

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

**Mutantse YEATS-domeeniga Yaf<sup>9</sup> valgu konstrueerimine  
TurboID mudelsüsteemis pagaripärmis *Saccharomyces  
cerevisiae***

Bakalaureusetöö

12 EAP

Teia Friedenthal

Juhendajad: PhD Henel Jürgens  
Prof. Arnold Kristjuhan

TARTU 2025

# INFOLEHT

## **Mutantse YEATS-domeeniga Yaf9 valgu konstrueerimine TurboID mudelsüsteemis pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae***

YEATS-domeen on histoonide post-translatsiooniliste modifikatsioonide (PTM) lugejavalk. PTM-id on peamine mehhanism kromatiini pakkimisastme ja seeläbi geenide transkriptsiooni reguleerimisel (Mariño-Ramírez et al., 2005; Wood & Shilatifard, 2004). Üheks keskseks modifikatsiooniks on atsetüleerimine, mis suurendab DNA kättesaadavust transkriptsiooniks (Ito & Adcock, 2002). Käesolev töö keskendub pagaripärmi *Saccharomyces cerevisiae* Yaf9 valgu YEATS-domeenile, mis tunneb ära atsetüleerimise (Zhang et al., 2004). Töö eesmärk oli konstrueerida *S. cerevisiae* tüvi TurboID mudelsüsteemis, kus Yaf9 YEATS-domeen sisaldab punktmutatsioone H39A ja F46A, ning hinnata, kas selline valk pärmis ekspresseerub. Edasine analüüs mutatsioonide mõjust rakkude talitlusele võimaldaks paremini mõista Yaf9 YEATS-domeeni seondumisspetsiifikat ja funktsiooni transkriptsiooni regulatsioonis.

**Märksõnad:** Yaf9, YEATS, histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid, atsetüleerimine, TurboID

**CERCS kood:** B220 Geneetika, tsütogeneetika

## **Construction of a Yaf9 protein with a mutant YEATS domain in the TurboID modlsystem in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae***

The YEATS domain is a reader protein for post-translational modifications (PTMs) of histones. PTMs are a key mechanism for regulating chromatin packaging and, consequently, gene transcription (Mariño-Ramírez et al., 2005; Wood & Shilatifard, 2004). One of the main modifications is acetylation, which increases DNA accessibility for transcription (Ito & Adcock, 2002). This study focuses on the YEATS domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Yaf9 protein, which recognizes acetylation (Zhang et al., 2004). The aim of this work was to construct a *S. cerevisiae* strain using the TurboID modelsystem, in which the Yaf9 YEATS domain contains H39A and F46A pointmutations, and to evaluate whether such a protein is expressed in yeast. Further analysis of the mutation's impact on cellular function would provide deeper insight into the binding specificity and functional role of the Yaf9 YEATS domain in transcriptional regulation.

**Keywords:** Yaf9, YEATS, histone post-translational modifications, acetylation, TurboID

**CERCS code:** B220 Genetics, cytogenetics

# SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	9
1.1. Kromatiini struktuur .....	9
1.2. Histonide post-translatsioonilised modifikatsioonid .....	10
1.2.1. Histonide atsetüleerimine.....	11
1.3. Histooni modifikatsioonide lugejavalgud.....	12
1.3.1. YEATS-domeen.....	13
1.3.2. Yaf9 .....	14
1.4. TurboID mudelsüsteemi kirjeldus .....	15
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	17
2.1. Töö eesmärgid .....	17
2.2. Materjal ja meetodika.....	17
2.2.1. Kasutatud pärmitüved .....	17
2.2.2. Kasutatud söötmed.....	18
2.2.3. Kasutatud plasmiid .....	20
2.2.4. Kasutatud praimerid.....	20
2.2.5. Mutatsiooni sisaldavate DNA fragmentide sünteesimine.....	21
2.2.6. Agarosgeelelektrofees.....	21
2.2.7. PCR pika DNA fragmendi sünteesiks .....	21
2.2.8. Mutatsioone sisaldava plasmidi süntees .....	22
2.2.9. PCR-i transformatsioon bakterirakkudesse .....	22
2.2.10. Transformatsioonil saadud bakterikolooniate kontroll .....	23
2.2.11. Bakterist plasmidi eraldamine .....	23
2.2.12. Plasmidi transformeerimine pagaripärmi .....	24
2.2.13. Genoomse DNA eraldamine pärmirakkudest .....	24
2.2.14. Valkude immuunodetektsioon ( <i>Western blot</i> ) .....	25
2.2.15. Hõbevärvimise ( <i>silver staining</i> ) proovide ettevalmistus .....	27
2.2.16. Hõbevärvimine ( <i>silver staining</i> ) .....	28
2.3. Tulemused .....	29
2.3.1. YAF9 YEATS-domeeni H29A ja F46A mutatsioone sisaldava plasmidi konstrueerimine .....	29

2.3.2. <i>YAF9</i> YEATS-domeeni H29A ja F46A mutatsioone sisaldava pärmitüve konstrueerimine .....	33
2.3.3. Mutantse <i>Yaf9</i> YEATS-domeeni ekspressiooni kontrollimine .....	34
2.3.4. TurboID biotinüleerimise kontroll .....	35
2.4. Arutelu .....	37
KOKKUVÕTE .....	39
SUMMARY .....	40
TÄNUSÕNAD .....	42
KIRJANDUSE LOETELU .....	43
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	47
LISAD .....	48
LIHTLITSENTS .....	49

# KASUTATUD LÜHENDID

A -alaniin

AC – *acetyl* (atsetüülrühm)

*ade2* - *adenine biosynthesis 2 gene* (adenosiini biosünteesi geen 2)

ap – aluspaar

APS – ammoonium persulfaat

C-terminaalne / C-terminus – karboksü-terminaalne

DpnI - (*Deinococcus radiodurans*) *restriction enzyme I* (restriktsiooni ensüüm)

DTT – diteiotritool

F - fenüülalaniin

H1 – histoon H1

H2A – histoon H2A

H2A.Z / Htz1 – histoon H2A.Z / Htz1

H2B – histoon H2B

H3 – histoon H3

H4 – histoon H4

HAT – histooni atsetüültransferaas

HDAC – *histone deacetylase* (histooni deatsetülaasid)

H – histidiin

K – lüsiin

kDa – kilodalton

LB - *lysogeny broth*, bakterikultuuri sööde

LiOAc – liitiumatsetaat

MAT – *mating type locus* (paardumistüübi lookus)

NAT – *nourseothricin* N-atsetüültransferaas

nm – nanomeeter (

NuA4 – *nucleosomal acetyltransferase of H4* (H4 histooni atsetüültransferaas)

N-terminaalne / N-terminus – amino-terminaalne

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (polümeraasi ahelreaktsioon)

PDB – *Protein Data Bank* (proteiini andmebaas)

POI - *protein of interest* (huvipakkuv valk)

PL - *proximity labeling* (läheduspõhine märgistamine)

PTM - *post translational modifications* (post-translatsioonilised modifikatsioonid)

PVDF – *polyvinylidene difluoride*

R – arginiin

RPM – *revolutions per minute* (pöördeid minutis)

S – seriin

SDS – *sodium dodecyl sulfate* (naatriumdodetsüülsulfaat)

SWR1 – *SWI2/SNF2-Related 1* (kromatiini remodelleeriv kompleks)

T – treoniin

TAE - *Tris-Acetate-EDTA buffer* (Tris-atsetaat, EDTA)

TBS – *Tris-buffered saline* (Tris-iga puhverdatud soolalahus)

TBST – *Tris-buffered saline with Tween* (Tris-iga puhverdatud soolalahus koos Tween'iga)

TEMED – tetrametüületüleendiamiin

WT – *wild type* (metsiktüüpi)

YEATS – Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5 (valgudomeen, nimetatud valkude järgi, kus see esimesena tuvastati)

YPD – *yeast extract, peptone, dextrose* (pärmiekstrakti, peptooni ja dekstroosi sisaldav sööde)

# SISSEJUHATUS

Eukarüootsete rakkude DNA on seotud valkudega, moodustades nukleoproteiinse kompleksi, mida nimetatakse kromatiiniks. Kromatiini struktuuri põhielemendiks on nukleosoomid, mis koosnevad DNA-st ja histoonivalkudest (Quina et al., 2006). Histoonidel on keskne roll kromatiini struktuuri reguleerimisel, mis omakorda mõjutab DNA-l toimuvaid bioloogilisi protsesse nagu replikatsioon ja transkriptsioon. Neil valkudel on N-terminaalsed "sabad", mis ulatuvad nukleosoomist välja ja on kergesti ligipäätavad post-translatsioonilisteks modifikatsioonideks (PTM). Just need sabade modifikatsioonid on peamiseks mehhanismiks, millega reguleeritakse kromatiini pakkimisastet (Mariño-Ramírez et al., 2005; Wood & Shilatifard, 2004). Üheks põhiliseks modifikatsiooniks on atsetüleerimine, mis vähendab histoonide ja DNA omavahelist seotust ning selle läbi suurendab DNA kättesaadavust transkriptsiooni toimumiseks (Ito & Adcock, 2002).

Rakkudes on olemas kompleksid, millesse kuuluvad histooni "lugejavalgud", nende domeenid tunnevad ära spetsiifilisi histooni modifikatsioone (Cuvier & Fierz, 2017; Zhao et al., 2017). Üks sellistest domeenidest on YEATS-domeen, mis tunneb selektiivselt ära histoonide atsetüleerimise (Schulze et al., 2010). YEATS on saanud nime valkude järgi, milles see domeen esmakordselt avastati (Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5). Nendest kolm, Yaf9, Taf14 ja Sas5, esinevad ka pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* (Schulze et al., 2009). Antud töö keskendub Yaf9 valgu YEATS-domeenile, mis atsetüleeritud histoonidega seondudes osaleb transkriptsiooni reguleerimisel ning on vajalik Yaf9 valgu stabiilsuse jaoks (Zhang et al., 2004).

Käesolevas töös kasutati valkudevaheliste interaktsioonide uurimiseks TurboID mudelsüsteemi. Tegemist on biotiinligaasi ensüümil põhineva proksimaalsildistamise (PL) meetodiga, mille puhul huvipakkuva valgu (POI, *protein of interest*) küljes olev biotiini ligaas märgistab POI-ga otseselt interakteeruvaid või vahetusläheduses olevaid valke, mida on hiljem võimalik tuvastada massispektromeetria analüüsiga (Cho et al., 2020).

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida YEATS-domeeni seondusmisspetsiifikat ja selle funktsionaalsuse olulisust interaktsioonide moodustumisel. Selleks konstrueeriti *S. cerevisiae* tüvi TurboID mudelsüsteemis, kus Yaf9 valgu YEATS-domeen sisaldab mutatsioone, milles 39. positsioonis olev histidiin (H) ja 46. positsioonis olev fenüülalaniin (F) on muteeritudalaniiniks (A). Yaf9 YEATS-domeeni külge liidetud TurboID biotiini ligaas võimaldab hiljem kasutada läheduspõhist biotinüleerimist sellega seotud valgude tuvastamiseks. Mutantse YEATS-domeeni ja selle mõju uurimine rakusisesetele valkudevahelistele interaktsioonidele,

aitaks paremini mõista YEATS-domeeni võimalikku rolli veel teadmata rakuprotsessides osalemisel. Töö kirjanduse osas antakse ülevaade kromatiini struktuurist, histoonide modifitseerimisest ning ka spetsiifilisemalt atsetüleerimisest, YEATS-domeenidega pärmivalkudest ning täpsemalt ka Yaf9 valgust. Eksperimentaalses osas kirjeldatakse mutantse Yaf9 YEATS-domeeniga tüve konstrueerimist *S. cerevisiae*-s.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Kromatiini struktuur

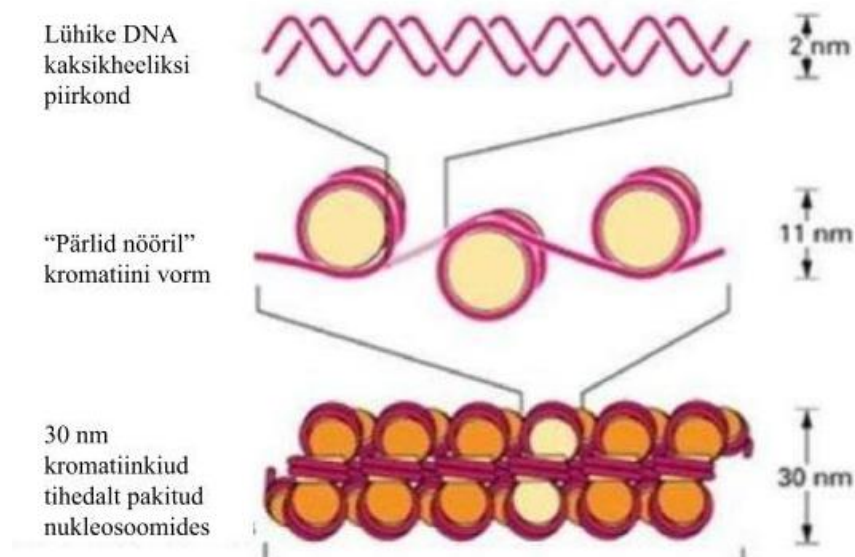
Eukariootsete rakkude DNA esineb nukleoproteiinide kompleksina, mida nimetatakse kromatiiniks. Kromatiini struktuuri põhiline element on nukleosoom. Nukleosoom koosneb umbes 147 DNA aluspaarist, mis on keerdunud ümber histooni oktameeride. Oktameerid sisaldavad tavaliselt kahes eksemplaris H2A, H2B, H3 ja H4 histoonmolekule. Iga üksik nukleosoom on ühendatud järgmisega väikeste linker-DNA segmentide abil (Quina et al., 2006).

Polünukleosoomide ahelaid on näha elektronmikroskoopia abil kui "pärlid nööri", kus nukleosoomid on nähtavad pärlitena ja nende vahel olev linker-DNA on nöör (Joonis 1) (Olins & Olins, 1974). Suurem osa kromatiinist on veel omakorda pakitud H1 linker-histoonide abil kondenseeritud 30-nm (nanomeeter) läbimõõduga nukleosoomide sisaldavaks fiibraks (joonis 1) (Allen, 2024).

Erinevad kromatiini struktuurid jagunevad tavaliselt eukromatiiniks ja heterokromatiiniks. Eukromatiin vastab üldiselt genoomi piirkondadele, kus asuvad aktiivselt transkribeeritavad geenid. Need piirkonnad on interfaasi ajal lahti pakitud ja on nukleaasidele ligipääsetavad (Arney & Fisher, 2004). Heterokromatiin seevastu on transkriptsiooniliselt mitteaktiivne ja tugevalt kokku pakitud genoomi piirkond (Arney & Fisher, 2004; Quina et al., 2006).

Histoonid on väga tähtsal kohal kromatiini struktuuris, vastutades nukleosoomide pakkimise eest. Iga histoon sisaldab histoonide voldikpiirkonda, mis koosneb kolmest  $\alpha$ -heeliksist, mis on ühendatud kahe silmusega, võimaldades histoonidevahelisi interaktsioone. Lisaks sisaldavad histoonid ka N-terminaalseid sabasid, mida on võimalik mõjutada läbi mitmesuguste post-translatsiooniliste modifikatsioonide (PTM), omades suurt rolli kromatiini kokku- ja lahtipakkimisel (Liu et al., 2017; Mariño-Ramírez et al., 2005).

Thomas ja Furber näitavad 1976 aastal tehtud uuringus, et pärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) kromatiini struktuur on väga sarnane teiste eukariootide kromatiiniga. Nendes on arginiinirikkad histoonid H3 ja H4 väga olulised struktuursed tegurid (Thomas & Furber, 1976).



**Joonis 1. Kromatiini struktuur.** Pildil on näha lõik DNA kaksikheeliksist, mis on DNA kõige vähem kondenseerunud struktuur. 147 bp pikkune DNA lõik keerdub histoonvalkude ümber, moodustades nukleosoomi ja luues "pärlid nõõril" 11 nm kromatiini struktuuri. Need moodustavad omakorda kõrgema pakkimise astme, 30 nm fiibri struktuuri (Liu et al., 2017, modifitseeritud).

## 1.2. Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid

Kromatiini ja selle koostises olevate nukleosoomide struktuur kontrollib nii DNA replikatsiooni kui ka geenide ekspressiooni. Selles on suur roll histoonidel. Histoonidele on iseloomulikud erineva pikkusega aminohapetest koosnevad N-terminaalsed sabad, mis ulatuvad nukleosoomist välja, võimaldades interaktsioone DNA või teiste valkudega. Nendes sabades toimuvad ulatuslikud PTM-id (Joonis 2.) (Mariño-Ramírez et al., 2005; Wood & Shilatifard, 2004). Läbi sabade PTM-ide saavad histoonid mõjutada transkriptsiooni aktiveerimist, vaigistamist ja DNA replikatsiooni. PTM-id on osa epigenoomist, mis hõlmab DNA ja sellega seotud valkude, nagu histoonide keemilisi muutusi. Epigeneetilised modifikatsioonid on geeniekspressiooni reguleerimise mehhanismid, mis mõjutavad kromatiini struktuuri ja funktsiooni, DNA järjestust muutmata (Mariño-Ramírez et al., 2005).

PTM-ide asukoht histoonides mõjutab nukleosoomi struktuurseid muutusi ehk kokku või lahti pakitud olekut (Simon et al., 2011). PTM-id reguleerivad seeläbi DNA kättesaadavust ja lõppkokkuvõttes DNA transkriptsiooni (Bowman & Poirier, 2015).

Kõige paremini uuritud modifikatsioonide hulka kuuluvad atsetüleerimine, metüleerimine, fosforüleerimine, ubikvitineerimine ja ADP-ribosüleerimine (Bowman & Poirier, 2015). PTM-

id histoonides on pööratavad protsessid (Ramazi et al., 2020). Kuigi PTM-ide tüüpe on palju, on nukleosoomis olulisel kohal atsetüleerimine ja metüleerimine. Histooni sabade atsetüleerimine suurendab transkriptsioonifaktorite ligipääsetavust DNAle (Bowman & Poirier, 2015; Wood & Shilatifard, 2004). Histoonte metüleerimine seevastu suurendab DNA ja histoonide omavahelist seotust, mis viib tihemini pakitud nukleosoomide moodustumiseni. Neid on raskem lahti keerata, mistõttu on ensüümidel keerulisem DNA-le ligipääseda, inhibeerides seeläbi protsesse nagu transkriptsioon (S. Li et al., 2022).



**Joonis 2. Histoone sabade posttranslatsioonilised modifikatsioonid (PTM).** Joonis annab visuaalse pildi histoonide sabadest ja aminohappete asukohtadest. Iga modifikatsiooni asukoht on kirjas mustana ning igas positsioonis muudetud aminohape on samuti välja toodud (K = lüsiin, R = arginiin, S = seriin, T = treoniin, Y = türosiin) (Ramazi et al., 2020).

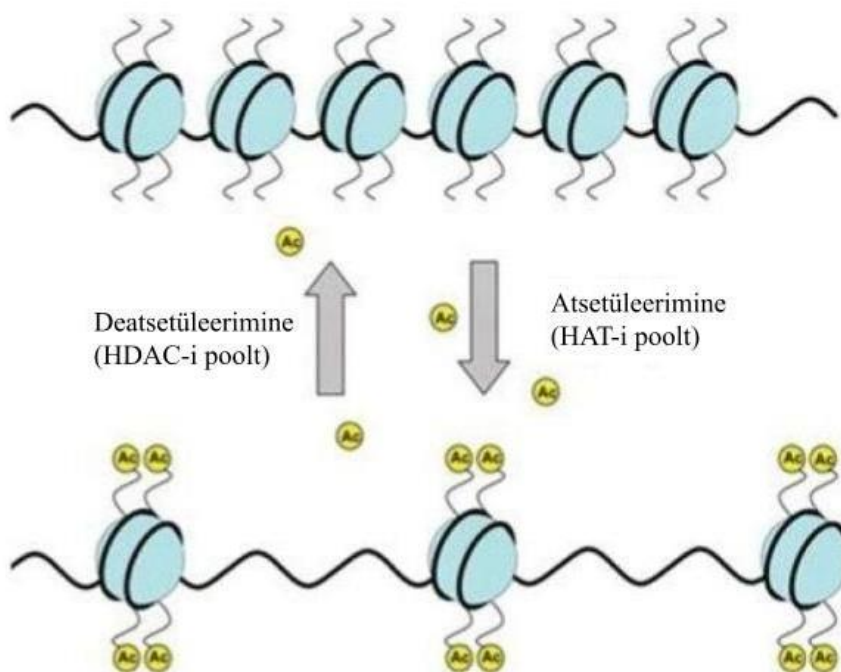
### 1.2.1. Histoonte atsetüleerimine

Geenide transkriptsiooni reguleerimine toimub osaliselt nukleosomaalse DNA lahtikeerumise kaudu. Selles protsessis mängib histoonide atsetüleerimine kesksel rollil. Kõigi nelja põhilise histooni (H2A, H2B, H3 ja H4) N-terminaalsete sabade lüsiinijäägid on atsetüleerimise sihtmärgiks (Kouzarides, 1999). Paljud tõendid viitavad, et atsetüleerimine on seotud transkriptsiooni aktiveerimisega mitmetes organismides ja rakutüüpides (Thorne et al., 1990). Histoonte atsetüleerimine neutraliseerib lüsiini positiivse laengu. See laengu muutus vähendab histoonide ja DNA seotust ning läbi selle suurendab DNA kättesaadavust transkriptsioonifaktorite ja muude valkude jaoks (joonis 3.) (Bowman ja Poirier, 2015; Ito ja Adcock, 2002; Wood ja Shilatifard, 2004). Vastupidiselt põhjustab histoonide hüpoatsetüleerimine DNA tihedamat kondenseerumist ja geenide transkriptsioonilise aktiivsuse vähenemist (Joonis 3.) (Ito ja Adcock, 2002).

Atsetüleerimist viivad läbi ensüümid, mida nimetatakse histooni atsetüültransferaasideks (HAT) ning histoonidelt atsetüülühmi eemaldavaid ensüüme deatsetülaasideks (HDAC) (Ramazi et al., 2020).

Histoonide atsetüleerimine soodustab ka nukleosoomi remodelleerimise faktorite (tuntud ka kui kromatiini remodelleerijad) sidumist. Nukleosoomi remodelleerimise faktorid on ATP-st sõltuvad ensüümid, mis võivad nukleosoomi nihutada, eemaldada või muuta nende vahelisi kaugusi, reguleerides nii spetsiifiliste DNA järjestuse kättesaadavust (Clapier et al., 2017).

Histoonide atsetüleerimise ja deatsetüleerimise tasemete analüüs rakus võimaldab saada ülevaate seal toimuvate protsesside aktiivsusest ning staadiumitest (Kouzarides, 1999).



**Joonis 3. Histoonide atsetüleerimine ja deatsetüleerimine.** Histooni atsetüültransferaasid (HAT-id) lisavad atsetüülühmi (Ac) histoonisabadetele, mis põhjustab nukleosoomi lahtipakkimise ning võimaldab transkriptsioonifaktoritel DNA-le ligi pääseda ja käivitada geenide transkriptsiooni. Histoonide deatsetülaasid (HDAC-id) eemaldavad Ac-rühmad histoonisabadelt, mis viib tihedamalt kokkupakitud kromatiini struktuuri tekkimiseni (Eslaminejad et al., 2013, modifitseeritud).

### 1.3. Histooni modifikatsioonide lugejavalgud

Histooni modifikatsioonid on üks olulisemaid epigeneetilisi mehhanisme, mis reguleerivad geenide ekspressiooni (S. Zhao et al., 2019). Mehhanismid, mille kaudu histooni PTM-id mõjutavad kromatiini struktuuri ja dünaamikat, saab üldiselt jagada kahte kategooriasse. Histooni PTM-id võivad otseselt mõjutada histoon-DNA ja histoon-histoon interaktsioone või

olla sihtmärgiks valgulistele efektoritele (Musselman et al., 2012). Tihti kasutatakse nende kohta termineid "kirjutaja", "kustutaja" ja "lugeja", et kirjeldada valke, mis vastavalt lisavad, eemaldavad ja tunnevad ära PTM-e (Musselman et al., 2012). Neist viimaseid nimetatakse histooni „lugejavalkudeks“, need tunnevad ära histooni modifikatsioonid (S. Zhao et al., 2019).

Ensüümikompleksid, mis toimivad kromatiinil, võivad sisaldada mitut erinevat lugejavalku, kus igaüks on suunatud konkreetsele histooni modifikatsioonile, võimaldades mitmetasandilist reguleerimist (Andrews et al., 2016). Mitmed uuringud näitavad, et epigeneetiliste märgiste valesti lugemine on aluseks paljudele haigustele, sealhulgas arenguhäiretele ning vähile (Musselman et al., 2012).

Lugejavalgud tunnevad ära spetsiifilisi PTM-e ning vahendavad läbi selle vajalike ensüümide ja valgukomplekside seondumist kromatiinile, reguleerides nii elutähtsaid protsesse nagu geeni transkriptsioon, DNA replikatsioon ja rekombinatsioon (Musselman et al., 2012; D. Zhao et al., 2017).

Histooni modifikatsioonide lugemiseks on olemas erinevat tüüpi lugejadomeenid. Näiteks metüleeritud histooni lüsiinijääke tunnevad ära domeenid nagu kromodomeen ja tudor domeen samas kui atsetüülitud lüsiinid tunnevad ära näiteks bromodomeenid ja YEATS-domeenid (Scheid et al., 2021).

### **1.3.1. YEATS-domeen**

Kromatiini modifitseerivate komplekside valgud sisaldavad tavaliselt kindlaid domeene, mis on kas katalüütiliselt aktiivsed või mis tunnevad ära ja seonduvad spetsiifiliste histooni modifikatsioonidega, nagu atsetüleerimine, metüleerimine ja fosforüleerimine (Schulze et al., 2010). Üks neist domeenidest on YEATS-domeen, mis on saanud nime valkude järgi, kus see esmakordselt avastati (Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5) (Schulze et al., 2009). Kõik need valgud, kuuludes mitme kromatiini remodelleerimise, histoonide modifitseerimise või transkriptsioonikompleksi, on seotud geeniregulatsiooniga (X. Li et al., 2023).

Seda evolutsiooniliselt konserveerunud YEATS-domeeni leidub mitmesugustes kompleksides alates pärmist kuni inimeseni (Schulze et al., 2010). See valkude perekond hõlmab üle 100 liikme. *Saccharomyces cerevisiae*'s sisaldavad YEATS-domeeni kolm valku Yaf9, Taf14 ja Sas5 ning inimestel on kõige olulisemad GAS41, ENL ja AF9 (Schulze et al., 2009)

YEATS on lugejadomeen, mis tunneb selektiivselt ära histoonide lüsiini atsüülimise. Pärmivalgu Yaf9 YEATS-domeen seondub atsetüleeritud lüsiinijääkidega histoonidel eelistades

atsetüleeritud H3 K27 jääki, hõlbustades seeläbi NuA4 ja SWR1 komplekside suunamist kindlatesse kromatiini piirkondadesse DNA parandamise või transkriptsiooni ajal. Selle läbi oleks YEATS domeen ka vajalik histoonide atsetüleerimise protsessi toimimise jaoks (Klein et al., 2018; Schulze et al., 2010).

YEATS-domeen koosneb 8 vastassuunalisest  $\beta$ (beeta)-lehest, mille ühte otsa katab 2 lühikest  $\alpha$ (alpha)-heeliksit (Wang et al., 2009). Selleks, et määrata YEATS-domeeni tähtsust pärmirakkudes, kasutasid Zhang jt (2004) tüvesid, millel esinesid erinevad kolme YEATS-domeeni sisaldava valgu (Yaf9, Sas5 ja Taf14) nullmutatsioonide kombinatsioonid. Kuigi ükski neist valkudest ei osutunud eraldi eluks hädavajalikuks, näitasid tüved, milles puudusid kaks kolmest valgust, vähenenud kasvuvõimet ning tüvi, milles puudusid kõik kolm, oli eluvõimetu. Need tulemused kinnitavad, et YEATS-domeeniga valgud on pärmirakkude elutegevuseks olulised (Zhang et al., 2004).

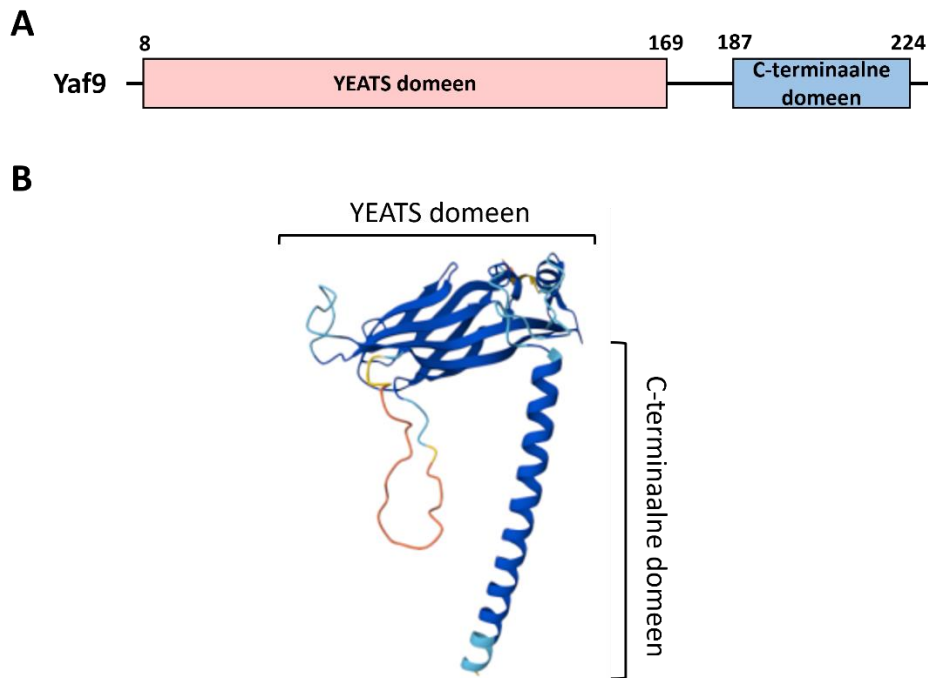
### **1.3.2. Yaf9**

Yaf9 on üks kolmest punguvas pärmis leiduvast valgust, mis sisaldab YEATS domeeni (Le Masson et al., 2003). YEATS domeen asub Yaf9 N-terminaalses sabas (Joonis 4A, B) (Klein et al., 2018). Yaf9 kuulub kahe valgukompleksi koosseisu. NuA4, mis viib läbi histoonide atsetüleerimist ja SWR1 kompleksi, mis osaleb kromatiini ümberkujundamises, vahetades kromatiinis H2A histooni H2A.Z (Htz1 pärmis) variandi vastu (Schulze et al., 2009; Wang et al., 2009).

Htz1-l on rollid mitmesugustes protsessides, sealhulgas transkriptsioonilise regulatsiooni ja DNA kahjustuse vastuse korral (Schulze et al., 2010). Yaf9 on oluline Htz1 kromatiini paigutamiseks ja atsetüleerimiseks ning seega korrektseks DNA paranduseks ja metabolismiks (Wang et al., 2009).

Yaf9 deletsiooniga tüvedel on vähenenud telomeeri läheduses paiknevate geenide ekspressioon ja tundlikkus DNA-d kahjustavate ainete ning stressi tekitavate tingimuste, nagu külm ja kofeiin, suhtes. Näiteks oli Yaf9 deleteerimisel rakk eluvõimeline, kuid ei suutnud kasvada 15°C juures (Zhang et al., 2004).

Samuti on Yaf9 täielikuks funktsioneerimiseks vajalik YEATS-domeen. Yaf9, millelt oli eemaldatud YEATS-domeen, oli ebastabiilne ja peaaegu mitte tuvastatav immunoblottimise analüüsiga (Zhang et al., 2004).



**Joonis 4. Yaf9 valgu ehitus.** A. Yaf9 valgu skeem. On näidatud YEATS domeeni (roosa) ja C-terminaalse domeeni (sinine) asukohad. Numbrid tähistavad aminohappejääke. B. Yaf9 valgu struktuur. Tähistatud YEATS domeen ja C-terminaalne domeen (*AlphaFold Protein Structure Database*, <https://alphafold.ebi.ac.uk/>; PDB ID: P53930)

## 1.4. TurboID mudelsüsteemi kirjeldus

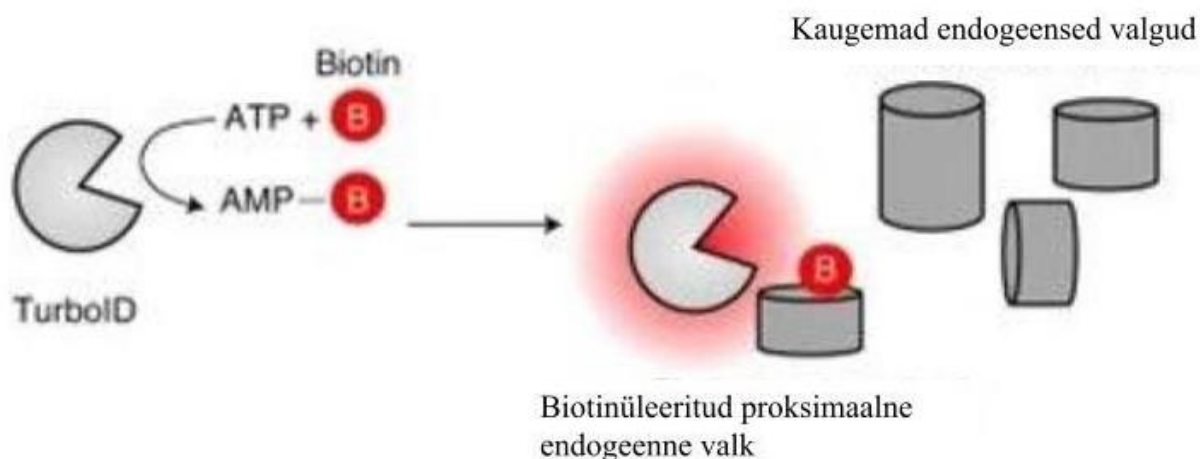
Valk- Valk interaktsioonid, olles ajutised või stabiilsete komplekside osana, on enamikus raku protsessides ja bioloogilistes radades võtmetähtsusega (Larochelle et al., 2019).

Ruumiline rakusisene jaotus on evolutsiooni käigus kujunenud oluliseks organiseerimispõhimõtteks, mis reguleerib erinevaid molekulaarseid komplekse ja bioloogilisi protsesse elusrakkudes. Teadmised biomolekulide rakusisesest paiknemisest ning selle järgi lähiumbruses paiknevate ja interakteeruvate valkude tuvastamine ning omaduste analüüsimine aitab määratleda nende funktsiooni ja tähtsust raku. Seetõttu on raku protsesside mõistmise jaoks väga tähtsal kohal meetodid, mis aitavad kindlaks teha spetsiifilise sihtmärgi asukohta ja ümbrust (Cho et al., 2020).

Ensüüm-katalüüsitud läheduspõhine märgistamine (*proximal labelling* PL) on üks meetod valkude paiknemise ja interaktsioonide uurimiseks elusrakkudes (Branon et al., 2018). PL on meetod, mis võimaldab valida huvipakkuv valk (POI, *protein of interest*) ja märgistada valke, mis sellega otseselt interakteeruvad ning ka neid, mis selle läheduses asuvad. PL-süsteemis kasutatakse märgistamiseks mittespetsiifilisi ensüüme, mis kinnitatakse valitud POI või rakusisese ala (näiteks nagu mitokondri sisemembraani vaheline ruum) markervalgu külge. PL

ensüüm vahendab rakus inaktiivse substraadi (näiteks nagu biotiin) muutmist lühiealiseks ja reaktiivseks aineks, mis ensüümist vabanedes märgistab juhuslikul ja mittespetsiifilisel viisil läheduses olevaid biomolekule nagu valgud, RNA või DNA (Joonis 5.) (Cho et al., 2020; Xu et al., 2021). Märgistatud organelli või kompleksi saab seejärel puhastada ning tulemusi analüüsida massispektromeetria abil (Guo et al., 2023). PL toimub elusrakkudes, mis tähendab, et uurimiseks säilivad biomolekulid ja nende interaktsioonid nende loomulikus olekus (Cho et al., 2020).

Üldiselt võib PL-meetodid jagada peroksüdaasiga seotud meetoditeks ja biotiini ligaasiga seotud meetoditeks. Mõlemal esinevad puudused nagu peroksüdaasi keemiliste ühendite kasutamine, millel on piiratud rakumembraani läbitavus või kõrge toksilisus. Biotiini ligaasi kasutamisel tekib vajadus üle 18 tunni kestva märgistamisaja järele (Cho et al., 2020). Olemasolevate meetodite probleemide ületamiseks konstrueeriti uus biotiini ligaasi PL-ensüümide paar – TurboID ja miniTurbo (Branon et al., 2018; Guo et al., 2023). Neil kahel ensüümil on kiirem märgistamisaeg kui varasematel biotiini ligaasidel, samas säilitavad nad biotiini ligaaside mittetoksilised omadused. Lisaks lühemale vajaminevale märgistamisajale on TurboID ja miniTurbo aktiivne ka madalamal temperatuuril, võimaldades PL-i sellistes organismides nagu kärbsed, ussid, pärmid ja taimed, mida kasvatatakse temperatuuril alla 37 °C (Branon et al., 2018).



**Joonis 5. TurboID tööpõhimõte.** TurboID kasutab ATP-d ja biotiini, et moodustada biotiin–5'-AMP, reaktiivne vaheühend, mis suudab kovalentselt märgistada läheduses asuvaid endogeenseid valke (Cho et al., 2020, modifitseeritud).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

YEATS-domeen on kõrgelt konserveerunud "lugejadomeen", mis on võimeline ära tundma spetsiifilisi histoonide post-translatsioonilisi modifikatsioone ning suunata seeläbi kromatiini modifitseerivad kompleksid õigetesse genoomipiirkondadesse. See muudab YEATS-domeeni oluliseks kromatiini struktuuri ja transkriptsiooni dünaamilise reguleerimise seisukohalt. Siiski on YEATS-domeeni seondumisspetsiifilisuse ja geeniekspressiooni regulatsiooni funktsiooni kohta endiselt vähe teada. Selgitamaks, kas YEATS-domeen on võimeline lisaks histoonide modifikatsioonidele seonduma ka teiste valkude ja neil esinevate modifikatsioonidega ning määrata, kas YEATS domeeni funktsionaalsus on selleks oluline, seati antud töö eesmärgiks konstrueerida TurboID mudelsüsteemis mutatsioone sisaldava Yaf9 YEATS-domeeniga pärmitüvi, mida saaks kasutada Yaf9 YEATS-domeeni edasisel uurimisel tuvastades läheduspõhise biotinüleerimisega sellega seonduvad valgud. Selleks teostati järgnev katsete skeem:

1. Plasmidi konstrueerimine, mis sisaldaks TurboID mudelsüsteemis *YAF9* YEATS domeeni 39. positsioonis oleva histidiini (H) ja 46. positsioonis oleva fenüülalaniini (F) mutatsioonialaniiniks (A).
2. Uue pagaripärmi tüve konstrueerimine, mis sisaldaks mainitud *YAF9* YEATS-domeeni mutatsioone H39A ja F46A.
3. Mutatsioone sisaldava Yaf9 valgu ekspressiooni kontrollimine pagaripärmis *Western blot* meetodil.
4. TurboID biotinüleerimise kontrollimine mutatsioone sisaldavas Yaf9 pärmitüves hõbevärvimise (*silver staining*) meetodiga.

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1. Kasutatud pärmitüved

Kõik töös kasutatud ja valmistatud pagaripärmi tüved baseeruvad W303 tüvel (Tabel 1). Kõikide tüvede paardumistüüp on MATa. AKY367 on W303-põhine tüvi, millel on *RPB3*

geeni kodeeriva ala lõpus 3x1E2-tag ja markergeeni (HIS5) järjestus. AKY2622 on antud töö metsiktüüpi tüvi, mida kasutati positiivse kontrollina. Selles tüves on *YAF9* YEATS-domeeni ees galaktoosiga indutseeritav promootor ja YEATS-domeeni C-terminuses TurboID valk, mille järel 3xFLAG-tag. AKY2626 ja AKY2657 on kontrolltüved. AKY2626 omab ainult galaktoosi promootorit *ADE2* lookuses ning AKY2657 galaktoosi promootori all olevat TurboID valku. AKY367 põhjal konstrueeriti töö käigus tüvi AKY2681, mis sisaldab *ADE2* lookuses lisaks galaktoosi promootorile ja TurboID biotiini ligaasile, *YAF9* YEATS domeeni, kus 39. positsioonis olev histidiin (H) ja 46. positsioonis olev fenüülalaniin (F) on muteeritudalaniiniks (A).

**Tabel 1. Kasutatud pärmitüvede genotüüp ja päritolu.**

Tüvi	Genotüüp	Päritolu
W303	W303, <i>MAT A, ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 ade2-101 can1-100, lys2</i>	
AKY367	W303, <i>Rpb3-3x1E2::HIS5</i>	Kersti Kristjuhan
AKY2622	W303, <i>Rpb3-3x1E2::HIS5, ade2::GAL-YAF9-YEATS-TurboID-3xFLAG-ADE2</i>	Henel Jürgens
AKY2626	W303, <i>Rpb3-3x1E2::HIS5, ade2::GAL-3xFLAG-ADE2</i>	Henel Jürgens
AKY2657	W303, <i>Rpb3-3x1E2::HIS5, ade2::GAL-TurboID-3xFLAG-ADE2</i>	Henel Jürgens
AKY2681	W303, <i>Rpb3-3x1E2::HIS5, ade2::GAL-YAF9-YEATS-H39A,F46A-TurboID-3xFLAG-ADE2</i>	Valminud käesoleva töö käigus

## 2.2.2. Kasutatud söötmed

Järgnevas tabelis (Tabel 2) on kõik töös kasutatud söötmed ja nende koostised. Pärmitüvede kasvatamiseks kasutati YPD (*yeast extract, peptone, dextrose*) tard- ja vedelsöötmeid. Pärmirakke kasvatati 30 °C juures, vedelkultuure aereeriti loksutil 200 rpm juures. Selektiivsöötmena kasutati minimaalsöödet, milles puudus aminohape adeniin (-ADE tardsööde). Töös kasutatud *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) kasvatamiseks kasutati LB (*lysogeny broth*) tard- ja

vedelsöödet, kuhu oli lisatud ampitsilliini (100 µg/ml). Rakke kasvatati 37 °C juures, vedelkultuuri aereeriti loksutil 180 rpm juures.

**Tabel 2. Kasutatud söötmed ja nende koostised.**

<b>Sööde</b>	<b>Koostis</b>
YPD vedelsööde	10g/l pärmiekstrakt; 20 g/l mükoloogiline pepton; 20 g/l glükoos; deioniseeritud vesi. Galaktoosi või rafinoosi sisaldavale söötmele lisati vastavalt 20 g/l lahust.
YPD tardsööde	20 g/l agar; 10g/l pärmiekstrakt; 20 g/l mükoloogiline pepton; 20 g/l glükoos; deioniseeritud vesi.
-ADE tardsööde	Agar 20 g/l; 10 g/l pärmiekstrakt; 20 g/l glükoos; aminohapped: lüsiin 0,08 g/l, leutsiin 0,08 g/l, trüptofaan 0,08 g/l, uratsiil 0,2 g/l, histidiin 0,08 g/l; vesi
LB vedelsööde	10 g/l trüptooni; 5 g/l pärmiekstrakti; 10 g/l NaCl ja 100 µg/ml ampitsilliini.
LB tardsööde	20 g/l agarit; 10 g/l trüptooni; 5 g/l pärmiekstrakti; 10 g/l NaCl ja 100 µg/ml ampitsilliini.

### 2.2.3. Kasutatud plasmiid

Galaktoosi promootori kontrolli all oleva *YAF9* YEATS-domeeni 39. ja 46. positsioonis olevaid mutatsioone ja TurboID-d sisaldava plasmidi konstrueerimiseks kasutati pBlueScript-ADE2\_GAL-YAF9-YEATS-TurboID-3xFLAG plasmidi Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi rakubioloogia õppetooli kolleksioonist. Antud plasmid sisaldab metsiktüüpi *YAF9* YEATS domeeni, mille ees galaktoosiga indutseeritav promootor ja järel TurboID biotiin ligaas ning 3xFLAG epitoop. Plasmidi kaart on välja toodud Lisas 1.

### 2.2.4. Kasutatud praimerid

Järgnevas tabelis (Tabel 3) on välja toodud kõik töös kasutatud praimerid ja nende järjestused.

**Tabel 3. Kasutatud praimerid ja nende järjestused.**

Praimeri nimi	Järjestus
GALprom-end-F	5' AATGGAAAAGCTGCATAACCACTT 3'
Y9-YEATS-H39A-F46A-R	5' TCCTGCCGAAGCTACTCATTATGGACAATTGCTGTCA GGGGCCCA 3'
Y9-YEATS-H39A-F46A-F	5' TGGGCCCTGACAGCAATTGTCCATAAATGAGTAGCT TCGGCAGGA 3'
TurboID-ALG-R	5' TCAGAGGCACAGTATTGTCTTTTGA 3'

### 2.2.5. Mutatsiooni sisaldavate DNA fragmentide sünteesimine

YAF9 YEATS-domeeni H39A ja F46A mutatsioonidega plasmidi konstrueerimist alustati mutatsiooni sisaldavate DNA fragmentide sünteesimisest. Selle jaoks valmistati kahe eri praimerite kombinatsiooniga PCR-i proovid. Ühes proovis GALprom-end-F ja Y9-YEATS-H39A-F46A-R ning teises Y9-YEATS-H39A-F46A-F ja TurboID-ALG-R praimereid. Mõlema PCR proovi reaktsioonimaht oli 25 µl. Ühes (proov 1.) oli 1 µl GALprom\_end-F ja 1 µl Y9-YEATS-H39A-F46A R ning teises (proov 2.) oli 1 µl Y9-YEATS-H39A-F46A-F ja 1 µl TurboID-ALG-R praimereid (10 µmol/µl). Mõlemad proovid sisaldasid 2 µl pBlueScript-ADE2\_GAL-YAF9-YEATS-TurboID-3xFLAG (20 ng/µl) plasmidi (pilt lisas 1.) 5 µl HF Phusion puhvrit (5x *Thermo Scientific Phusion Green GC Buffer*), 2.5 µl dNTP segu (2mM 10x *Thermo Scientific dNTP Mix*), 1 µl DMSO-t, 0.25 µl polümeraasi (*Thermo Scientific Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (2 U/µL) ja lõpp-mahuni MQ vett.

Reaktsiooni jaoks kasutati järgmist programmi: eeldenaturatsioon 5 min, 98 °C; teine etapp 32 tsükli: denaturatsioon 30 sek, 98 °C; praimerite seondumine 30 sek, 60 °C; süntees 2 min, 72 °C. Järelsüntees 7 min, 72 °C. PCR viidi läbi SimpliAmp™ Thermal Cycler masinaga.

### 2.2.6. Agaroosgeelelektrofees

Mõlema proovi PCR produkte kontrolliti agaroos-geelelektroforeesiga. Selleks valmistati 1%-line agaroosgeel, mille tegemiseks kasutati 1x TAE puhvrit (pH 8; 40 mM Tris; 20 mM atsetaat; 1 mM EDTA), vastav kogus agaroosi ja etiidiumbromiidi (0,5µg/ml). Geelile pipeteeriti 5 µl mõlemast PCR proovist ja 3.5 µl 1 kb markerit (1 kb *Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). Kontrollitud PCR produktid eraldati agaroosgeelist kasutades *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kiti* vastavalt tootja (*Favorgen*) juhendile.

### 2.2.7. PCR pika DNA fragmendi sünteesiks

Kahte eelnevat PCR-ide käigus sünteesitud ja geelist eraldatud DNA fragmenti, mis sisaldasid soovitud mutatsioone, kasutati selleks, et sünteesida pikem DNA järjestus, mida edasises *overlap extension* PCR reaktsioonis kasutati praimerina. Antud PCR-i reaktsioonimaht oli 50 µl. See sisaldas 1.5 µl GALprom\_end-F ja 1.5 µl TurboID-ALG-R praimerit (10 µmol/µl), 0.5 µl DNA-d proovist 1. ja 1 µl proovist 2. 10 µl HF Phusion puhvrit (5x *Thermo Scientific Phusion Green GC Buffer*), 5 µl dNTP segu (2mM 10x *Thermo Scientific dNTP Mix*), 1.5 µl

DMSO-t, 0.5 µl polümeraasi (*Thermo Scientific Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (2 U/µL) ja lõpp-mahuni MQ vett. PCR viidi läbi SimpliAmp™ Thermal Cyclers masinaga.

Reaktsiooni jaoks kasutati järgmist programmi: eeldenaturatsioon 5 min, 98 °C; teine etapp 32 tsüklit: denaturatsioon 30 sek, 98 °C; praimerite seondumine 30 sek, 60 °C; süntees 2 min, 72 °C. Järelsüntees 7 min, 72 °C.

PCR-il tekkinud produktid kontrolliti geelelektrofeesiga ja eraldati agarosgeelist kasutades *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kiti* vastavalt tootja juhendile.

### **2.2.8. Mutatsioone sisaldava plasmidi süntees**

Viimaks sooritati *overlap extension* PCR, kus kasutati eelnevates PCR-ides valmistatud YAF9 YEATS-domeeni H39A ja F46A mutatsioone sisaldavat DNA fragmenti praimerina, et sünteesida pBlueScript-ADE2\_GAL-YAF9-YEATS-TurboID-3xFLAG plasmiidilt uus, soovitud mutatsioone sisaldav plasmid.

Reaktsioonimaht oli 50 µl, mis sisaldas 2 µl pBlueScript-ADE2\_GAL-YAF9-YEATS-TurboID-3xFLAG (20 ng/µl) plasmidi. 5 µl pikka DNA fragmenti (praimer) (10 µmol/µl) eelmisest PCR protsessist. 10 µl HF Phusion puhvrit (5x *Thermo Scientific Phusion Green GC Buffer*), 5 µl dNTP segu (2mM 10x *Thermo Scientific dNTP Mix*), 1.5 µl DMSO-t, 0.5 µl polümeraasi (*Thermo Scientific Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (2 U/µL) ja lõpp-mahuni MQ vett.

Reaktsiooni jaoks kasutati järgmist programmi SimpliAmp™ Thermal Cyclers masinaga: eeldenaturatsioon 5 min, 98 °C; teine etapp 32 tsüklit: denaturatsioon 30 sek, 98 °C; praimerite seondumine 30 sek, 60 °C; süntees 2 min, 72 °C. Järelsüntees 7 min, 72 °C.

Seejärel töödeldi 20 µl PCR segu 2 µl DpnI restriктаasiga (*Thermo Scientific*, 10 U/µL) ja hoiti üleöö 37°C kapis.

### **2.2.9. PCR-i transformatsioon bakterirakkudesse**

DpnI restriктаasiga (*Thermo Scientific*, 10 U/µL) töödeldud PCR-i bakterirakkudesse transformeerimiseks lisati 5 µl PCR segusse 50 µl kompetentseid *E. coli* DH5α rakke. Saadud segu pandi 5 minutiks jääle siis tehti kuumašokk 1 minut 37°C juures ning pandi veel korraks jääle enne kui lisati rakkudele 1 ml LB söödet. Koos söötmega pandi rakud loksuma 37°C termostaati üheks tunniks ning saadud lahus fuugiti 6000 rpm 1 minut, et eemaldada liigne

sööde. Alles jäeti umbes 100 µl, mis külvati soojadele LB Amp tassidele, mis läksid seejärel tagasi 37°C kappi kasvama.

### **2.2.10. Transformatsioonil saadud bakterikolooniate kontroll**

Bakterikolooniaid kontrolliti AluI restriksiooni abil. Selle jaoks sooritati uus PCR Amp tassidel üles kasvanud bakterikolooniatega. Reaktsioonimaht oli 10 µl. Lisati 2 µl PCR *mix*-i (5x *FirePol Master Mix*, 12,5 mM *MgCl<sub>2</sub>*, *SolisBiodyne*), 0.25 µl GAL\_prom\_end\_F ja 0.25 µl TurboID-ALG-R praimerid (20 ng/µl) ning siis lõpp-mahuni MQ vett.

PCR viidi läbi *SimpliAmp™ Thermal Cycler* masinaga kasutades programmi: eeldenaturatsioon 5 min, 95 °C; teine etapp 30 tsüklit: denaturatsioon 30 sek, 95 °C; praimerite seondumine 30 sek, 58 °C; süntees 1 min, 72 °C. Järelsüntees 7 min, 72 °C.

Pärast protsessi lõppu töödeldi 5 µl PCR reaktsioonisegu 0.3 µl AluI ensüümi (*Thermo Scientific*, 10 U/µL), 1 µl 10x Tango puhvri (10X *Thermo Scientific Tango Buffer with BSA*) ja 3.7 µl MQ veega. Lahust hoiti 37 °C kapis umbes 1.5 tundi. Saadud lahust kontrolliti geelelektrofoeesiga.

### **2.2.11. Bakterist plasmidi eraldamine**

PCR-analüüsiga õigeaks osutunud bakterikoloonia kasvatati, lisades see 2 ml LB söötmesse koos 2 µl ampitsilliiniga (100 µg/ml). Segu inkubeeriti u 8h 30 °C ja 180 rpm juures *New Brunswick Scientific Excella E25 Incubator Shaker Series* loksutis. 17 tundi hiljem kasutati bakterist plasmidi eraldamiseks *FavorPrep™ Mini Plasmid DNA Extraction Kit*-i vastavalt tootjapoolsetele (*Favorgen*) juhistele.

Plasmidi kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, *Thermo Scientific*). Kontsentratsioon oli 297.8 ng/µl. Eraldatud proovidest saadud plasmiid saadeti sekveneerimisele Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse. Bakteritüvedest, mis sisaldasid korrektse mutatsiooniga plasmidi eraldati uuesti suurem kogus plasmidi *FavorPrep™ Midi Plasmid DNA Extraction Kit*-iga vastavalt tootja (*Favorgen*) juhendile. Saadud plasmidi kontsentratsioon määrati NanoDrop süsteemiga (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, *Thermo Scientific*).

### 2.2.12. Plasmidi transformeerimine pagaripärmi

Enne transformeerimist lõigati plasmidi AflIII/BspTI ensüümiga (*Thermo Scientific BspTI restriction enzyme* 10 U/ $\mu$ L), mille lõikekoht on *ADE2* markergeeni keskel. Selle jaoks segati kokku reaktsioonisegu kogumahuga 30  $\mu$ l. See sisaldas 5  $\mu$ l plasmidset DNA-d (4  $\mu$ l), 3  $\mu$ l *Orange* puhvrit (*Thermo Scientific 10X Buffer O*), 2  $\mu$ l AflIII ensüümi (*Thermo Scientific*, 10 U/ $\mu$ L) ja 20  $\mu$ l MQ vett. Reaktsiooni inkubeeriti üleöö 37°C juures.

Plasmidi transformatsiooniks pärmirakkudesse kasutati LiOAc meetodit. Protseduuri alustuseks koguti 2 ml üleöö 2% glükoosi sisaldavas YPD vedelsöötmes kasvatatud rakud (AKY367). Rakke tsentrifugeeriti 5000 rpm juures 3 minutit. Sööde eemaldati ja rakkudele lisati 500  $\mu$ l LiOAc+TE (0.1 M LiOAc + 1x TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; 1 mM EDTA)) lahust, enne kui neid jälle tsentrifugeeriti. Vedelik eemaldati ja rakkudele lisati 40  $\mu$ l LiOAc+TE lahust, millele oli lisatud 7  $\mu$ l *carrier* DNA-d, mis oli eelnevalt 6 minutit 95°C juures denatureeritud ja jääl jahutatud. Seejärel valmistati transformatsioonisegu, kombineerides 50  $\mu$ l kompetentseid pärmirakke ja 20  $\mu$ l (~500 ng) plasmidset DNA-d. Segu inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit, seejärel lisati 300  $\mu$ l LiOAc+TE+PEG (0.1 M LiOAc + 1x TE + 40% PEG) lahust. Proovi segati ja inkubeeriti toatemperatuuril 15 minutit. Seejärel lisati 30  $\mu$ l DMSO-d ja segati. Rakkudele tehti seejärel kuumašokk 42°C juures 10 minutit, tsentrifugeeriti 3000 rpm juures 3 minutit ja vedelik eemaldati. Rakkudele lisati 150  $\mu$ l MQ vett ja külvati -ADE selektiivtassidele, mis inkubeeriti 30°C juures.

### 2.2.13. Genoomse DNA eraldamine pärmirakkudest

Selektiivtassidel ülesse kasvanud kolooniatest eraldati DNA ning *YAF9* mutatsioone kontrolliti PCR meetodil. Selleks kanti steriilse puutikuga pärmikolooniast rakke 100  $\mu$ l 1% SDS (naatriumdodetsüülsulfaat) + 0,2 M LiOAc lüüsilahusesse. See segati vortexil (*Scientific Industries Vortex-Genie 2*) ning pandi seejärel 10 minutiks 70 °C termostaati. Pärast seda lisati 300  $\mu$ l EtOH ja tsentrifugeeriti 5 min 10000 rpm juures. Sellest alles jäänud vedelik eemaldati ja sade pandi kuivama 20 minutiks 42 °C termostaati. Seejärel sade lahustati 100  $\mu$ l-s TE-s ning eraldatud DNAGA tehti kontroll PCR.

PCR viidi läbi SimpliAmp™ *Thermal Cycler* masinaga kasutades programmi: eeldenaturatsioon 5 min, 95 °C; teine etapp 30 tsüklit: denaturatsioon 30 sek, 95 °C; praimerite seondumine 30 sek, 58 °C; süntees 1 min, 72 °C. Järelsüntees 7 min, 72 °C.

Reaktsioonisegu oli 10 µl, mis sisaldas 2 µl 5x FirePol PCR mix-i ning kahte eri praimerit. GALprom-end-F ja TurboID-ALG-R mõlemat 0.25 µl (10 µmol/µl). Juurde pandi ka 6.5 µl mQ vett. Saadud PCR-i produktiga sooritati geelelektroforees tulemuste kontrollimiseks.

#### 2.2.14. Valkude immuunodetektsioon (*Western blot*)

Rakulüsaadi valmistamiseks kasvatati rakke üleöö (ca 12h) 15 ml YPD vedelsöötmes 30 °C loksutis (200 rpm). Järgnevalt tehti rakukultuurile lahjendus lõppkontsentratsiooniga  $1 \times 10^7$ . See tõsteti ümber 20ml rafinoosi (2%) sisaldavasse söötmesse ja kasvatati 2h loksutil 30 °C juures. Kahe tunni pärast rakud fuugiti 3 minutit 10000 rpm ja võeti üles galaktoosi (2%) sisaldavas söötmes. Kasvatati edasi loksutil 30 °C juures (200 rpm) ja võeti proov ajapunktide 120 ja 180 minuti tagant. Proovide jaoks võeti 2 ml lahust ning tsentrifuugiti 30 sekundit 6000 rpm juures, et rakud kokku koguda. Rakusadet pesti 1 ml mQ veega ja siis suspendeeriti 1 ml-is külmas 2M LiOAc lahuses. Rakususpensiooni inkubeeriti 5 minutit jääl, rakud koguti kokku 1 minut 6000 rpm 4 °C juures tsentrifuugides. Rakusade suspendeeriti 1 ml jääkülma 0,4 M NaOH lahusega ja korrati inkubeerimist jääl 5 minutit. Seejärel koguti rakud kokku 1 min 6000 rpm 4 °C juures tsentrifuugides ja siis eemaldati supernatant. Valkude denatureerimiseks suspendeeriti rakke 100 µl 2xSDS (4% SDS; 20% glütserool; 0,01% bromofenool sinine; 100 mM Tris pH 6,8; 100 mM β-merkaptotanool) puhvril. Koos puhvriga asetati tuubid 5 minutiks termostaati 95 °C-le pärast mida tsentrifuugiti rakke 3 minutit maksimum tugevusel (u 10 000 rpm). 100 µl lüsaati kanti uude 1,5 ml tuubi.

Western bloti 12% lahutava osa ja 5% konsentreeriva osa materjalid ja kogused on toodud välja tabelites 4. ja 5.

**Tabel 4. 12% SDS-poliakrüülamiidgeeli lahutava osa koostis.**

Materjalid	Kogus
Destilleeritud vesi	4.9 ml
30% poliakrüülamiid	6 ml
1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	3.8 ml
10% SDS (naatriumdodetsüülsulfaat)	0.15 ml
10% APS (ammoonium persulfaat)	0.15 ml
TEMED (tetrametüületüleendiamiin)	0.006 ml
	Kokku: 15 ml

**Tabel 5. 5% SDS-poliakrüülamiidgeeli kontsentreeriva osa koostis.**

<b>Materjalid</b>	<b>Kogus</b>
Destilleeritud vesi	4.1 ml
30% poliakrüülamiid	1 ml
1 M Tris (pH 6,8)	0,75 ml
10% SDS	0.06 ml
10% APS	0.06 ml
TEMED	0.006 ml
	Kokku: 6 ml

Rakulüsaadist kanti geelile 10 µl ning lahutati molekulmassi järgi kasutades 12%-list SDS-poliakrüülamiidgeeli. Esimesele rajale kanti 4 µl suurusmarkerit (*Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad*). Foreesil kasutati 1xSDS jooksupuhvrit (0,5% SDS; 0,125M Tris-HCl pH 6,8; 0,96 M glütsiin). Kontsentreeriva geeli ulatuses kasutati pinget 120V, lahutava osa ulatuses 170V. Järgnevalt kanti valgud akrüülamiidgeelilt üle PVDF membraanile (*Thermo Scientific PVDF Transfer Membrane*; 0,2 µm). Selleks inkubeeriti geeli 10 minutit pool-kuiva süsteemi ülekandepuhvris (48 mM Tris; 39 mM glütsiin; 0,037% SDS; 20% metanool). PVDF membraani loputati enne valkude ülekandeprotsessi metanoolis ja seejärel 10 minutit loksutil ülekandepuhvris. Valkude seondamine PVDF membraanile toimus pool-kuiva ülekande aparaadis (*BIO-RAD Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell*) pingel 15 V 40 minuti jooksul.

Järgnevalt blokeeriti PVDF membraan 10 milliliitri 5% lõssipulbriga (*CARL ROTH Skimmed milk powder*) TBST (1x TBS, 0,05% *BioTop Tween 20*) lahuses 15 minutit. Järgmises etapis lisati primaarne antikeha (*ANTI-FLAG®M2 Sigma-Aldrich F3165*) 10 ml 1:10000 lahjendusega lõssipulbrile ning membraani inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril loksutil.

Järgmisena pesti membraani kolm korda TBST pesulahusega. Sellele järgnes inkubatsioon sekundaarse antikeha (*Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen™*) ja 10 ml 1:10000 lahjendusega lõssipulbri lahusega 1 tund loksutil. Pärast inkubatsiooni korrati membraani pesemist kolm korda umbes 10 minuti jooksul TBST pesulahusega.

Viimasena inkubeeriti membraani 2 ml luminooli ja peroksiidi lahusega (1:1) (*Immobilon Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore*) ja inkubeeriti 5 minutit. Peale seda membraan kuivatati ja signaali detekteeriti kasutades masinat *BIO-RAD ChemiDoc™ XRS+ System* ja *Image Lab™ 6.0* programmi.

*Ponceau S* värvimismeetodit kasutati valkude visualiseerimiseks membraanil pärast ülekannet. Värvimislahus valmistati, kasutades 0,1% *Ponceau S* lahust 5% äädikhappes. Membraan asetati *Ponceau S* lahusesse ja inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Pärast inkubeerimist ilmnedid valgubändid membraanil punaste või roosade triipudena, võimaldades hinnata valkude ülekande efektiivsust ja ühtlust. Tulemus fikseeriti pildistamisega (*EPSON Perfection 1200*, *Seiko Epson Corporation*).

### 2.2.15. Hõbevärvimise (*silver staining*) proovide ettevalmistus

Rakud kasvatati üleöö 50 ml glükoosi sisaldavas YPD söötmes 30 °C loksutis (200 rpm). Järgmisel hommikul lahjendati kultuuri ( $1 \times 10^7$ ) ning inkubeeriti lisaks 2 tundi. Seejärel viidi rakud üle 50 ml galaktoosi (2%) sisaldavasse söötmesse, millele oli lisatud 50 µM biotiini (*D-Biotin Thermo Fischer B1595*) ning kasvatati 3 tundi, proovid võeti 120 ja 180 minutimärgi juures.

Rakud tsentrifugeeriti ning pesti üks kord destilleeritud mQ veega ja seejärel üks kord RIPA1 puhvriga (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% *sodium deoxycholate*, 0.1% SDS). Seejärel rakud resuspendeeriti 250 µl külmas RIPA1 puhvrilahuses. Lüüsimine viidi läbi klaaskuulidega 15 minuti jooksul temperatuuril +4 °C. Tuubi põhja tehti naaskliga auk ning lüsaat koguti 2 ml *Eppendorfi* tuubi, millele järgnes tsentrifugeerimine kiirusel 2000 rpm 30 sekundit. Proovidele lisati RIPA1 puhvrilahust, lõppmahuga 500 µl. Seejärel sonikeeriti rakke kolmes tsüklis (igäüks 10 sekundit, 20% intensiivsusel). Proovidele lisati 250 ühikut *benzonase-i* (*Benzonase<sup>®</sup> Nuclease, Sigma-Aldrich E1014*, 250 units/µL) ning inkubeeriti 1 tund temperatuuril +4 °C. Seejärel tsentrifugeeriti proovid 15 minutit 10000 rpm ning saadud lüsaat koguti *Eppendorf* tuubi.

Saadud proovile lisati 50 µl *Streptavidin-Sepharose* kerakesi (*Thermo Scientific<sup>™</sup> Pierce<sup>™</sup> High Capacity Streptavidin Agarose*) ning 500 µl RIPA2 puhvrit (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% naatriumdeoksükolaat) (kogumaht 1 ml). Inkubatsioon viidi läbi 3 tunni jooksul pöörleval segajal temperatuuril +4 °C. Kerakesi pesti viis korda pöörleval segajal toatemperatuuril, iga pesu kestis 5 minutit ning kasutati 1 ml vastavat puhvrilahust: 1×WASH-puhvriga (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2% SDS), 3×RIPA3 puhvriga (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EGTA; 0.1% SDS; 1% NP-40; 1 mM DTT), 1×50 mM Tris-HCl pH 7.5 lahusega.

Saadud proovidega sooritati *western blot* analüüs. Enne proovide kandmist geelile eluleeriti neid 2×SDS puhvril (4% SDS; 20% glütserool; 0,01% bromofenool sinine; 100 mM Tris pH

6,8; 100 mM  $\beta$ -merkaptopetanol), mis sisaldas 25mM biotiini (*D-Biotin, Thermo Fischer B1595*) 15 min toatemperatuuril ja 15 min 95 °C juures. Proovidest kanti geelile 10  $\mu$ l, lahutati molekulmassi järgi kasutades 12%-list SDS-poliakrüülamiidgeeli ja kasutati valgu suurusmarkerit (*Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad*). Foreesil kasutati 1xSDS jooksupuhvrit (0,5% SDS; 0,125M Tris-HCl pH 6,8; 0,96 M glütsiin). Kontsentreeriva geeli ulatuses kasutati pinget 120V, lahutava osa juures 170V.

### **2.2.16. Hõbevärvimine (*silver staining*)**

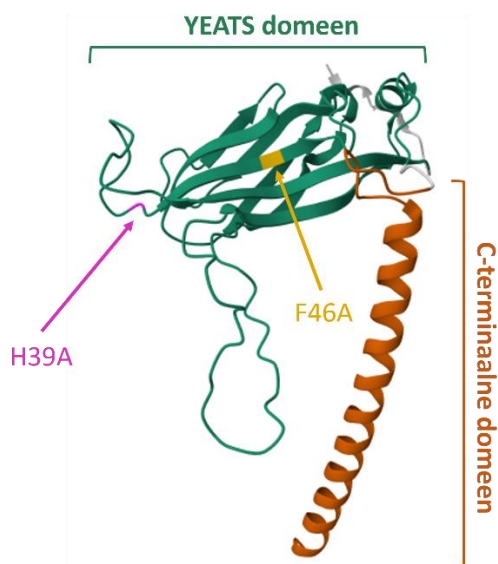
Töös kasutatud tüvedega sooritati hõbevärvimine (*silver staining*), et kontrollida TurboID biotinüleerimise toimimist. Alustuseks fikseeriti eelnevalt geelelektroforeesil lahutatud geel 200 ml 50% metanooli lahuses 10 minutit. Pärast seda pesti geeli 10 minutit 200 ml 5% metanooli lahusega. Seejärel inkubeeriti geeli 8  $\mu$ l 1M DTT-s ja 250 ml destilleeritud vee lahuses 10 minutit ja järgnevalt teostati kiire pesu destilleeritud vees. Värvimise jaoks leotati geeli 15 minutit 200 ml-s 0,2 g-s hõbenitraadi lahuses ( $\text{AgNO}_3$  *CARL ROTH Silver nitrate*). Järgnes 3x kiire pesu destilleeritud veega. Ilmutamiseks tehti kiire pesu väikese koguse ilmutuslahusega 50 ml ning siis lisati ülejäänud ilmutuslahus (7,5 g naatrium karbonaat, 125  $\mu$ l formaldehüüd, 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) 200 ml. Lõpuks valati ära ilmuti ja lisati tsitraathappe (*citric acid*) lahust (1 g tsitraathape, 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ), mis peatas reaktsiooni. Tulemused fikseeriti pildistamisega (*EPSON Perfection 1200, Seiko Epson Corporation*).

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. YAF9 YEATS-domeeni H29A ja F46A mutatsioone sisaldava plasmidi konstrueerimine

Antud töö eesmärk oli konstrueerida TurboID mudelsüsteemis mutantse Yaf9 YEATS-domeeniga pärmitüvi. TurboID biotiini ligaas Yaf9 YEATS-domeeni küljes võimaldab hiljem kasutada läheduspõhist biotinüleerimist YEATS-domeeniga seondunud valgukomplekside tuvastamiseks ning selgitada, kas YEATS-domeeni funktsionaalsus on oluline interaktsiooniks seondunud valkudega.

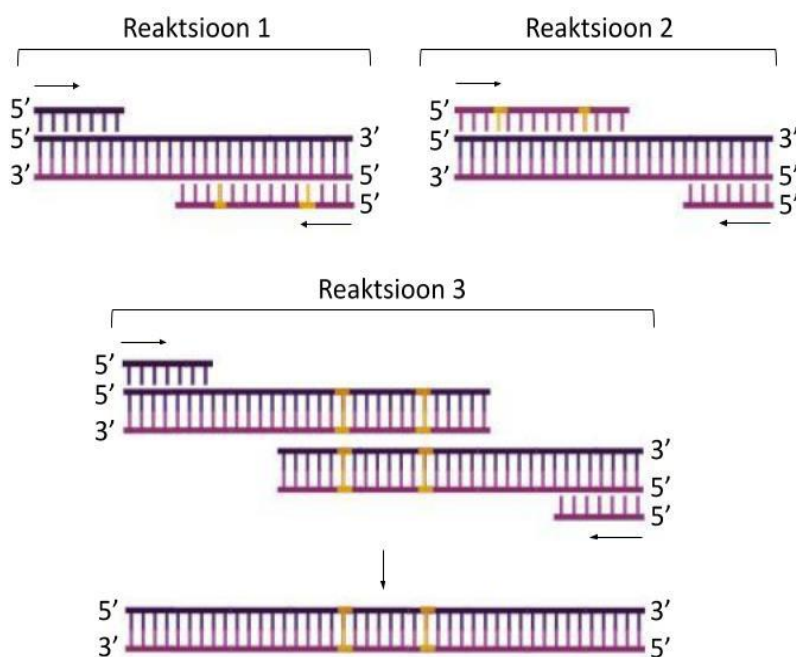
Selle tarbeks tuli esmalt konstrueerida plasmid, mis sisaldaks mutatsioone, kus 39. positsioonis olev histidiin (H) ja 46. positsioonis olev fenüülalaniin (F) on muteeritudalaniiniks (A) (hiljem märgitud vormis H39A ja F46A) (Joonis 6).



**Joonis 6. Yaf9 valgu struktuur mutatsioonidega.** Yaf9 sekundaarstruktuur, millel on näidatud töös teostatud mutatsioonide (H39A - roosa ja F46A - kollane) asukohad. Tähistatud on ka YEATS domeen (roheline) ja C-terminaalne domeen (oranž) (*AlphaFold Protein Structure Database*, <https://alphafold.ebi.ac.uk/>; PDB ID: P53930)

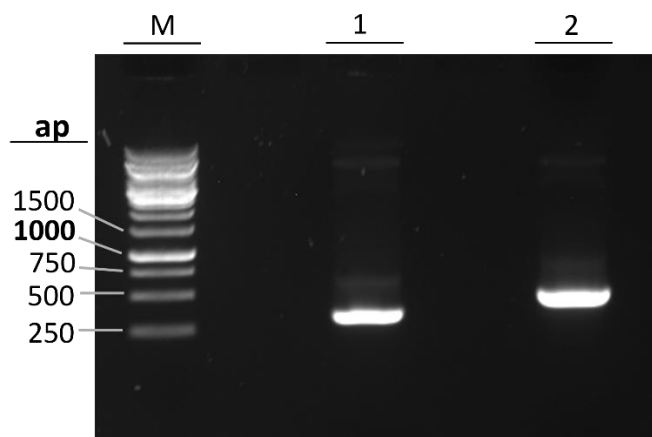
Mutatsioone sisaldav plasmid konstrueeriti *overlap extension* PCR abil. Selle jaoks viidi esmalt läbi kolm PCR reaktsiooni, et saada DNA fragment, mida kasutati praimerina *overlap extension* PCR protsessis (Joonis 7). Esimeses ja teises reaktsioonis sünteesiti varasemalt töögrupis konstrueeritud pBlueScript-ADE2\_GAL-YAF9-YEATS-TurboID-3xFLAG plasmiidilt kaks fragmenti, mis paiknevad mutatsioonikohast mõlemal pool (joonis 7). Esimeses reaktsioonis kasutati praimerite kombinatsioone GALprom\_end-F ja Y9-YEATS-H39A-F46A-R ja teises vastavalt Y9-YEATS-H39A-F46A-F ja TurboID-ALG-R primereid. Plasmid sisaldab

galaktoosiga indutseeritavat promootorit Yaf9 YEATS-domeeni ees (vt Lisa 1), mille roll on geeniekspressiooni regulatsioon. Galaktoosi olemasolul söötmes promootor aktiveerub ja geeni ekspresseeritakse. Vastupidiselt, söötmesse glükoosi lisamisel, galaktoosi promootor inaktiveerub. Yaf9 YEATS-domeeni järel on lisatud TurboID biotiini ligaas. TurboID on läheduspõhise märgistamise jaoks, võimaldades hiljem tuvastada valke, mis interakteeruvad Yaf9 YEATS-domeeniga.



**Joonis 7. PCR reaktsioonide skeem.** Joonisel on antud ülevaatlik skeem PCR-reaktsioonidest, mida kasutati Yaf9 YEATS-domeeni mutatsioonide H39A ja F46A tegemiseks (joonis on tehtud kasutades Biorender veebirakendust).

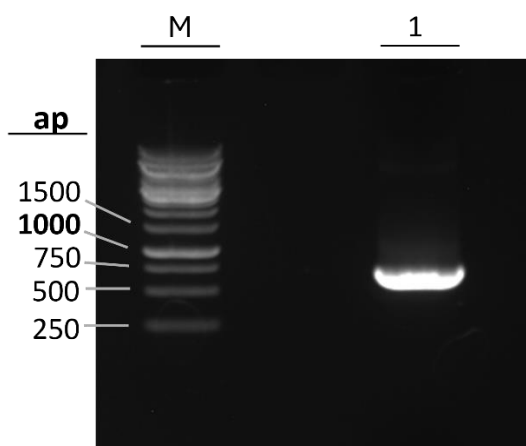
PCR-i meetodil sünteesitud fragmente kontrolliti agarosgeelelektroforeesil ja tulemused visualiseeriti UV kiirguse abil (Joonis 8). Rajal 1 on näha DNA suurusmarker (*1kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*), esimesel rajal reaktsioon 1 ja teisel rajal reaktsioon 2 tulemusena saadud PCR-produktide signaalid. Selliste praimerite puhul on oodatav PCR-i ampliconi suurus 1. reaktsiooni jaoks jaoks 324 ap ja 2. reaktsiooni jaoks jaoks 467 ap.



**Joonis 8. PCR reaktsioonide kontroll agarosgeelelektroforeesil.** Rajal M on DNA suurusmarker (*1 kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). Rajal 1 on reaktsioon 1 (324 ap) ja rajal 2 reaktsioon 2 (467 ap) käigus saadud DNA fragmentide signaalid. DNA visualiseeriti EtBr-ga UV valguses. ap - aluspaar

Saadud produktid vastasid ootusele ja kasutati järgmises PCR-i reaktsioonis (reaktsioon 3, joonis 7) koos GALprom\_end-F ja TurboID-ALG-R praimeritega. 3. reaktsiooni tulemuseks on PCR-i fragment, mis sisaldab galaktoosiga indutseeritavat promootorit ja Yaf9 YEATS-domeeni H39A ja F46A mutatsioone koos TurboID-ga.

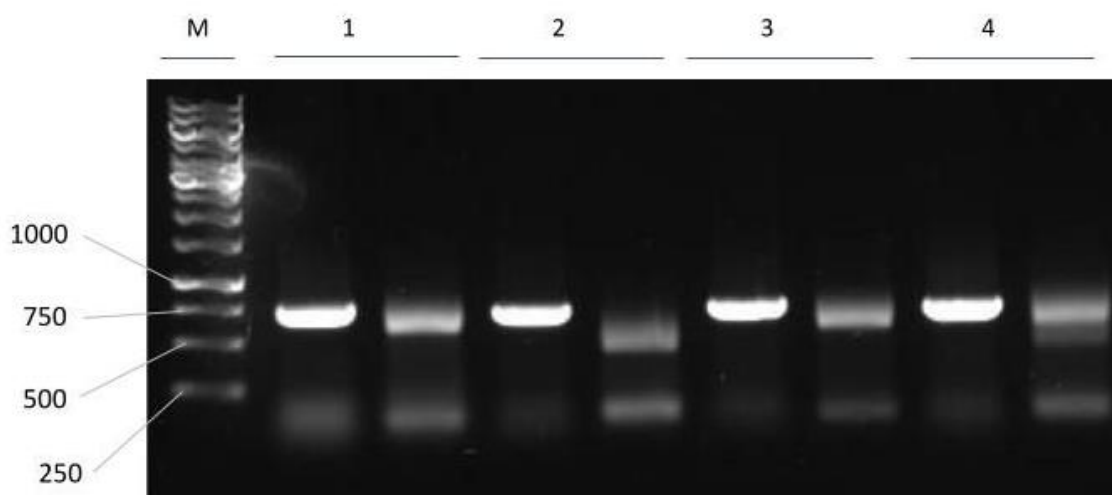
Reaktsioon 3 tulemusi kontrolliti agarosgeelelektroforeesil (Joonis 9). Rajal M on visualiseeritud DNA suurusmarker (*1kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*) ja esimesel rajal 3. reaktsiooni tulemusel saadud Yaf9 YEATS-domeeni mutatsioone sisaldav DNA fragment, mille oodatav suurus on 745 ap.



**Joonis 9. PCR reaktsiooni 3. kontroll agarosgeelelektroforeesil.** Rajal M on DNA suurusmarker (*1 kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). Rajal 1 on reaktsiooni 3. PCR-iga saadud Yaf9 YEATS-domeeni mutatsioone sisaldava DNA fragmenti signaal (745 ap). DNA visualiseeriti EtBr-ga UV valguses. ap - aluspaar

Kuna oodatav suurus (745 bp) vastas geelil nähtule, kasutati reaktsioonis 3 saadud DNA fragmenti praimerina *overlap extension* PCR-is, et sünteesida pBlueScript-ADE2\_GAL-YAF9-YEATS-TurboID-3xFLAG plasmidi põhjal uus, soovitud mutatsioone sisaldav plasmiid.

Mutatsiooni sisaldav plasmiid transformeeriti *E. coli* DH5 $\alpha$  rakkudesse. Kasvanud kolooniatest valiti 4, millele teostati kontroll Yaf9 YEATS-domeeni H39A-F46A mutatsiooni esinemise kohta kasutades AluI (AluI-AGCT) restriksioonanalüüsi. Selle jaoks võeti tassilt nelja erineva koloonia proov ja viidi läbi PCR reaktsioon GAL\_prom\_end-F ja TurboID-ALG-R praimeritega. Saadud PCR segusid töödeldi AluI ensüümiga ning sooritati agarosgeelelektrofees. 1%-lise agarosgeeli M rajal on näha DNA suurusmarker (*1 kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). Radadel 1-4 on kõrvuti nelja koloonia töötlemata ja AluI ensüümi sisaldanud PCR-i reaktsioonisegu. PCR käigus saadud DNA molekuli oodatav suurus on ligikaudu 745 ap. Kui AluI ensüümiga töödeldud proovis olev DNA fragment sisaldab Yaf9 YEATS-domeeni H39A ja F46A mutatsioone, lõikab AluI ensüüm selle kaheks 219 ap ja 526 ap suurusega fragmendiks.



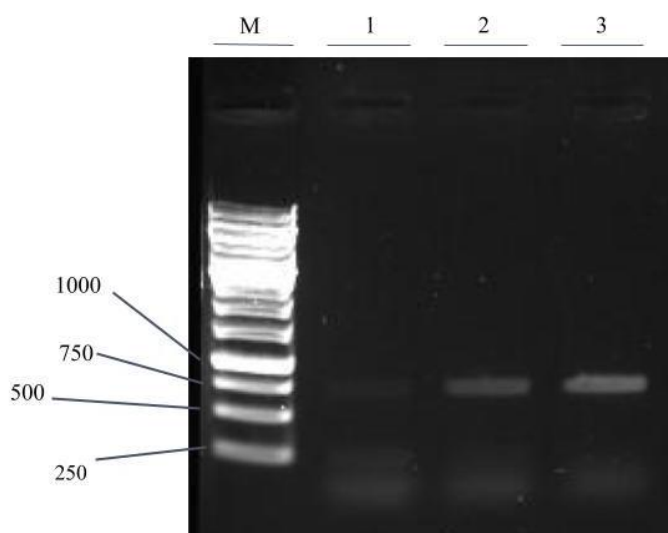
**Joonis 10. Bakterikolooniate kontroll agarosgeelelektroforeesil.** Rajal M on 1 kb suurusmarker (*1 kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). Radadel 1-4 on esimesel rajal töötlemata ja teisel AluI ensüümiga töödeldud PCR-i produktide signaalid (745 ap või 219/526 ap). DNA visualiseeriti EtBr-ga UV valguses.

Joonisel 10 on näha, PCR reaktsioonist saadud DNA molekuli signaali suurus vastas kõigil proovidel oodatava 745 ap-ga ning 219 ap ja 526 ap suuruseks lõikunud DNA fragmendid on tuvastatavad kolooniatel 2 ja 4, mis viitab nendes kolooniates mutatsiooniga plasmidi olemasolule. Kolooniatest 2 ja 4 eraldati plasmiidne DNA ja kontrolliti täpsemalt mutatsioonide korrektsust sekveneerimise abil.

### 2.3.2. YAF9 YEATS-domeeni H29A ja F46A mutatsioone sisaldava pärmitüve konstrueerimine

Sekveneerimise abil õigeks tuvastatud 2. koloonia plasmidi kasutati, et transformeerida mutatsioonidega plasmid pärmitüvesse AKY367. Selle jaoks töödeldi plasmidi esmalt AflIII ensüümiga (AflIII – C<sup>^</sup>TTAAG), mille lõikekoht on *ADE2* markergeeni keskel. Lõigatud plasmid omab restriksiooni järgselt homologseid järjestusi genoomis paikneva *ade2* geeniga (plasmidi kaart Lisas 1). Homoloogse rekombinatsiooni käigus integreerib pagaripärm mutatsioone sisaldava lineariseeritud plasmidi genoomis asuvasse *ade2* lookusesse. Lõigatud lineaarne plasmid transformeeriti väljavalitud pärmitüvesse kasutades LiOAc meetodit. Saadud rakud külvati -ADE selektiivtassidele, kus suudavad kasvada ainult need rakud, millel on funktsionaalne *ADE2* geen ehk mutatsiooniga *ADE2* plasmid genoomis *ade2* lookusesse integreerunud.

-ADE selektiivtassidel kasvanud kolooniatest kontrolliti kolme PCR-iga. Selle jaoks eraldati pärmirakkudest DNA ja sooritati PCR GALprom-end-F ja TurboID-ALG-R praimeritega. PCR meetodil sünteesitud fragmente kontrolliti agarosgeelelektroforeesil ja tulemused visualiseeriti UV-kiirguse abil. Rajal M on visualiseeritud DNA suurusmarker (*1 kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*), radadel 1-3 on transformatsioonil saadud kolmest kolooniast eraldatud DNA-lt amplifitseeritud Yaf9 YEATS-domeeni H39A-F46A mutatsiooniga PCR-i produktid (745 ap).

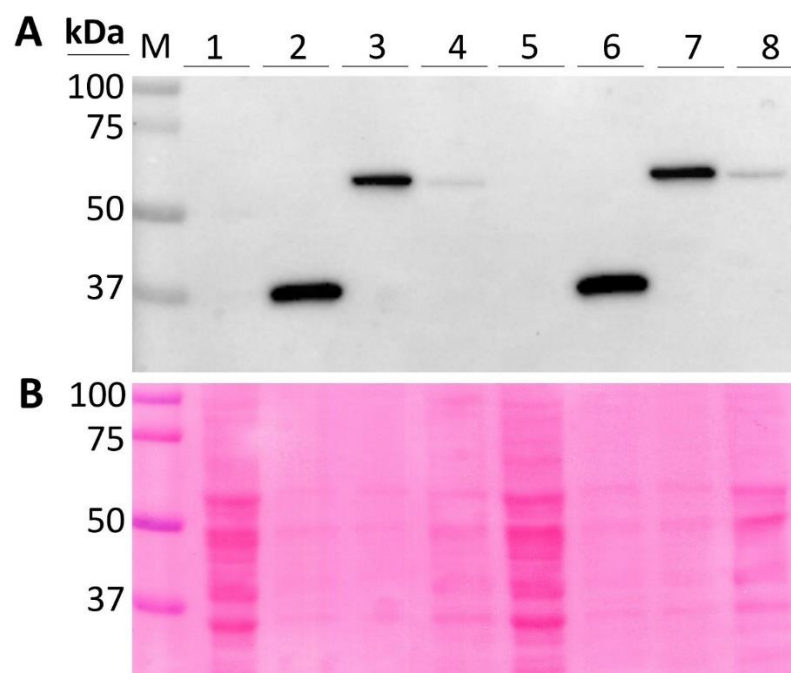


**Joonis 11. Pärmikolooniate kontroll agarosgeelelektroforeesil.** Rajal M on DNA suurusmarker (*1 kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). Radadel 1-3 on YAF9 YEATS-domeeni H39A- F46A mutatsiooniga pärmikolooniate PCR fragmendid (745 ap). DNA visualiseeriti EtBr-ga UV valguses.

Oodatavad suurused mutatsioonidega kolooniatele kattusid geelil nähtuga (745 ap) (Joonis 11.) ning edaspidises töös kasutati koloonia 2 rakke (AKY2681).

### 2.3.3. Mutantse Yaf9 YEATS-domeeni ekspressiooni kontrollimine

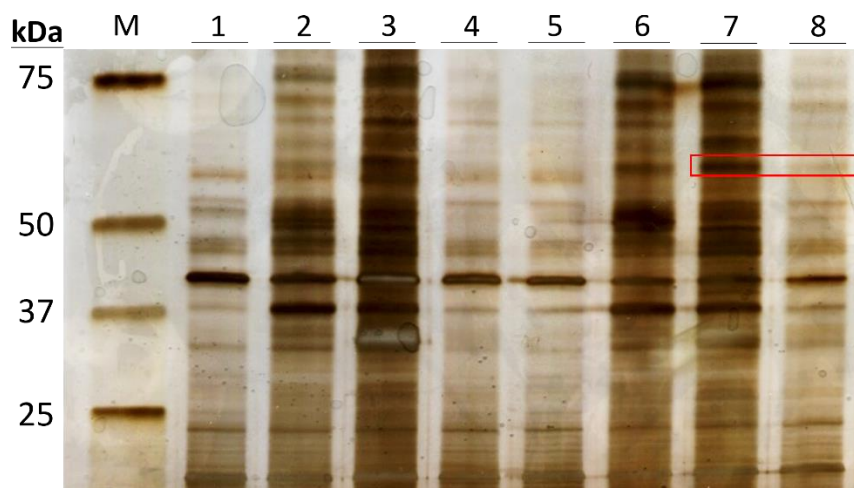
PCR-i põhine kontroll näitas, et valitud koloonias oli mutatsioone sisaldav Yaf9 YEATS-domeen edukalt *ADE2* lookusesse integreerunud. Selleks, et kontrollida, kas järjestus on integreerunud nii, et mutantne Yaf9 YEATS-domeen ekspresseerub ning seda on ka võimalik detekteerida, kasutati *Western blot* meetodit. Nelja pärmitüve (AKY2622, AKY2626, AKY2657, AKY2681) rakke kasvatati rafinoosi (2%) sisaldavas YPD vedelsöötmes loksutil 30°C ja 200 prm juures (*New Brunswick Scientific Excella E25 Incubator Shaker Series*) ning lahjendati seejärel galaktoosi (2%) sisaldavasse söötmesse, et ekspresseerida Yaf9 YEATS-domeen. Proovid võeti ajapunktide 120 ja 180 minuti tagant. Proovid lahutati 12% SDS-poliakrüülamiidgeelil, kanti PVDF membraanile, inkubeeriti primaarse antikeha (*ANTI-FLAG®M2 Sigma-Aldrich F3165*) ja sekundaarse antikehaga (*Goat anti-Mouse IgG HRP Invitrogen™*) ja visualiseeriti masinaga *BIO-RAD ChemiDoc™ XRS+ System* ja *Image Lab™ 6.0 programmiga*. Rajal M on valgu suurusmarker (*Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad*)(Joonis 12A). Radadel 1-4 on näha 120 minutit ja radadel 5-8 180 minutit galaktoosis kasvanud rakud. Esimesel ja viiendal rajal on kasutatud kontrollina AKY2626 pärmitüve, milles esineb vaid galaktoosiga indutseeritav promootor. Teisel ja kuuendal rajal on samuti kontrollina kasutatud AKY2657 pärmitüvi, milles on galaktoosi promootori kontrolli all TurboID biotiini ligaas. Kolmandal ja seitsmendal rajal on antud töö positiivse kontrollina kasutatud tüvi AKY2622, mis sisaldab metsiktüüpi Yaf9 YEATS-domeeni TurboID mudelsüsteemis. Neljandal ja kaheksandal rajal on antud töö jooksul valminud Yaf9 YEATS-domeeni H39A-F46A mutatsiooniga pärmitüvi AKY2681. Samuti on joonisel toodud sama *Western blot* poliakrüülamiidgeel värvitud *Ponceau S* värvimismeetodiga, et kontrollida valkude ülekande efektiivsust ja proovide koguseid kvantitatiivseks hindamiseks (Joonis 12B). Ainult TurboID biotiini ligaasi ennustuslik valgu suurus on ligikaudu 37 kDa ja Yaf9 YEATS-domeeni lisandumisel 59 kDa juures, mis vastavad detekteeritud signaalidele.



**Joonis 12. Yaf9 YEATS-domeeni detekteerimine *Western blot* meetodil.** Proovid on lahutatud 12% SDS-poliakrüülamiidgeelil. Primaarse antikehana kasutati *ANTI-FLAG®M2* ja sekundaarse antikehana *Goat anti-Mouse IgG HRP* antikeha. Rajal M on valgu suurusmarker (*Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad*). A. Rajal 1 on AKY2626 120 minutit galaktoosis kasvanud rakud, rajal 2 AKY2657 (120 min), rajal 3 AKY2622 (120 min) ning rajal 4 AK2681 (120 min). Rajad 5-8 on sama tüvede järjekord 180 minutit galaktoosis kasvanud rakkudega. B. on *Western blot* geel (A) värvitud *Ponceau S* värvimismeetodiga. kDa – kilodalton

### 2.3.4. TurboID biotinüleerimise kontroll

*Western blot* analüüs näitas, et käesolevas katses tehtud mutatsioonidega Yaf9 YEATS-domeen ekspresseerus, kuid detekteeritav signaal oli nõrgem võrreldes metsiktüüpi Yaf9 YEATS-domeeniga. Järgmisena sooritati muteeritud tüvega hõbevärvimine (*silver staining*), et kontrollida TurboID biotinüleerimise toimimist antud tüves (Joonis 13). Pärimistüvede (AKY2622, AKY2626, AKY2657, AKY2681) kasvatamine viidi läbi sarnaselt *Western blot* analüüsiga, kuid galaktoosi sisaldavasse söötmesse oli lisatud ka 50  $\mu$ M biotiini (*D-Biotin Thermo Fischer B1595*), mida TurboID biotiin ligaas kasutab substraadina läheduses asuvate valkude märgistamisel. Proovid lahutati 12% SDS-poliakrüülamiidgeelil ning teostati hõbevärvimine. Radadel 7 ja 8 on punase kastiga tähistatud signaal, kus metsiktüüpi ja mutantse Yaf9 YEATS-domeeni küljes olev TurboID ensüüm on märgistanud iseennast (*self-biotinylation*), mis viitab ensüümi funktsionaalsusele ja biotinüleerimise toimumisele.



**Joonis 13. Hõbevärvitud *Western blot* geel muteeritud ja kontrolltüvedega.** Proovid on lahutatud 12% SDS-poliakrüülamiidgeelil ja töödeldi hõbevärvimisega. Rajal M on valgu suurusmarker (*Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad*). Rajal 1 on pärmitüvi AKY2626, mis on 120 minutit galaktoosis kasvanud, rajal 2 AKY2657 (120 min), rajal 3 AKY2622 (120 min) ning rajal 4 AK2681 (120 min). Rajad 5-8 on sama tüvede järjekord 180 minutit galaktoosis kasvanud rakkudega. Punased kastid tähistavad signaali TurboID ensüümi enesemärgistamisest (*self-biotinylation*). kDa – kilodalton

## 2.4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks olnud mutantse Yaf9 YEATS-domeeniga (H39A-F46A) pärmitüve konstrueerimine õnnestus edukalt. *Western blot* ja hõbevärvimise analüüside tulemused näitasid, et *S. cerevisiae* tüvi TurboID mudelsüsteemis, milles on Yaf9 valgu mutantne YEATS-domeen, on võimeline valku edukalt ekspresseerima ja TurboID biotiin ligaas läheduspõhiselt biotinüleerima. Siiski oli näha erinevusi võrreldes metsiktüüpi Yaf9 YEATS-domeeniga. *Western blot* analüüs näitas, et mutantne YEATS-domeen ekspresseerus, kuid signaali intensiivsus oli selgelt nõrgem võrreldes metsiktüübiga (AKY2622). See viitab mitmele võimalikule põhjusele: esiteks, võib mutatsioon YEATS-domeenis mõjutada valgu stabiilsust, mille tagajärjel valk laguneb kiiremini ning teiseks, ei saa välistada, et mutatsioon mõjutab valgu translatsiooni efektiivsust või korrektset voldumist. Sarnane erinevus metsiktüüpi YEATS-domeeniga oli tuvastatav ka hõbevärvimisel, kus AKY2681 tüves TurboID-le iseloomuliku enesemärgistamise (*self-biotinylation*) signaal oli nõrgema intensiivusega, mis viitab sellele, et TurboID küll säilitab oma ensümaatilise aktiivsuse ka YEATS-domeeni mutatsiooni korral, kuid märgistamine toimub madalama efektiivsusega. Antud töö katsete tulemusi on oluline silmas pidada tulevastes katsetes, mille puhul oleks võimaliku lahendusena mutantse tüve (AKY2681) puhul pikem kasvatusaeg galaktoosi sisaldavas söötmes, et suurendada mutatsioone sisaldava Yaf9 YEATS-domeeni ekspressiooni. Seda toetab ka antud katses 180 minuti möödudes täheldatud kõrgem valguekspressioon võrreldes 120 minutiga.

Järgmise sammuna võiks hinnata mutantse Yaf9 valgu stabiilsust ja lagunemist rakkudes, et saada täiendavat teavet mutatsioonide mõju kohta. Näiteks Yaf9 mRNA taseme määramine võimaldaks hinnata, kas täheldatud erinevused valgu konsentratsioonis tulenevad transkriptsioonitasemest. Yaf9 YEATS-domeeni H39A-F46A mutatsioon sai valitud Wang *et al.* artiklis kirjeldatud funktsionaalsete katsete põhjal, kus antud mutatsiooni sisaldav pärmitüvi oli tundlik erinevatele stressoritele nagu mikrotuubulite polümerisatsiooni inhibiitor benomüül (*benomyl*) ja DNA replikatsiooni stressi põhjustav hüdroksüurea (*hydroxyurea*) (Wang *et al.*, 2009). Tundlikkus antud kemikaalidele viitab probleemidele rakutsükli regulatsioonis ja DNA reparatsioonimehhanismides. Lisaks, ei olnud H39A-F46A mutatsiooniga tüvi eluvõimeline formamiidi (*formamide*) juuresolekul. Mainitud stressoritele tundlikku fenotüüpi omavad ka rakud, kus puudub *YAF9* geen, mis viitab antud YEATS-domeeni mutatsioonide olulisusele Yaf9 valgu funktsioneerimisel.

Käesoleva töö eesmärgiks oli tulevikus kasutada TurboID läheduspõhist märgistamist, selgitamaks, kas YEATS-domeen on võimeline lisaks histoonide modifikatsioonidele

seonduma ka teiste valkude ja neil esinevate modifikatsioonidega ning määrata, kas mutatsioon H39A-F46A YEATS-domeenis mõjutab tekkinud interaktsioone. Varasemalt on näidatud, et Yaf9 kuulub kahe valgukompleksi NuA4 ja SWR1 koosseisu interakteerudes läbi C-terminaalse domeeni (Bittner et al., 2004; Zhang et al., 2004). Selleks, et uurida vaid YEATS-domeeni seondumisspetsiifikat ning vältida C-terminuse poolset valkudega seondumist on antud töös C-terminaalne valgu osa eemaldatud. Võimalikust Yaf9 YEATS-domeeni seondumisest teiste valkude modifikatsioonidega tõendavad *Candida albicans*-is läbi viidud katsed, kus näidati, et Yaf9 YEATS-domeen suudab ära tunda NuA4 kompleksi kuuluval Eaf1 valgul esineva atseüülmärgise (K173) ning vahendab seeläbi Yaf9 ja Eaf1 valkude vahelist interaktsiooni (X. Wang et al., 2018). Lisaks oleks võimalik uurida, kas ja mil määral mõjutab Yaf9 YEATS-domeeni mutatsioon SWR1 ja NuA4 komplekside funktsioneerimist.

Kokkuvõttes näitavad antud töö tulemused, et käesolevas töös loodud mutantne Yaf9 YEATS-domeeniga pärmitüvi on sobiv tööriist edasisteks proteoomikapõhisteks interaktsioonanalüüsideks. Töö loob aluse, et süstemaatiliselt uurida YEATS-domeeni seondumist valkude ja neil esinevate modifikatsioonidega ning võimaldab tuvastada selle uusi võimalikke rolle rakulistes protsessides osalemisel.

# KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli konstrueerida mutantne *Saccharomyces cerevisiae* tüvi, milles Yaf9 valgu YEATS-domeen sisaldab kahte punktmutatsiooni (H39A ja F46A) TurboID mudelsüsteemis, mida oleks võimalik kasutada edasistes Yaf9 YEATS-domeeni funktsiooni uurivates katsetes.

Töö esimeses etapis konstrueeriti tüve loomiseks kasutatav vajalike mutatsioonidega plasmiid. Selleks kasutati *overlap extension* PCR meetodit, kus nelja järjestikuse PCR reaktsiooni tulemusel sünteesiti plasmiid, milles mutatsioonidega *YAF9* YEATS-domeen koos TurboID järjestusega on galaktoosiga indutseeritava promootori kontrolli all. Pärast mutatsioonide esinemise korrektsuse kontrolli transformeeriti mutatsioonidega plasmiid pärmirakkudesse (AKY367), kasutades AflIII ensüümiga lineaarseks lõigatud plasmidi integreerimist *ade2* lookusesse homoloogse rekombinatsiooni teel ning saadi pärmitüvi AKY2681.

Seejärel kontrolliti mutantse Yaf9 YEATS-domeeni ekspressiooni *Western blot* meetodil. Nelja erineva pärmitüve valke analüüsiti pärast galaktoosiga indutseerimist kahes ajapunktis (120 ja 180 minutit). Tuvastati, et mutatsioonidega tüvi AKY2681 ekspresseeris Yaf9 YEATS-TurboID valku, kuid signaal oli selgelt nõrgem võrreldes metsiktüüpi domeeni sisaldava tüvega AKY2622. See viitab võimalusele, et mutatsioonid mõjutavad domeeni stabiilsust või ekspressioonitaset. Lõpuks analüüsiti TurboID ensüümi biotinüleerimisvõimet hõbevärvimise abil. Analüüs näitas TurboID ensüümile kohast enesemärgistamist (*self-biotinylation*) nii metsiktüüpi kui ka mutantse Yaf9 YEATS-domeeni puhul, kinnitades, et TurboID on funktsionaalne ka mutatsioonidega tüves.

Edasistes uuringutes saaks hinnata mutantse Yaf9 valgu stabiilsust ja lagunemist, et saada täiendavat teavet antud mutatsioonide mõju kohta. Samuti annavad tulemused aluse edasiseks valgukomplekside läheduspõhiseks tuvastamiseks, et paremini mõista YEATS-domeeni struktuurilisi omadusi, seondumisspetsiifilisust ning rolli rakulistes mehhanismides, rõhutades selle funktsionaalsuse tähtsust nendes protsessides.

# SUMMARY

## Construction of a Yaf9 protein with a mutant YEATS domain in the TurboID modelsystem in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Teia Friedenthal

Histones are structural components of nucleosomes, and the post-translational modifications (PTMs) of their "tails" influence the degree of nucleosome packaging and the accessibility of DNA for gene transcription (Mariño-Ramírez et al., 2005; Wood & Shilatifard, 2004). One of the main modifications is acetylation, which reduces the interaction between histones and DNA, thereby increasing DNA accessibility (Ito & Adcock, 2002). In cells, there are complexes that contain histone reader protein domains that recognize specific histone modifications (Cuvier & Fierz, 2017; Zhao et al., 2017).

One such domain is the YEATS domain, which selectively recognizes histone acetylation (Schulze et al., 2010). This work focuses on the YEATS domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Yaf9 protein, which is involved in the regulation of cellular transcription through the "reading" of acetylation and is essential for the proper functioning of Yaf9 (Zhang et al., 2004).

The overall aim of this study was to construct a *S. cerevisiae* strain using the TurboID modelsystem, in which the YEATS domain of the Yaf9 protein contains mutations where histidine (H) at position 39 and phenylalanine (F) at position 46 are mutated to alanine (A). The TurboID enzyme fused to the Yaf9 protein allows for subsequent proximity-based biotinylation to identify protein complexes associated with Yaf9.

In the first stage of the study, a plasmid containing the necessary mutations for strain construction was generated. This was achieved using the overlap extension PCR method, in which four successive PCR reactions were carried out to synthesize a plasmid in which the mutated *YAF9* YEATS domain, fused with a TurboID, was placed under the control of a galactose-inducible promoter. After confirming the correct incorporation of the mutations, the mutated plasmid was transformed into yeast cells (AKY367) by integrating the AflII-linearized plasmid into the *ade2* locus via homologous recombination. As a result, a yeast strain AK2681 was obtained, which carries the Yaf9 protein YEATS domain mutations H39A and F46A under the control of a galactose promoter, along with the TurboID biotin ligase.

The expression of the mutant protein was assessed using Western blot analysis, which yielded a positive signal but indicated a lower protein level in the mutant strain compared to the wild-type. A similar difference compared to the wild-type YEATS domain was also detectable in silver staining, where the self-biotinylation signal characteristic of TurboID in the AKY2681 strain was of lower intensity. This suggests that although TurboID retains its enzymatic activity even in the presence of the YEATS domain mutation, the labeling occurs with reduced efficiency.

The next step could involve assessing the stability and degradation of the mutant Yaf9 protein in cells to gain further insight into the impact of the mutations. For example, determining Yaf9 mRNA levels would help evaluate whether observed differences in protein concentrations are due to transcriptional regulation. Additionally, it would be valuable to investigate whether and to what extent the mutation in the Yaf9 YEATS domain has affected the function of the SWR1 and NuA4 complexes, of which Yaf9 is a component (Zhang et al., 2004).

The results also provide a basis for further proximity-based identification of protein complexes, in order to better understand the structural characteristics of the YEATS domain, its binding specificity, and role in cellular mechanisms, highlighting the importance of its functional integrity in these processes.

# TÄNUSÕNAD

Sooviksin südamest tänada juhendajat Henel Jürgensi, kes õpetas mulle väga palju laboritöö tavade ja tehnikate kohta ning kannthkult vastas mu paljudele küsimustele töö tegemise jooksul. Raske oleks saanud soovida paremat juhendajat, kes alati oli suureks toeks nii laboris kui ka kirjaliku osa vältel ning kelle nõuannete ja juhtimise najal see töö valmis sai.

Sooviksin tänada ka juhendajat Arnold Kristjuhanit, kes mind uurimisgruppi soojalt vastu võttis ja julgustust pakkus. Selle juures tänaks ka Signe Värvi, kes oli alati valmis nõu andma ja mu katseid üle vaatama ning ka teisi rakubioloogia õpetooli inimesi, kes olid kõik laboritöö jooksul sõbralikud ning abivalmid.

# KIRJANDUSE LOETELU

- Allen, G. C. (2024). Plant Cell Monographs. *ResearchGate*. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-71058-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-71058-5_6)
- Andrews, F. H., Strahl, B. D., & Kutateladze, T. G. (2016). Insights into newly discovered marks and readers of epigenetic information. *Nature Chemical Biology*, *12*(9), 662–668. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2149>
- Arney, K. L., & Fisher, A. G. (2004). Epigenetic aspects of differentiation. *Journal of Cell Science*, *117*(19), 4355–4363. <https://doi.org/10.1242/jcs.01390>
- Bittner, C. B., Zeisig, D. T., Zeisig, B. B., & 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>
- Bowman, G. D., & Poirier, M. G. (2015). Post-Translational Modifications of Histones That Influence Nucleosome Dynamics. *Chemical Reviews*, *115*(6), 2274–2295. <https://doi.org/10.1021/cr500350x>
- Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., Feldman, J. L., Perrimon, N., & Ting, A. Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology*, *36*(9), 880–887. <https://doi.org/10.1038/nbt.4201>
- Cho, K. F., Branon, T. C., Udeshi, N. D., Myers, S. A., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2020). Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID. *Nature Protocols*, *15*(12), 3971–3999. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0399-0>
- Clapier, C. R., Iwasa, J., Cairns, B. R., & 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>
- Cuvier, O., & Fierz, B. (2017). Dynamic chromatin technologies: From individual molecules to epigenomic regulation in cells. *Nature Reviews Genetics*, *18*(8), 457–472. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.28>
- Eslaminejad, M. B., Fani, N., & Shahhoseini, M. (2013). Epigenetic Regulation of Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Culture. *Cell Journal (Yakhteh)*, *15*(1), 1–10.
- Guo, J., Guo, S., Lu, S., Gong, J., Wang, L., Ding, L., Chen, Q., & Liu, W. (2023). The development of proximity labeling technology and its applications in mammals, plants, and microorganisms. *Cell Communication and Signaling*, *21*(1), 269. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01310-1>

- Ito, K., & Adcock, I. M. (2002). Histone acetylation and histone deacetylation. *Molecular Biotechnology*, 20(1), 99–106. <https://doi.org/10.1385/MB:20:1:099>
- 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., & 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>
- Kouzarides, T. (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(1), 40–48. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(99\)80006-9](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(99)80006-9)
- Lamothe, G., & Malliavin, T. E. (2018). re-TAMD: Exploring interactions between H3 peptide and YEATS domain using enhanced sampling. *BMC Structural Biology*, 18(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12900-018-0083-6>
- Larochelle, M., Bergeron, D., Arcand, B., & Bachand, F. (2019). Proximity-dependent biotinylation mediated by TurboID to identify protein–protein interaction networks in yeast. *Journal of Cell Science*, 132(11), jcs232249. <https://doi.org/10.1242/jcs.232249>
- Le Masson, I., Yu, D. Y., Jensen, K., Chevalier, A., Courbeyrette, R., Boulard, Y., Smith, M. M., & 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, S., Peng, Y., Landsman, D., & Panchenko, A. R. (2022). DNA methylation cues in nucleosome geometry, stability and unwrapping. *Nucleic Acids Research*, 50(4), 1864–1874. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac097>
- Li, X., Liu, S., Li, X., & Li, X. D. (2023). YEATS Domains as Novel Epigenetic Readers: Structures, Functions, and Inhibitor Development. *ACS Chemical Biology*, 18(4), 994–1013. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00945>
- Liu, H., Ma, W., Xie, J., Li, H., Luo, K., Luo, D., Liu, L., Sun, X., Liu, H., Ma, W., Xie, J., Li, H., Luo, K., Luo, D., Liu, L., & Sun, X. (2017). Nucleosome Positioning and Its Role in Gene Regulation in Yeast. In *The Yeast Role in Medical Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70935>
- Mariño-Ramírez, L., Kann, M. G., Shoemaker, B. A., & Landsman, D. (2005). Histone structure and nucleosome stability. *Expert Review of Proteomics*, 2(5), 719–729. <https://doi.org/10.1586/14789450.2.5.719>
- Musselman, C. A., Lalonde, M.-E., Côté, J., & Kutateladze, T. G. (2012). Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(12), 1218–1227. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2436>

- Olins, A. L., & Olins, D. E. (1974). Spheroid Chromatin Units (v Bodies). *Science*, 183(4122), 330–332. <https://doi.org/10.1126/science.183.4122.330>
- Quina, A. S., Buschbeck, M., & Di Croce, L. (2006). Chromatin structure and epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1563–1569. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.06.016>
- Ramazi, S., Allahverdi, A., & Zahiri, J. (2020). Evaluation of post-translational modifications in histone proteins: A review on histone modification defects in developmental and neurological disorders. *Journal of Biosciences*, 45(1), 135. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00099-2>
- Scheid, R., Chen, J., & Zhong, X. (2021). Biological role and mechanism of chromatin readers in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 61, 102008. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102008>
- Schulze, J. M., Wang, A. Y., & Kobor, M. S. (2009). YEATS domain proteins: A diverse family with many links to chromatin modification and transcription. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 87(1), 65–75. <https://doi.org/10.1139/O08-111>
- Schulze, J. M., Wang, A. Y., & Kobor, M. S. (2010). Reading chromatin: Insights from yeast into YEATS domain structure and function. *Epigenetics*, 5(7), 573–577. <https://doi.org/10.4161/epi.5.7.12856>
- Simon, M., North, J. A., Shimko, J. C., Forties, R. A., Ferdinand, M. B., Manohar, M., Zhang, M., Fishel, R., Ottesen, J. J., & Poirier, M. G. (2011). Histone fold modifications control nucleosome unwrapping and disassembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12711–12716. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106264108>
- Thomas, J. O., & Furber, V. (1976). Yeast chromatin structure. *FEBS Letters*, 66(2), 274–280. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80521-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80521-2)
- Thorne, A. W., Kmiecik, D., Mitchelson, K., Sautiere, P., & Crane-Robinson, C. (1990). Patterns of histone acetylation. *European Journal of Biochemistry*, 193(3), 701–713. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19390.x>
- Wang, A. Y., Schulze, J. M., Skordalakes, E., Gin, J. W., Berger, J. M., Rine, J., & 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., & Chen, J. (2018). Merge and separation of NuA4 and SWR1 complexes control cell fate plasticity in *Candida albicans*. *Cell Discovery*, 4(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0043-0>

- Wood, A., & Shilatifard, A. (2004). Posttranslational Modifications of Histones by Methylation. In *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 67, pp. 201–222). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(04\)67008-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)67008-2)
- Xu, Y., Fan, X., & Hu, Y. (2021). In vivo interactome profiling by enzyme-catalyzed proximity labeling. *Cell & Bioscience*, *11*(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00542-3>
- Zhang, H., Richardson, D. O., Roberts, D. N., Utley, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Côté, J., & 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>
- Zhao, D., Li, Y., Xiong, X., Chen, Z., & Li, H. (2017). YEATS Domain—A Histone Acylation Reader in Health and Disease. *Journal of Molecular Biology*, *429*(13), 1994–2002. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.010>
- Zhao, S., Yue, Y., Li, Y., & Li, H. (2019). Identification and characterization of ‘readers’ for novel histone modifications. *Current Opinion in Chemical Biology*, *51*, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.04.001>

# KASUTATUD VEEBIAADRESSID

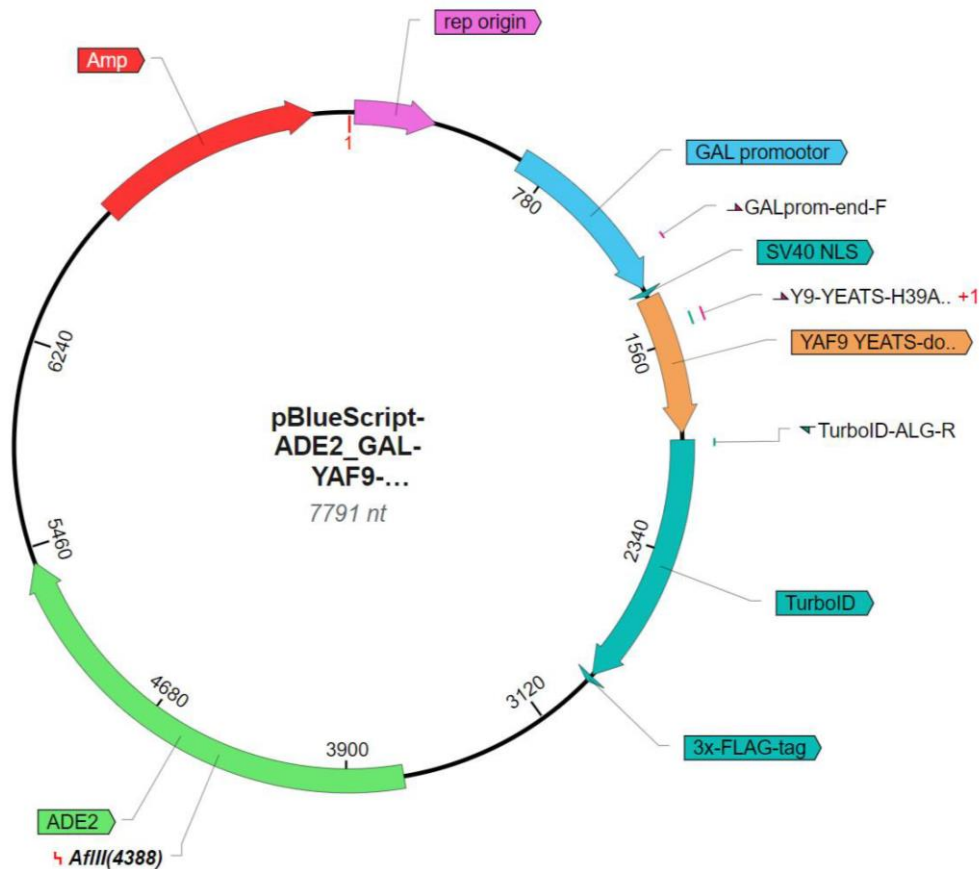
*AlphaFold Protein Structure Database*, <https://alphafold.ebi.ac.uk/>, viimati kasutatud 15.05.25

*BioRender: Scientific Image and Illustration Software*, <https://www.biorender.com/>, viimati kasutatud 14.05.25

*VectorBee, genetic engineering software*, <https://www.vectorbee.com/en/>, viimati kasutatud 24.05.25

# LISAD

**Lisa 1. Plasmiid pBlueScript-ADE2\_GAL-YAF9-YEATS-TurboID-3xFLAG.** Plasmiid, mida kasutati galaktoosi promootori kontrolli all oleva Yaf9 YEATS-domeeni 39. ja 46. positsioonis olevaid mutatsioone ja TurboID-d sisaldava plasmidi konstrueerimiseks. Joonisel on välja toodud *GAL* promootor (sinine), *SV40 NLS* tuumalokalisatsiooni signaali järjestus, Yaf9 YEATS-domeen (oranž), TurboID (roheline) ning 3xFLAG epitoop. Joonisel märgitud lisaks töös kasutatud praimerid ja AflII restriктаasi lõikekoht *ade2* markergeenis. Joonis on tehtud VectorBee programmiga.



# LIHTLITSENTS

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

Mina, Teia Friedenthal,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “Mutantse YEATS-domeeniga Yaf9 valgu konstrueerimine TurboID süsteemis pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae*”, mille juhendajad on PhD Henel Jürgens ja Prof. Arnold Kristjuhan, 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'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Teia Friedenthal

26.05.2025