeriseeruvad sõltumata sellest, kas Yaf9 liitumine NuA4 ja SWR1 kompleksidesse Swc4 C-terminusega seondumise kaudu on võimalik või mitte. Antud tulemus võib viidata NuA4 ja SWR1 komplekside võimalikule kokkutoomisele mõlemasse kompleksi kuuluva Yaf9 homodimeriseerumise kaudu. Yaf9 C-terminaalse domeeni rolli uurimiseks Yaf9 homodimerisatsioonis konstrueeriti eraldi tüvi, mis ekspresseerib erinevate afiinsusmärgistega täispikka ja C-terminaalse deletsiooniga Yaf9 valku (Joonised 13-17). Koimmunosadestamise katsest selgus, et kahe Yaf9 seondumiseks pärmirakkudes on vajalik minimaalselt ühe Yaf9 valgu C-terminaalne lõim-põim domeen (Joonis 18).

Samuti viitasid antud töö tulemused Yaf9 valgu kompleksidest eraldiseisvast funktsioonist homodimeriseeruda sellele, et Yaf9 võib omada pärmirakkudes ka muid iseseisvaid funktsioone, mida tuleks tulevastes katsetes põhjalikumalt edasi uurida. Arutelus toodi ka välja aspekti, et lisaks Yaf9 teadaolevale homodimeriseerumisele, ennustab AlphaFold3 programm tõenäolist Yaf9 trimeerset struktuuri, mille olemasolu ja võimalikku funktsiooni pärmirakkudes oleks informatiivne tulevastes katsetes kontrollida.

NuA4- and SWR1-independent homodimerization of transcriptional regulatory protein Yaf9 in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

Paula Ojala

Summary

Precise regulation of gene expression is essential for all vital cellular processes in living organisms. In eukaryotic cells, genetic information is stored as chromatin — a tightly packed DNA-protein complex in which DNA is wrapped around histone octamers forming nucleosomes. The level of chromatin compaction determines whether a genomic region is transcriptionally active or silenced, and is dynamically regulated by specialized protein complexes that modify histone N-terminal tails or reposition nucleosomes. Disruption of these regulatory mechanisms has been linked to serious human diseases, including cancer and neurodegenerative disorders. Because chromatin regulatory proteins and mechanisms are strongly conserved between yeast and humans, studying them in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) contributes to a better understanding of the corresponding human processes.

In *S. cerevisiae*, the NuA4 histone acetyltransferase complex and the SWR1 chromatin remodeling complex carry out closely coordinated functions: NuA4 acetylates histone H4, H2A and H2A.Z tails to promote chromatin accessibility, while SWR1 uses ATP hydrolysis to replace canonical histone H2A with the histone variant Htz1 (H2A.Z), maintaining the boundary between eu- and heterochromatin. In higher eukaryotes, including humans, these two complexes have merged into a single entity — the TIP60 complex — during evolution. Despite this functional and evolutionary relationship, a direct physical interaction between NuA4 and SWR1 in *S. cerevisiae* has not previously been demonstrated experimentally.

Both NuA4 and SWR1 contain the transcriptional regulatory protein Yaf9, which harbors an N-terminal YEATS domain capable of recognizing acetylated histone lysine residues, thereby helping to recruit both complexes to specific chromatin regions marked by histone acetylation. Yaf9 is incorporated into both complexes through its C-terminal coiled-coil domain, which interacts with the C-terminal domain of Swc4 — a subunit shared between NuA4 and SWR1. The observation that NuA4 and SWR1 interaction is mediated through Yaf9 in the related yeast

Candida albicans, together with unpublished data from our research group showing that two Yaf9 proteins co-immunoprecipitate in *S. cerevisiae*, suggests that Yaf9 subunits present in the two separate complexes may interact directly with each other and therefore bring these two complexes together. The aim of this study was to determine whether Yaf9 is capable of homodimerizing independently of the NuA4 and SWR1 complexes, and to characterize the role of the Yaf9 C-terminal domain in this interaction.

To investigate Yaf9 homodimerization under conditions where its incorporation into NuA4 and SWR1 is either possible or prevented, two yeast strains were constructed expressing two differently epitope-tagged Yaf9 proteins, together with either full-length Swc4 or a C-terminally truncated Swc4 (*swc4Δ312*) unable to interact with Yaf9. Co-immunoprecipitation experiments demonstrated that two Yaf9 proteins interact with each other regardless of whether Swc4 can incorporate Yaf9 into the complexes, indicating that Yaf9 homodimerization occurs independently of complex membership.

To characterize the structural requirements for this interaction, a third yeast strain was constructed co-expressing full-length Yaf9 and a C-terminally truncated Yaf9 (*yaf9Δ186*), each carrying a different affinity tag. Co-immunoprecipitation with this strain showed no interaction between the two proteins, demonstrating that at least one intact C-terminal coiled-coil domain is required for Yaf9 homodimerization.

These results demonstrate that Yaf9 homodimerizes in *S. cerevisiae* independently of NuA4 and SWR1, and that this interaction requires the C-terminal coiled-coil domain of at least one Yaf9 molecule. These findings support the hypothesis that Yaf9 may act as a molecular bridge between the two complexes. However, the results do not directly confirm that such an interaction between the intact complexes occurs *in vivo*, and further experiments would be required to verify this. Additionally, the ability of Yaf9 to homodimerize independently raises the possibility that it may possess functions in the cell beyond its roles within NuA4 and SWR1, which warrants further investigation. Additionally, AlphaFold3 structural predictions raise the possibility of a trimeric Yaf9 assembly, the existence and potential function of which in yeast cells remains to be experimentally verified.

TÄNUSÕNAD

Olen siiralt tänulik oma juhendajale, Signe Värville, kes toetas mind igakülselt nii laboritöös kui ka bakalaureusetöö kirjutamisel, olles vastutulelik ja mõistev, ning suunates mind alati iseseisvalt mõtlema. Samuti tahan tänada kõiki teisi Rakubioloogia õppetooli liikmeid, kes nõu ja jõuga aitasid.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C.-C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- Allard, S., Utley, R. T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C. J., Pillus, L., Workman, J. L., ja Côté, J. (1999). The NuA4 transcription activation/histone H4 acetyltransferase complex contains the essential Esa1 protein as the catalytic subunit and the essential ATM-related cofactor Tra1p. *Biochemistry and Cell Biology*, 77(4), 383. <https://doi.org/10.1139/o99-903>
- Auger, A., Galarneau, L., Altaf, M., Nourani, A., Doyon, Y., Utley, R. T., Cronier, D., Allard, S., ja Côté, J. (2008). Eaf1 Is the Platform for NuA4 Molecular Assembly That Evolutionarily Links Chromatin Acetylation to ATP-Dependent Exchange of Histone H2A Variants. *Molecular and Cellular Biology*, 28(7), 2257–2270. <https://doi.org/10.1128/MCB.01755-07>
- Babiarz, J. E., Halley, J. E., ja Rine, J. (2006). Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes ja Development*, 20(6), 700–710. <https://doi.org/10.1101/gad.1386306>
- Bannister, A. J., ja Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Bittner, C. B., Zeisig, D. T., Zeisig, B. B., ja Slany, R. K. (2004). Direct Physical and Functional Interaction of the NuA4 Complex Components Yaf9p and Swc4p. *Eukaryotic Cell*, 3(4), 976–983. <https://doi.org/10.1128/EC.3.4.976-983.2004>
- Boudreault, A. A., Cronier, D., Selleck, W., Lacoste, N., Utley, R. T., Allard, S., Savard, J., Lane, W. S., Tan, S., ja Côté, J. (2003). Yeast Enhancer of Polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. *Genes ja Development*, 17(11), 1415–1428. <https://doi.org/10.1101/gad.1056603>
- Boyer, L. A., Latek, R. R., ja Peterson, C. L. (2004). The SANT domain: A unique histone-tail-binding module? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(2), 158–163. <https://doi.org/10.1038/nrm1314>
- Brown, C. E., Howe, L., Sousa, K., Alley, S. C., Carrozza, M. J., Tan, S., ja Workman, J. L. (2001). Recruitment of HAT Complexes by Direct Activator Interactions with the ATM-Related Tra1 Subunit. *Science*, 292(5525), 2333–2337. <https://doi.org/10.1126/science.1060214>
- Clapier, C. R., ja Cairns, B. R. (2009). The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 273–304. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223>

- Clapier, C. R., Iwasa, J., Cairns, B. R., ja Peterson, C. L. (2017). Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(7), 407–422. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.26>
- Clarke, A. S., Lowell, J. E., Jacobson, S. J., ja Pillus, L. (1999). Esa1p Is an Essential Histone Acetyltransferase Required for Cell Cycle Progression. *Molecular and Cellular Biology*, 19(4), 2515–2526. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.4.2515>
- Duina, A. A., Miller, M. E., ja Keeney, J. B. (2014). Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. *Genetics*, 197(1), 33–48. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163188>
- Eisen, A., Utley, R. T., Nourani, A., Allard, S., Schmidt, P., Lane, W. S., Lucchesi, J. C., ja Côté, J. (2001). The Yeast NuA4 and Drosophila MSL Complexes Contain Homologous Subunits Important for Transcription Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3484–3491. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008159200>
- Galarneau, L., Nourani, A., Boudreault, A. A., Zhang, Y., Héliot, L., Allard, S., Savard, J., Lane, W. S., Stillman, D. J., ja Côté, J. (2000). Multiple Links between the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex and Epigenetic Control of Transcription. *Molecular Cell*, 5(6), 927–937. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80258-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80258-0)
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., ja Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. J. M. Walker (Toim), *The Proteomics Protocols Handbook* (lk 571–607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Girbig, M., Misiaszek, A. D., ja Müller, C. W. (2022). Structural insights into nuclear transcription by eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(9), 603–622. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00476-9>
- Gottesfeld, J. M. (2019). Milestones in transcription and chromatin published in the Journal of Biological Chemistry. *Journal of Biological Chemistry*, 294(5), 1652–1660. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.004162>
- Gross, D. S., Chowdhary, S., Anandhakumar, J., ja Kainth, A. S. (2015). Chromatin. *Current Biology*, 25(24), R1158–R1163. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.059>
- Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S., ja Grunstein, M. (1996). Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature*, 383(6595), 92–96. <https://doi.org/10.1038/383092a0>
- Hsu, C.-C., Zhao, D., Shi, J., Peng, D., Guan, H., Li, Y., Huang, Y., Wen, H., Li, W., Li, H., ja Shi, X. (2018). Gas41 links histone acetylation to H2A.Z deposition and maintenance of embryonic stem cell identity. *Cell Discovery*, 4(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0027-0>

- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., ja Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403(6771), 795–800. <https://doi.org/10.1038/35001622>
- Jürgens, H., Väriv, S., Kristjuhan, K., ja Kristjuhan, A. (2026). Yaf9 connects NuA4 and SWR1 functions to maintain genome integrity. *GENETICS*, 232(4), iyag041. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyag041>
- Klein, B. J., Ahmad, S., Vann, K. R., Andrews, F. H., Mayo, Z. A., Bourriquen, G., Bridgers, J. B., Zhang, J., Strahl, B. D., Côté, J., ja Kutateladze, T. G. (2018). Yaf9 subunit of the NuA4 and SWR1 complexes targets histone H3K27ac through its YEATS domain. *Nucleic Acids Research*, 46(1), 421–430. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1151>
- Kobor, Michael. S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M. D., Gin, J. W., Jennings, J. L., Link, A. J., Madhani, H. D., ja Rine, J. (2004). A Protein Complex Containing the Conserved Swi2/Snf2-Related ATPase Swr1p Deposits Histone Variant H2A.Z into Euchromatin. *PLoS Biology*, 2(5), e131. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020131>
- Krogan, N. J., Baetz, K., Keogh, M.-C., Datta, N., Sawa, C., Kwok, T. C. Y., Thompson, N. J., Davey, M. G., Pootoolal, J., Hughes, T. R., Emili, A., Buratowski, S., Hieter, P., ja Greenblatt, J. F. (2004). Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(37), 13513–13518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405753101>
- Krogan, N. J., Keogh, M.-C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O. W., Ding, H., Haw, R. A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., Richards, D. P., Wu, X., Emili, A., Hughes, T. R., Buratowski, S., ja Greenblatt, J. F. (2003). A Snf2 Family ATPase Complex Required for Recruitment of the Histone H2A Variant Htz1. *Molecular Cell*, 12(6), 1565–1576. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00497-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00497-0)
- Le Masson, I., Yu, D. Y., Jensen, K., Chevalier, A., Courbeyrette, R., Boulard, Y., Smith, M. M., ja Mann, C. (2003). Yaf9, a Novel NuA4 Histone Acetyltransferase Subunit, Is Required for the Cellular Response to Spindle Stress in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 23(17), 6086–6102. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.17.6086-6102.2003>
- Li, Y., Wen, H., Xi, Y., Tanaka, K., Wang, H., Peng, D., Ren, Y., Jin, Q., Dent, S. Y. R., Li, W., Li, H., ja Shi, X. (2014). AF9 YEATS domain links histone acetylation to DOT1L-mediated H3K79 methylation. *Cell*, 159(3), 558–571. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.049>
- Lin, C.-L., Chaban, Y., Rees, D. M., McCormack, E. A., Ocloo, L., ja Wigley, D. B. (2017). Functional characterization and architecture of recombinant yeast SWR1 histone exchange complex. *Nucleic Acids Research*, 45(12), 7249–7260. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx414>
- Lu, P. Y. T., Lévesque, N., ja Kobor, M. S. (2009). NuA4 and SWR1-C: Two chromatin-modifying complexes with overlapping functions and components This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 30th Annual International Asilomar Chromatin and Chromosomes Conference, and has undergone the Journal's usual peer

- review process. *Biochemistry and Cell Biology*, 87(5), 799–815.
<https://doi.org/10.1139/O09-062>
- Lõoke, M., Kristjuhan, K., ja Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*, 50(5), 325–328.
<https://doi.org/10.2144/000113672>
- Meneghini, M. D., Wu, M., ja Madhani, H. D. (2003). Conserved Histone Variant H2A.Z Protects Euchromatin from the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin. *Cell*, 112(5), 725–736.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00123-5)
- Miciałkiewicz, A., ja Chelstowska, A. (2008). The essential function of Swc4p—A protein shared by two chromatin-modifying complexes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*—Resides within its N-terminal part. *Acta Biochimica Polonica*, 55(3), 603–612.
https://doi.org/10.18388/abp.2008_3067
- Miziak, P., Baran, M., Borkiewicz, L., Trombik, T., ja Stepulak, A. (2024). Acetylation of Histone H3 in Cancer Progression and Prognosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(20), 10982. <https://doi.org/10.3390/ijms252010982>
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.-H., Sen, S., ja Wu, C. (2004). ATP-Driven Exchange of Histone H2AZ Variant Catalyzed by SWR1 Chromatin Remodeling Complex. *Science*, 303(5656), 343–348. <https://doi.org/10.1126/science.1090701>
- Morrison, O., ja Thakur, J. (2021). Molecular Complexes at Euchromatin, Heterochromatin and Centromeric Chromatin. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6922.
<https://doi.org/10.3390/ijms22136922>
- Nourani, A., Doyon, Y., Utley, R. T., Allard, S., Lane, W. S., ja Côté, J. (2001). Role of an ING1 Growth Regulator in Transcriptional Activation and Targeted Histone Acetylation by the NuA4 Complex. *Molecular and Cellular Biology*, 21(22), 7629–7640.
<https://doi.org/10.1128/MCB.21.22.7629-7640.2001>
- Pan, Y., Hu, C., Hou, L.-J., Chen, Y.-L., Shi, J., Liu, J.-C., ja Zhou, J.-Q. (2023). Swc4 protects nucleosome-free rDNA, tDNA and telomere loci to inhibit genome instability. *DNA Repair*, 127, 103512. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2023.103512>
- Peterson, C. L., ja Laniel, M.-A. (2004). Histones and histone modifications. *Current Biology*, 14(14), R546–R551. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.007>
- Qu, K., Chen, K., Wang, H., Li, X., ja Chen, Z. (2022). Structure of the NuA4 acetyltransferase complex bound to the nucleosome. *Nature*, 610(7932), 569–574.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-05303-x>
- Rikk, L. (2022). *Saccharomyces cerevisiae mudelsüsteemi loomine uurimaks Yaf9 valgu YEATS-domeeni funktsioone* [Bakalaureusetöö]. Tartu Ülikool.
- Robert, F., ja Jeronimo, C. (2023). Transcription-coupled nucleosome assembly. *Trends in Biochemical Sciences*, 48(11), 978–992. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.08.003>

- Rossetto, D., Cramet, M., Wang, A. Y., Steunou, A., Lacoste, N., Schulze, J. M., Côté, V., Monnet-Saksouk, J., Piquet, S., Nourani, A., Kobor, M. S., ja Côté, J. (2014). Eaf5/7/3 form a functionally independent NuA4 submodule linked to RNA polymerase II -coupled nucleosome recycling. *The EMBO Journal*, 33(12), 1397–1415. <https://doi.org/10.15252/embj.201386433>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., ja Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2. tr, Kd 3). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schulze, J. M., Wang, A. Y., ja Kobor, M. S. (2009, jaanuar 1). YEATS domain proteins: A diverse family with many links to chromatin modification and transcription. *BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY*, 87(1), 65–75. (RN247854318).
- Sokolova, V., Sarkar, S., ja Tan, D. (2023). Histone variants and chromatin structure, update of advances. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.12.002>
- Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K., ja Grunstein, M. (1997). SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes ja Development*, 11(1), 83–93. <https://doi.org/10.1101/gad.11.1.83>
- Zhang, H., Richardson, D. O., Roberts, D. N., Utley, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Côté, J., ja Cairns, B. R. (2004). The Yaf9 Component of the SWR1 and NuA4 Complexes Is Required for Proper Gene Expression, Histone H4 Acetylation, and Htz1 Replacement near Telomeres. *Molecular and Cellular Biology*, 24(21), 9424–9436. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9424-9436.2004>
- Zhang, J., Gundu, A., ja Strahl, B. D. (2021). Recognition of acetylated histone by Yaf9 regulates metabolic cycling of transcription initiation and chromatin regulatory factors. *Genes ja Development*, 35(23–24), 1678–1692. <https://doi.org/10.1101/gad.348904.121>
- Zhou, B. O., Wang, S.-S., Xu, L.-X., Meng, F.-L., Xuan, Y.-J., Duan, Y.-M., Wang, J.-Y., Hu, H., Dong, X., Ding, J., ja Zhou, J.-Q. (2010). SWR1 Complex Poises Heterochromatin Boundaries for Antisilencing Activity Propagation. *Molecular and Cellular Biology*, 30(10), 2391–2400. <https://doi.org/10.1128/MCB.01106-09>
- Zukin, S. A., Marunde, M. R., Popova, I. K., Soczek, K. M., Nogales, E., ja Patel, A. B. (2022). Structure and flexibility of the yeast NuA4 histone acetyltransferase complex. *eLife*, 11, e81400. <https://doi.org/10.7554/eLife.81400>
- Thomas, B. J., ja Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, 56(4), 619–630. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90584-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90584-9)
- Truebestein, L., ja Leonard, T. A. (2016). Coiled-coils: The long and short of it. *BioEssays*, 38(9), 903–916. <https://doi.org/10.1002/bies.201600062>
- Valencia, A. M., ja Kadoch, C. (2019). Chromatin regulatory mechanisms and therapeutic opportunities in cancer. *Nature Cell Biology*, 21(2), 152–161. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0258-1>

- Vanderwaeren, L., Dok, R., Voordeckers, K., Nuyts, S., ja Verstrepen, K. J. (2022). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11665. <https://doi.org/10.3390/ijms231911665>
- Venters, B. J., ja Pugh, B. F. (2009). How eukaryotic genes are transcribed. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(2–3), 117–141. <https://doi.org/10.1080/10409230902858785>
- Wang, A. Y., Schulze, J. M., Skordalakes, E., Gin, J. W., Berger, J. M., Rine, J., ja Kobor, M. S. (2009). Asf1-like structure of the conserved Yaf9 YEATS domain and role in H2A.Z deposition and acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), 21573–21578. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906539106>
- Wang, X., Zhu, W., Chang, P., Wu, H., Liu, H., ja Chen, J. (2018). Merge and separation of NuA4 and SWR1 complexes control cell fate plasticity in *Candida albicans*. *Cell Discovery*, 4(1), 45. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0043-0>
- Wu, W.-H., Alami, S., Luk, E., Wu, C.-H., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D., ja Wu, C. (2005). Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nature Structural ja Molecular Biology*, 12(12), 1064–1071. <https://doi.org/10.1038/nsmb1023>
- Wu, W.-H., Wu, C.-H., Ladurner, A., Mizuguchi, G., Wei, D., Xiao, H., Luk, E., Ranjan, A., ja Wu, C. (2009). N Terminus of Swr1 Binds to Histone H2AZ and Provides a Platform for Subunit Assembly in the Chromatin Remodeling Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10), 6200–6207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808830200>
- Yang, Z., Mameri, A., Cattoglio, C., Lachance, C., Florez Ariza, A. J., Luo, J., Humbert, J., Sudarshan, D., Banerjee, A., Galloy, M., Fradet-Turcotte, A., Lambert, J.-P., Ranish, J. A., Côté, J., ja Nogales, E. (2024). Structural insights into the human NuA4/TIP60 acetyltransferase and chromatin remodeling complex. *Science*, 385(6711), eadl5816. <https://doi.org/10.1126/science.adl5816>

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

The *Saccharomyces* Genome Database. (n.d). <https://www.yeastgenome.org/>. Vaadatud 03.04.2026

ExPASy ProtParam. (n.d). <https://web.expasy.org/protparam/>. Vaadatud 17.05.2026

AlphaFold Server. (n.d.). <https://alphafoldserver.com/>. Vaadatud 20.05.2026

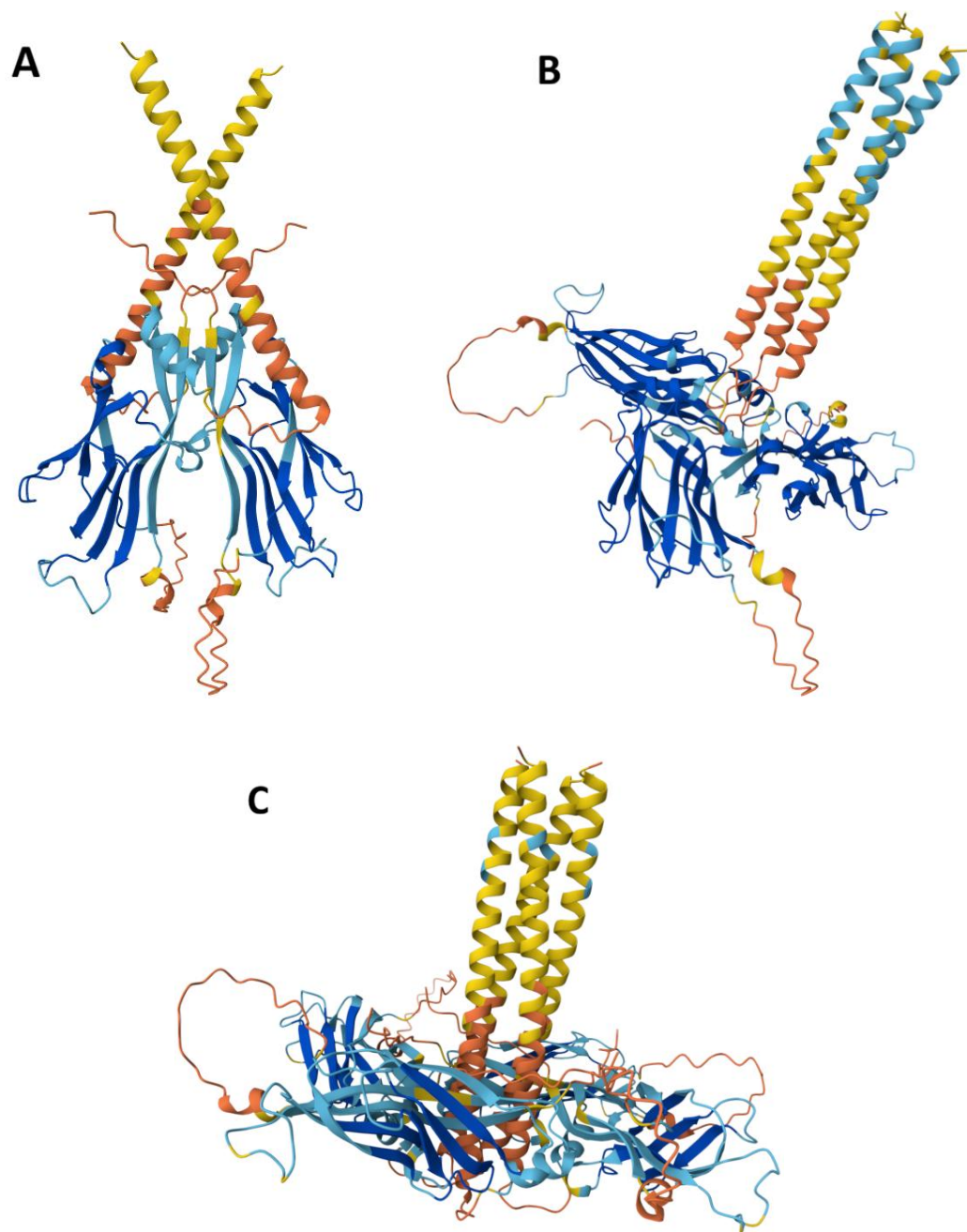
LISAD

LISA 1.

Tabel 1. Käesolevas töös kasutatud praimerite järjestused.

Praimeri nimetus	Järjestus
Yaf9_tag_F	TGAAGCAGAACTGGAAACTTGGTAAAACAAGAAGCCATTAACGGAAGTTC TAGAGGGGCGGTTCAC
Yaf9_tag_R	TGTATTACTATGGCTGTTATGAAAATACCGTTGTTCCGGGTGCAGTGATCCAGG AAACAGCTATGACCATG
Yaf9-tag-ctrl	GAACTGACTGAAACAGGGTGGGG
FBA1_ctrl_2	CGAACTCCAAAATGAGCTATC

LISA 2.



Joonis 1. AlphaFold3 programmiga koostatud struktuuriennustused mitme Yaf9 omavahelisest seondumisest. (A) Yaf9 homodimeerne struktuur. (B) Yaf9 homotrimeerne struktuur. (C) Yaf9 homotetrameerne struktuur. Oranž värv tähistab väga madalat 3D-struktuuri usaldusväärsust ($p\text{LDDT} < 50$), kollane madalat ($70 > p\text{LDDT} > 50$), helesinine kõrget ($90 > p\text{LDDT} > 70$) ja tumesinine väga kõrget struktuuri usaldusväärsust ($p\text{LDDT} > 90$). Struktuuriennustused on koostatud AlphaFold3 programmiga (Abramson *et al.*, 2024). (pLDDT — *predicted Local Distance Difference Test*)

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Paula Ojala,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Transkriptsiooni regulaatorvalgu Yaf9 NuA4- ja SWR1-sõltumatu homodimeriseerumine pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*)“, mille juhendaja on Signe Värvi, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Paula Ojala

25.05.2026