

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

Kristina Reinmets

**Histooni H3 atsetüleerimise ja RNA polümeraas II subühiku Rpb9 koosmõju transkriptsioonile
pagaripärmis**

Magistritöö

Juhendaja: *Prof.* Arnold Kristjuhan

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS.....	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Kromatiin.....	6
1.1.1 Kromatiini kõrgemat järku struktuur.....	7
1.2 Histooidid.....	8
1.3 Histooidide post-translatsioonilised modifikatsioonid.....	8
1.3.1 Histooidide atsetüleerimine.....	10
1.3.2 Histooidide modifikatsioonimustri muutus transkriptsiooni käigus.....	11
1.4 Valku kodeerivate geenide transkriptsioon.....	13
1.5 RNA polümeraas II.....	15
1.6 Rpb9 – RNA pol II subühik 9.....	16
1.6.1 Rpb9 roll transkriptsiooni initsiatsioonis.....	17
1.6.2 Rpb9 – transkriptsiooni elongatsioon ja selle täpsus.....	18
1.6.3 Rpb9 poolt vahendatud DNA reparatsioon ja geneetiline ebastabiilsus.....	19
2 EKSPERIMENTAALNE OSA.....	21
2.1 Töö eesmärk.....	21
2.2 Materjalid ja meetodika.....	21
2.2.1 Kasutatud <i>S. cerevisiae</i> söötmed.....	21
2.2.2 Kasutatud tüved, praimerid ja plasmiidid.....	22
2.2.3 Mutantset histooidi H3 kodeerivate plasmiidide valmistamine.....	22
2.2.4 Plasmiidivahetus ja kolooniate kontrollimine.....	23
2.2.5 Pärmikultuuri lahjenduste rea analüüs.....	23
2.2.6 Anchor-away ehk tsütoplasmasse sidumise meetod ja tüve valmistamine.....	24
2.2.7 Tsütoplasmasse sidumise ja plasmiidivahetuse süsteemi kombineerimine.....	25
2.2.8 Tsütoplasmasse sidumise meetodi efektiivsuse kontrollimine.....	27
2.2.9 GAL10 geeni induktsioon.....	27
2.2.10 RNA eraldamine.....	28
2.3 Tulemused.....	30
2.3.1 Mutantset histooidi H3 kodeerivad plasmiidid.....	30
2.3.2 Histooidi H3 mutatsioonide mõju rakkude elujõulisusele.....	30
2.3.3 Tsütoplasmasse sidumise meetodi pärmitüved ja rapamütsiini testimine.....	32
2.3.4 GAL10 geeni induktsioon.....	35
2.4 Arutelu.....	39
KOKKUVÕTE.....	42
SUMMARY.....	43
KIRJANDUSE LOETELU.....	45
LISAD.....	52
Lisa 1. Drop-out segu koostis SC söötmete jaoks.....	52
Lisa 2. Kasutatud pärmitüved.....	53
Lisa 3. Kasutatud plasmiidid.....	55
Lisa 4. Kasutatud oligonukleotiidid.....	57
TÄNUAVALDUSED.....	58
LIHTLITSENTS.....	59

KASUTATUD LÜHENDID

5 – FOA – *5-fluoroorotic acid*

6 – AU – 6-azauratsiil

ap – aluspaari

BRE – *TFIIB recognition element* (TFIIB poolt ära tuntav element)

CENP-A – *centromere protein A* (tsentromeerne valk A)

CSA, CSB – *Cockayne syndrome group A and B* (Cockayne sündroomi grupp A ja B valgud)

CTD – C-terminal domain (C-terminaalne domeen)

DPE – *downstream promoter element* (allavoolu promootori element)

DSB – *double-strand break* (kaksikahelaline katke)

Gcn5 – *general control of amino-acid synthesis protein 5* (üldise aminohapete sünteesi kontrolli valk 5)

H1 – histoon 1

H2A – histoon H2A

H2B – histoon H2B

H3 – histoon H3

H4 – histoon H4

HAT – *histone acetyltransferase* (histoonide atsetüültransferaas)

HDAC – *histone deacetylase* (histoonide deatsetülaas)

KAT – *K(lysine) acetyltransferase* (lüsiini atsetüültransferaas)

MTE – *motif ten element* (motiiv kümne element)

p – TEFb – *positive transcription elongation factor b* (transkriptsiooni elongatsiooni soodustav faktor b)

RNA pol II – RNA polümeraas II

Rpd3 – *reduced potassium dependency* (vähenenud kaaliumi vajadus), histoonide deatsetülaas

RSC – *remodels the structure of chromatin* (kromatiini struktuuri remodeleerija)

SAGA – *Spt6-Ada-Gcn5-acetyltransferase* (Spt6, Ada ja Gcn5 subühikuid sisaldav atsetüültransferaas)

SDS – *sodium dodecyl sulfate* (naatriumdodetsüülsulfaat)

TAF – *TBP-associated factors* (TBP-ga seonduvad faktorid)

TBP – *TATA-binding protein* (TATA järjestusele seonduv valk)

TCR – *transcription-coupled repair* (transkriptsiooniseoseline reparatsioon)

TFIID – *transcription factor IID* (transkriptsioonifaktor IID)

UAS – *upstream activating sequence* (ülesvoolu aktiveeriv järjestus)

Zn1, Zn2 – tsinki siduvad domeenid 1 ja 2

SISSEJUHATUS

Iga elusorganismi aluseks on geneetilist informatsiooni kandev pärilikkusaine DNA, mille säilitamine, pärandamine ja hästi reguleeritud avaldumine on eksistentsiaalse tähtsusega. Selle eesmärgiga on eukarüootse organismi genoom organiseeritud raku tuumas struktuuriks, mida nimetatakse kromatiiniks. Põhilised valgud, millega on DNA kromatiinis seotud, on histoonid, mis osalevad lisaks DNA pakkimisele ja organiseerimisele ka organismi pärilikkusaine kaitsmises ja geneetilise info avaldumises. Nimelt, histoonidele nagu enamusele rakus sünteesitavatele valkudele, on võimalik lisada erinevaid post-translatsioonilisi modifikatsioone, mis osalevad histoon-DNA interaktsioonide tugevuse ja teiste kromatiinil töötavate valkude seondumise regulatsioonis.

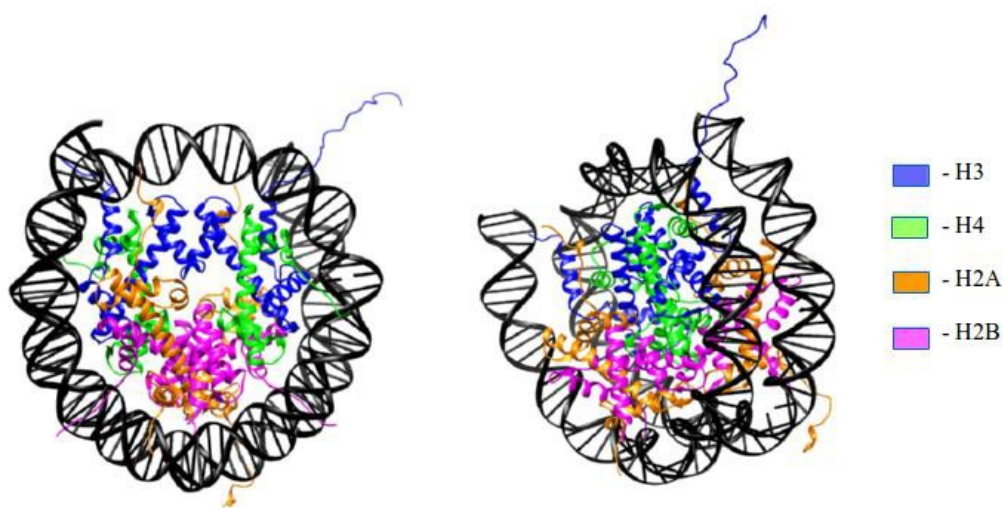
Valke kodeerivate geenide avaldumise esimeseks etapiks on transkriptsioon, mille viib läbi eukarüootsetes rakkudes valgukompleks RNA polümeraas II. Transkriptsiooni toimumine õigel ajal, õigel geenil ning sobival tasemel on oluline tagamaks raku normaalset elutegevust. Põhiliseks viisiks, kuidas eelnimetatud tingimused täidetakse, on histoonide modifikatsioonid, mis osalevad RNA polümeraas II toomisel geenide promootoraladele, DNA-histoonide interaktsioonide nõrgestamises ning tugevdamises, tagamaks geeniekspressiooni regulatsiooni. Transkriptsiooni efektiivne toimumine *in vivo* oleks histoonide modifikatsioonideta võimatu. Seda kinnitab ka asjaolu, et paljudes vähkkasvajates muutuvad histoonimodifikatsioonide mustrid ning viivad geeniekspressiooni kaoseni. Seetõttu, histoonide post-translatsiooniliste modifikatsioonide ja transkriptsiooni vastastikuse mõju mõistmine on oluline lisaks teadusliku huvi rahuldamisele ka farmakoloogiliste võimaluste laiendamiseks.

Käesoleva töö teoreetilises osas antakse ülevaade kromatiini struktuurist, histoonide post-translatsioonilistest modifikatsioonidest ning RNA polümeraas II ja selle subühikust Rpb9 ning nende rollist transkriptsioonis. Töö eksperimentaalses osas uuriti histooni H3 atsetüleerimise ja RNA polümeraas II subühiku Rpb9 koosmõju transkriptsioonile pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*).

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Kromatiin

Eukarüootse raku genoom on organiseeritud ja pakitud struktuuri, mida nimetatakse kromatiiniks. Kromatiini põhiliseks struktuurseks kordusühikuks on nukleosoom, mille valgulise tuumiku moodustavad kahes korduses olevad histoonid H2A, H2B, H3 ja H4. Histonipaar H3-H4 ühineb tetrameeriks ning sellega liituvad H2A-H2B dimeerid, moodustades oktameerse kompleksi. Histonse oktameeri ümber on keerdunud 147 aluspaari DNA-d, mis teeb umbes 1,7 kordse pöörde, orienteerides DNA kaksikheeliksi nukleosoomist eemale uues suunas (Joonis 1) (Kornberg 1977; Luger et al. 1997). Nukleosoomide vahelist DNA-d nimetatakse *linker* DNA-ks, mille pikkus võib olla vastavalt organismile 20-80 aluspaari ning kõrgemates eukarüootides seondub selle DNA-ga histoon H1, aidates organiseerida kromatiini kompaktsemaks struktuuriks (Luger et al. 1997).



Joonis 1. Nukleosoomi struktuur. DNA on kujutatud musta kaksikheeliksina, mis on keritud ümber struktuuri keskel paiknevate histoonide. Joonisel on näha histoonide N-terminaalsete sabade välja ulatumist nukleosoomist. Joonise tegemiseks on kasutatud struktuuri PDB ID: 1AOI (Reinmets 2014).

Nukleosoomid ja nende vahele jääv DNA moodustavad eukarüootse genoomi pakkimise esimese taseme, mida nimetatakse „pärlikee” struktuuriks (ingl. k. „*beads on a string*”) (Olins ja Olins 1974).

1.1.1 Kromatiini kõrgemat järku struktuur

Ligi 40 aastat tagasi näidati, et „pärlikee” struktuuri kondenseerumisel hisooni H1 või Mg^{2+} ioonide abil moodustub 30 nm struktuur, mida nimetati solenoidiks (Finch ja Klug 1976). Solenoidi struktuuri kohaselt paiknevad nukleosoomid kõrvuti, keerdudes vasakukäeliseks heeliksiks ning painutades linker-DNA-d (Widom ja Klug 1985). Järgmisena oli näidatud, et „pärlikee” struktuuri kondensatsioonil võib moodustuda ka siksak-struktuur, mis keerdub samuti vasakukäeliseks heeliksiks, aga omab nõ. kahte alguspunkti ning nukleosoomid on ühendatud sirge linker-DNA-ga ja paiknevad vastakuti (Woodcock et al. 1984; Williams et al. 1986; Schalch et al. 2005). Viimasel aastakümnel hakati pöörama rohkem tähelepanu asjaolule, et 30 nm fiibri moodustumine sõltub olulisel määral tuumade või kromatiini eraldamise tingimustest (eelkõige katioonide kontsentratsioonist kasutatavates lahustes) ning rakkude fikseerimisel toimuvatest füsioloogilistest muutustest (Eltsov et al. 2008). Kromosoomi konformatsiooni määramise (*Chromosome conformation capture* – 3C) meetodi ja selle edasiarenduste (4C, 5C, Hi-C) kasutusele võtmisega on esile kerkimas aina rohkem tulemusi, mis näitavad, et 30 nm fiibrit ei pruugi *in vivo* eksisteerida. *Saccharomyces cerevisiae*-s tehtud 3C uuringus leiti, et kuigi 95 kb pikkune transkriptsiooniliselt aktiivne kromatiini ala on tuumas lõdvalt pakitud struktuurina, siis selle lähedal paiknev AT-rikas ala on küll suurema tihedusega, aga ei vasta siiski tihedusele, mis peaks kirjeldama 30 nm struktuuri (Dekker 2008). 2010. aastal pakuti välja, et kromatiini kondensatsioon ei toimu 30 nm fiibri abil, vaid läbi „polümeeri sulami” mudeli, mille kohaselt moodustavad ruumiliselt lähestikku paiknevad nukleosoomid gloobuleid (Maeshima et al. 2010). Polümeeri sulami mudelis pakuti välja, et gloobulite pinnal paikneb transkriptsiooniliselt aktiivne kromatiin ning geeniekspressiooni vaigistamiseks viiakse vastav kromatiini piirkond gloobuli sisse (Fussner et al. 2011). Kirjeldatud kromatiinigloobulite olemasolu toetavad ka viimaste aastate Hi-C meetodi abil läbi viidud inimgenoomi struktuuri uuringud, mille lahutusvõime on tänu tehnoloogia arengule muutumas aina paremaks (Lieberman-Aiden et al. 2009; Rao et al. 2014).

1.2 Histoovid

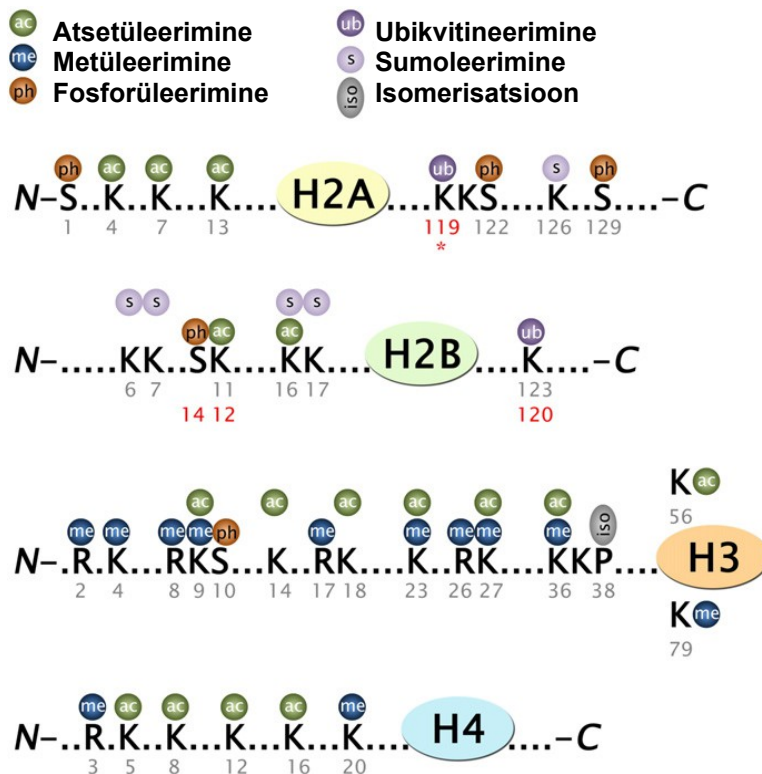
Histoovid on kõrgelt konserveerunud aluselised valgud, mille iseloomulikud histooni voldi motiivid (inlg. k. *histone fold motif*) on olulised nii valk-DNA kui ka histoonidevahelisteks interaktsioonideks. Histooni voldi motiiv moodustab suure osa histoonide C-terminusest ning vaatamata väikesele homoloogiale valkude aminohappelises järjestuses, on struktuurilt väga lähedane kõigis neljas tuumiku histoonis (Arents et al. 1991). Histoovide „sabaks” nimetatakse N-terminaalset domeeni ning histoonil H2A ka C-terminust. Histoovide „sabad” on struktureeritud ja ulatuvad nukleosoomist väljapoole, mistõttu on neil oluline roll nii nukleosoomide vahelistes interaktsioonides kui ka DNA-l opereerivate valkude sidumises (Walter et al. 1995; Lee ja Hayes 1997; Yang et al. 2005). Lisaks osalemisele nukleosoomide vahelistes interaktsioonides, on histoonide sabadel suur tähtsus nukleosoomi stabiliseerimises ehk DNA avatuse reguleerimises. Üheks viisiks nukleosoomi stabiilsuse reguleerimiseks on post-translatsioonilised modifikatsioonid, mida käsitletakse hiljem põhjalikumalt. Histoovide struktuuri olulisust DNA sidumisel näitab ka see, et üheksa kolmeteistkümnest transkriptsioonifaktori TFIID koosseisu kuuluvatest TAF valkudest sisaldavad histooni voldi domeeni (Gangloff et al. 2001). Arvatavasti konkureerivad TAF valgud histoonidega DNA sidumises. See etapp on oluline transkriptsiooni pre-initsiatsiooni kompleksi moodustumisel.

1.3 Histoovide post-translatsioonilised modifikatsioonid

Histoovine, nagu ka kõiki teisi rakus sünteesitavaid valke, on võimalik modifitseerida, lisades aminohapete külghelatele keemilisi rühmi või polüpeptiide (näiteks 76-aminohappelise valgu ubikvitiini). Valkude post-translatsiooniliste modifikatsioonide abil on võimalik reguleerida nende aktiivsuse spetsiifikat ja lokaliseerimist, laiendades selliselt nende funktsionaalsuse spektrit (Prabakaran et al. 2012). Histoovid, olles otseses kontaktis DNA-ga, osalevad nii geeniekspressiooni regulatsioonis, DNA replikatsioonis, reparatsioonis kui ka genoomi pakkimisel ja õigel jaotamisel tütarakkude vahel. Kõik see on võimalik läbi histoonide post-

translatsiooniliste modifikatsioonide, mis eeskätt reguleerivad histoon-DNA interaktsioonide tugevust ja erinevate faktorite ligipääsu DNA-le (Reinmets 2014).

Nagu eelpool välja toodud, ulatuvad histoonide N-terminaalsed sabad nukleosoomist väljapoole, olles heaks sihtmärgiks post-translatsioonilistele modifikatsioonidele. Lisaks N-terminaalsetele otstele modifitseeritakse histoonil H3 ka selle „keha” ning histoonidel H2A ja H2B ka C-terminaalsete otste positsioone. Viimastel aastatel on kirjeldatud mitmeid histoonide „kehal” aset leidvaid positsioone, mis osalevad otseselt nukleosoomi stabiilsuse hoidmises ja reguleerimises (Joonis 2) (Hainer ja Martens 2011; Di Cerbo et al. 2014).



Joonis 2. Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid. Joonisel on näidatud põrnis esinevad histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid. Punasega on märgitud imetajates esinevad alternatiivsed modifikatsioonid (Smolle ja Workman 2013).

1.3.1 Histonide atsetüleerimine

Histonide atsetüleerimine oli esimene kirjeldatud histoonide modifikatsioon (Phillips 1963). Atsetüleerimise käigus lisatakse atsetüülrühm lüsiini külghelale, neutraliseerides selle positiivse laengu, mis nõrgestab nii histoonide interaktsioone DNA-ga kui ka nukleosoomide vahelist kontakti (Lee et al. 1993; Wang ja Hayes 2008). Selle interaktsioone nõrgestava efekti tõttu seostatakse histoonide atsetüleerimist üldiselt transkriptsiooni aktivatsiooniga. Atsetüleeritud histoonid destabiliseerivad nukleosoomi, mis võimaldab kromatiini remodeleerimist ja DNA-ga seonduvate faktorite ligipääsu. Kromatiini remodeleerijad seonduvad tihti ka otseselt atsetüülrühmaga märgistatud histoonidega läbi bromodomeeni (Nagy ja Tora 2007; Carrozza et al. 2003; Mujtaba et al. 2007). Histonide atsetüleerimist viivad läbi valgulised kompleksid, mida nimetatakse HAT-deks (*histone acetyltransferase*). Viimasel ajal on neid hakatud nimetama ka KAT-deks, atsetüülrühma lisamise tõttu lüsiinijääkidele. HAT-de spetsiifika varieerub ja enamus atsetüültransferaase modifitseerivad mitmeid aminohappejääke, aga oluliseks peetakse teiste modifikatsioonide konteksti (Lee ja Workman 2007). Näiteks NuA3 atsetüültransferaas atsetüleerib H3K14 ning vajab selleks H3K4me3 modifikatsiooni olemasolu (Smart et al. 2009). SAGA kompleksi kuuluv katalüütilise aktiivsusega atsetüültransferaas Gcn5 sisaldab ka bromodomeeni, mis on vajalik atsetüleeritud lüsiinide äratundmiseks (Hassan et al. 2002). Gcn5 on ka väga laia spetsiifikaga, atsetüleerides *in vitro* H3 lüsiine K9, K14, K18, K23 ja K36 (Kuo ja Andrews 2013). See näitab, kuidas kromatiinil töötavad valgud on omavahel pidevas suhtluses ning ühe kompleksi töö on signaaliks järgmisele, põhjustades dünaamilise ja hästi reguleeritud sündmuste kaskaadi (Reinmets 2014).

Atsetüleerimine on kõige levinum modifikatsioon, esinedes kõigil neljal histoonil (Joonis 2). Vastsünteesitud histooni H4 atsetüleeritakse lüsiinidel K5 ja K12, värskel H3-l aga lüsiini K56. Need H3 ja H4 atsetüleerimised on vajalikud nukleosoomi moodustamiseks ja eemaldatakse koheselt pärast nende lülitamist kromatiini (Sobel et al. 1995). Histon H3 K56 atsetüleerimine on seotud ka transkriptsiooni regulatsiooniga ja DNA reparatsiooniga (Xu et al. 2005; Masumoto et al. 2005). Lüsiin 56 paikneb histooni H3 kehal ning nukleosoomis jääb see positsioon DNA sisenemiskoha lähedale, seetõttu peetakse H3K56 atsetüleerimist vajalikuks nii-öelda

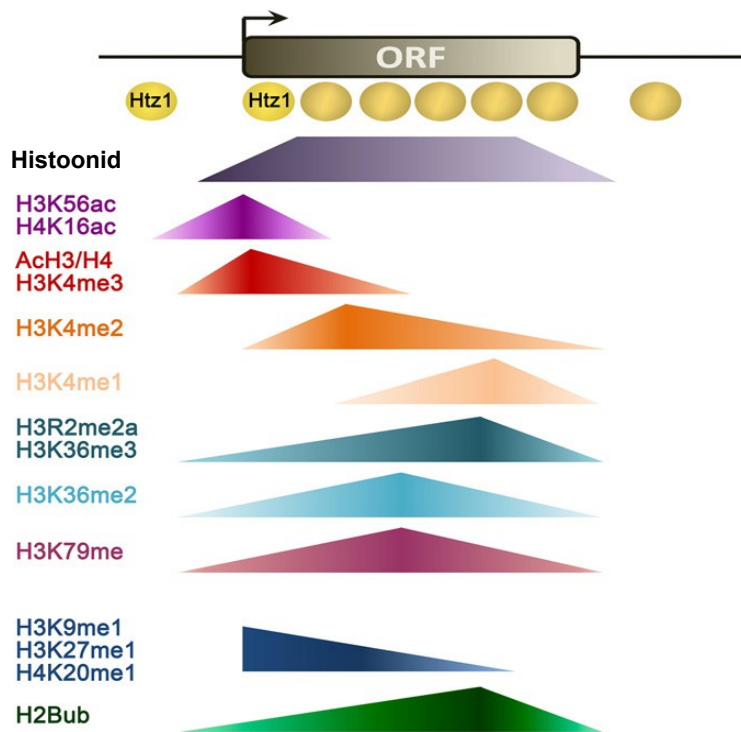
nukleosoomi hingamiseks (Masumoto et al. 2005). Hiljuti on kirjeldatud veel H3 atsetüleeritavaid positsioone, mis paiknev histooni kehal ja osalevad nukleosoomi stabiliseerimises. Nendeks on H3K122 ja H3K64 atsetüleerimised (Tropberger et al. 2013; Di Cerbo et al. 2014).

Histooni H3 lüsiinide K9, K14, K23 ja K27 atsetüleerimine esineb geenide promootoritel ja 5' otstes. H3K18 atsetüleerimine on samuti levinud geenide 5' regioonis, aga puudub promootoritel (Liu et al. 2005). On näidatud, et atsetüleeritud H3K14 on seondumismärgiks kromatiini remodeleerijale RSC (*remodels the structure of chromatin*), mis osaleb geeniaktivsioonis (Kasten et al. 2004). See demonstreerib, kuidas histoonide modifikatsioonidel võib olla spetsiifiline roll, aga samas jäävad nad osaks üldise modifikatsioonimustri loomisel. Hiljuti näidati, et RSC kompleksi kromatiinile toomine läbi H3K14 atsetüleerimise on vajalik ka DNA reparatsiooniks (Duan ja Smerdon 2014). Üheks palju-uuritud histooni H4 atsetüleeritavaks positsiooniks on K16, millel on oluline roll nukleosoomidevaheliste interaktsioonide nõrgestamises. Samuti on näidatud, et H4K16 atsetüleerimine on vajalik efektiivseks DNA reparatsiooniks ja K16 hüpoatsetüleerimist seostatakse ka vananemisega (Shogren-Knaak et al. 2006; Krishnan et al. 2011). Atsetüleerimise tähtsust näitavad ka katsed, milles histooni H4 nelja atsetüleeritava lüsiini muteerimisel ei ole pärmi rakud enam eluvõimelised (Megee et al. 1990).

1.3.2 Histoonide modifikatsioonimustri muutus transkriptsiooni käigus

Histoonide modifikatsioonid ei erine mitte ainult aktiivse ja vaigistatud kromatiini vahel, vaid ka ekspresseeritava geeni siseselt, muutudes koos RNA polümeraasi elongatsiooniga koodeeriva ala 3' suunas (Joonis 3). Nagu eespool mainitud, seostatakse histoonide atsetüleerimist üldiselt avatud kromatiiniga, milles DNA-nukleosoomi vaheline kontakt on nõrgestatud (Wang ja Hayes 2008). Sellele vastavalt on ka näidatud, et transkribeeritavatel geenidel ja nende promootoraladel on histoonide H3 ja H4 üldine atsetüleerituse tase suurenenud. Aktiivsed promootorid ja kodeeriva ala 5' regioonid on märgistatud H3K4me3-ga (Pokholok et al. 2005). H3K4me2 esineb kogu lugemisraami ulatuses ning H3K4me1 on leitud geeni 3' otsas (Liu et al. 2005). H3K36 di- ja trimetüleerimine esineb geenide kehal ja 3' otstes ja vaatamata sellele, et H3K36 metüleerimist

seostatakse üldiselt aktiivselt transkribeeritavate geenidega, on selle sisuline toime kromatiinile hoopis repressiivne. Nimelt on H3K36 di- ja trimetüleerimine signaaliks histoonide H3 ja H4 deatsetüleerimiseks pärast RNA pol II möödumist, sest metüleeritud H3K36-ga seondub Rpd3 deatsetülaas ja histoonidel olevad atsetüülrühmad eemaldatakse (Carrozza et al. 2005; Keogh et al. 2005). H3R2me2a asümmeetriline dimetüleerimine takistab H3K4 trimetüleerimist, mis nagu eespool mainitud, on promootoralade märgiseks ning seetõttu on H3R2me2a levinud geenide keskpaigas ja 3' otsas (Guccione et al. 2007; Kirmizis et al. 2007). H3K79 metüleerimise tähtsust on näidatud DNA reparatsioonil ja rakutsükli regulatsioonis, aga teadmised selle seosest transkriptsiooniga on puudulikud ning vajavad põhjalikumat uurimist. Üldiselt seostatakse H3K79 metüleerimist eukromatiiniga, kuna selle modifikatsiooni levik on väga laialdane (Ng et al. 2003). Üheks huvitavaks modifikatsiooniks on histooni H2BK123 ubikvitineerimine (Joonisel 3 lihtsalt H2Bub), mis esineb nii promootoraladel kui ka lugemisraami siseselt (Batta et al. 2011; Shieh et al. 2011). H2B ubikvitineerimine on seotud elongeeruva RNA pol II-ga ning on vajalik H3K4 di- ja trimetüleerimiseks (Xiao et al. 2005; Robzyk et al. 2000; Wood et al. 2003). Samuti on näidatud, et H2Bub takistab kromatiini kõrgemat järku struktuuri moodustumist, olles selles sarnane H4K16 atsetüleerimisele ning on vajalik ka nukleosoomide taasmoodustumiseks pärast polümeraasi möödumist (Fierz et al. 2011; Fleming et al. 2008; Reinmets 2014).



Joonis 3. Histoone modifikatsioonimustri muutus transkriptsiooni käigus. Joonisel on näidatud erinevate transkriptsiooniseoseliste modifikatsioonide tasemeid ühe geeni piires. Ac tähendab atsetüleerimist, me – metüleerimist, ub – ubikvitineerimist. Htz1 on promootorala märgistav histooni variant. Tumesinisega märgitud H3K9, H3K27 ja H4K20 metüleerimine esineb ainult kõrgemates eukarüootides (Smolle ja Workman 2013).

1.4 Valku kodeerivate geenide transkriptsioon

Transkriptsiooniks nimetatakse protsessi, mille käigus sünteesitakse DNA ühele ahelale komplementaarne üheaahelaline RNA molekul, milles tüüin (T) on asendatud uratsiiliga (U). Eukarüootses rakus sünteesib valku kodeerivat mRNA-d RNA polümeraas II. Transkriptsiooni saab jagada kolmeks etapiks- initsiatsioon, elongatsioon ja terminatsioon. Initsiatsioon algab preinitsiatsiooni kompleksi moodustumisega promootoril. Promootori all mõeldakse tavaliselt DNA piirkonda, mis on vajalik transkriptsiooni algatamiseks. Eukarüootsed promootorid

koosnevad üldiselt nn. „core” elemendist (mis sisaldab või asub transkriptsiooni alguskoha vahetus läheduses) ja regulaatorsetest elementidest. Regulaatorseid elemente tuntakse mitu – TATA (AT-rikas ala) element, Inr (ingl. k. *initiator*), BRE (ingl. k. *TFIIB recognition element*), DPE (ingl. k. *downstream promoter element*) ja MTE (ingl. k. *motif ten element*) element (Kadonaga 2012). Eukarüootsed promootorid ja nende elementide kompositsioon võivad olla väga erinevad. Vaatamata sellele, et TATA-elementi sisaldavaid promootoreid on eukarüootsetes rakkudes umbes 20%, on just nendelt promootoritelt toimuvat initsiatsiooni uuritud kõige rohkem.

Transkriptsiooni initsiatsioon algab TFIID seondumisega TATA-elementile, mis sõltub TBP-st (ingl. k. *TATA-binding protein*) ja TAF valkudest (*TBP-associated factors*). TFIID toomisele TATA-elementile järgneb teiste basaalse transkriptsioonifaktorite TFIIA, TFIIB, TFIIIE, TFIIF, TFIIH, Mediaatori ja RNA polümeraas II seondumine. Selle käigus moodustuvat kompleksi nimetataksegi preinitsiatsiooni kompleksiks (edaspidi PIC) (Green 2000; Rhee ja Pugh 2012; Poss et al. 2013). Pärast PIC-i moodustumist promootorile, aktiveeritakse helikaasset aktiivsust omav TFIIH, mis avab promootorala DNA ahelad. TFIIH koosseisu kuulub ka RNA pol II subühiku Rpb1 C-terminaalset domeeni (edaspidi CTD) fosforüleeriv kinaas Kin28 (Feaver et al. 1991). Polümeraasi vabanemiseks promootorilt ja üleminekuks elongatsiooni faasi on vajalik vähemalt 12 ribonukleotiidi süntees (Sainsbury et al. 2013). Selline kompleks on juba suhteliselt stabiilselt seotud RNA-ga ja pärast CTD fosforüleerimist on valmis promootorilt edasi liikuma (Hsin ja Manley 2012).

Pärast polümeraasi vabanemist, toimub promootori läheduses seiskumine (paus), mida peetakse elongatsiooni protsessis kriitiliseks etapiks. RNA pol II saab nendest pausidest üle kasutades oma võimet liikuda 3' – 5' suunas või võib vajada TFIIS-i abi RNA 3'-OH otsa paigutamisel aktiivtsentrisse (Saunders et al. 2006). Produktiivseks elongatsiooniks on vajalik selliste faktorite osalemine nagu NELF, DSIF, P-TEFb, TFIIF ja TFIIS. Suure tähtsusega on elongatsiooni reguleerimine läbi CTD kordusjärjestuste fosforüleerimise (Yamada et al. 2006; Saunders et al. 2006; Reinmets 2014).

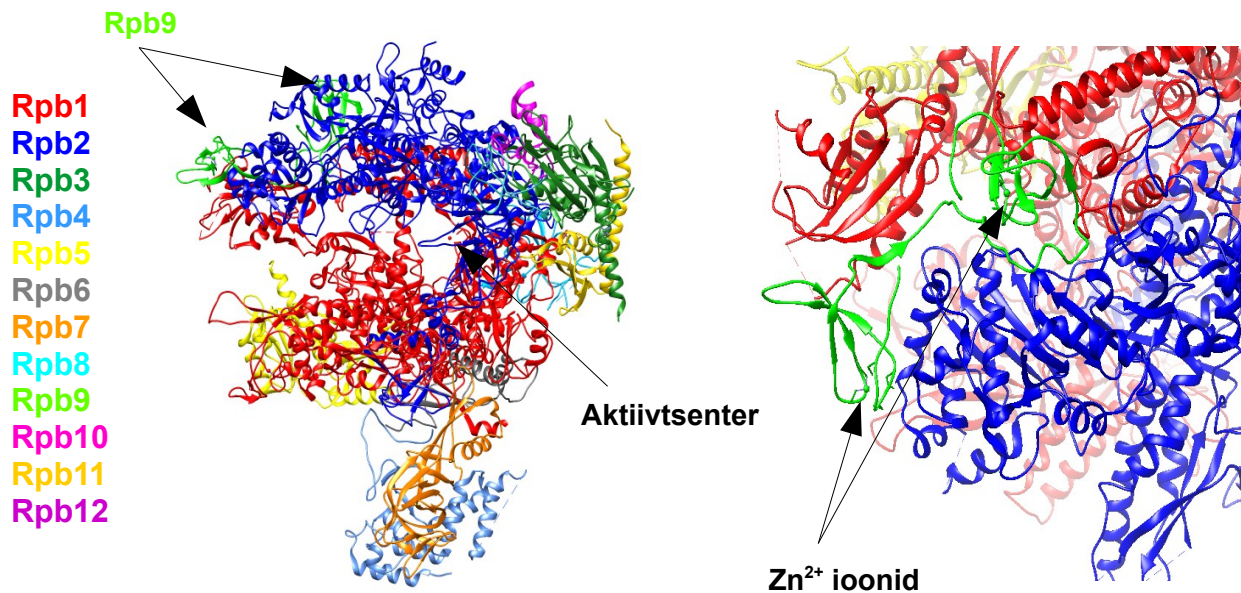
1.5 RNA polümeraas II

Eukarüootides sünteesib mRNA-d 550 kDa suurune RNA polümeraas II. RNA pol II koosneb 12-st subühikust, Rpb1-12, mis on saanud oma nimed vastavalt molekulmassile, suuremast väiksemani. Kõiki 12 subühikut sisaldavat polümeraasi oli raske kristalliseerida, kuna Rpb4 ja Rpb7 moodustavad kaheühikulise kompleksi, mis on võimeline polümeraasi küljest dissotsieeruma. 2003 aastal avaldati esimene RNA polümeraasi täiskompleks Bushnell ja Kornbergi poolt (Bushnell ja Kornberg 2003). Praeguseks on parima lahutuvusega RNA polümeraas II täielik struktuur Meyer-i ja kolleegide poolt 2009. aastal avaldatud 3.88 Å resolutsiooniga struktuur (Meyer et al. 2009).

Struktuurselt koosneb RNA pol II neljast mobiilsest elemendist, mida nimetatakse inglise keeles *core*, *clamp*, *shelf* ja *jaw lobe*. *Core* element ehk polümeraasi südamik koosneb subühikutest Rpb1-3 ja Rpb10-12, millest Rpb1 ja Rpb2 moodustavad aktiivtsentri (Joonis 4). Polümeraasi keskel on sügav lõhe, mille kaudu siseneb DNA aktiivtsentrisse. Lõhe on moodustatud kõigi nelja elemendi poolt ja on näidatud nii selle avatud kui suletud konformatsiooni. *Shelf* ja *jaw lobe* ehk “riiul” ja polümeraasi “lõua” osa on suhteliselt vähe mobiilsed, aga on võimelised pöörlema paralleelselt aktiivtsentriga. *Clamp* ehk “klamber” on ühendatud polümeraasi südamikuga paindlikke motiividega ja saab liikuda kuni 30 Å avades ja sulgedes lõhet. Nagu eespool mainitud, moodustavad Rpb4 ja Rpb7 dimeerse kompleksi, mis on võimeline ülejäänud polümeraasist dissotsieeruma. Rpb4/7 kompleks on vajalik RNA pol II avatud kompleksi moodustumiseks transkriptsiooni initsiatsioonil. On näidatud, et Rpb4/7 osaleb raku elu pikkuse reguleermises läbi mRNA lagundamise. Samuti arvatakse, et see kaheühikuline kompleks osaleb translatsiooni initsiatsioonil ja 3'-otsa protsessivate faktorite toomises polümeraasile (Hahn 2004; Duan et al. 2013; Runner et al. 2008; Harel-Sharvit et al. 2010).

Transkriptsiooni tsükli jooksul toimub RNA pol II fosforüleerimine ja defosforüleerimine. See modifitseerimine toimub Rpb1 CTD-I, mis koosneb YSPTSPS kordustest. Neid seitsme aminohappe kordusi esineb eukarüootides 25-52, pagaripärmis näiteks 26 ja inimeses 52 kordust. Fosforüleerida saab Ser2, Ser5, Ser7 ja Thr4-ja ning vastavalt saadud modifitseerimise mustriks on CTD seondumiskohaks faktoritele, mis on vajalikud initsiatsiooniks, elongatsiooniks,

terminatsiooniks ja mRNA protsessimiseks. Nagu eespool mainitud, preinitsiatsiooni kompleksi moodustumiseks peab CTD olema defosforüleeritud. Promootorilt vabanemiseks on vajalik aga Ser2 fosforüleerimine, elongatsiooni käigus fosforüleeritakse ka Ser5 ning polümeraasi vabanemiseks DNA-lt tuleb CTD uuesti defosforüleerida (Hahn 2004; Hsin ja Manley 2012).



Joonis 4. RNA polümeraas II struktuur. Vasakpoolsel struktuuril on kujutatud RNA pol II külgsuunas. Nooltega on näidatud Mg²⁺ sisaldav aktiivtsenter ja Rpb9 asukoht. Parempoolsel struktuuril on näidatud lähemalt Rpb9 asukohta polümeraasil ülevalt vaadates ning nooltega on märgitud Zn²⁺ioonid Rpb9 Zn-siduvates domeenides. Joonise tegemiseks on kasutatud struktuuri PDB ID: 3FKI (Reinmets 2014).

1.6 Rpb9 – RNA pol II subühik 9

Rpb9 on 122-st aminohappest koosnev 14 kDa valk, mis seondub polümeraasi “lõuale” ja kontakteerub polümeraasi kahe suurima subühikuga Rpb1 ja Rpb2 (Joonis 4). Rpb9 on kõrgelt

konserveerunud ning on näidatud, et inimese Rpb9 on võimeline taastama pärmi Rpb9 deletsiooniga RNA pol II funktsionaalsust (McKune et al. 1995). Rpb9 koosneb kahest tsinki siduvast domeenist – N-terminaalne Zn1 ja C-terminaalne Zn2 domeen ning neid ühendavast struktuuritust *linker*-ist. Tsingi ioonide sidumise eest vastutavad tsüsteiinid (Cys) N-terminaalses domeenis positsioonides 7, 10, 29 ja 32 ning C-terminaalses domeenis positsioonides 75, 78, 103 ja 106. Zn1 ja Zn2 domeenid sisaldavad β -lehti, kumbki kontakteerub kas Rpb1 või Rpb2-ga (Liu et al. 2011). Rpb9 deletsioon ei ole pärmis letaalne, aga põhjustab mitmeid defekte nagu rakkude aeglane kasv optimaalsetes tingimustes, temperatuuri- ja UV-tundlikkus, elongatsiooni inhibeerivate kemikaalide tundlikkus (nt 6-azauratsiil, mükofenoolhape) ja aeglane spooride idanemine (Woychik et al. 1991; Dudley et al. 2005; Gibney et al. 2008; Desmoucelles et al. 2002; Furter-Graves et al. 1994). Vaatamata oma suhteliselt väikesele molekulmassile, on Rpb9-l kirjeldatud mitmeid raku elutegevuseks olulisi funktsioone. Avaldatud tulemused valgu struktuuri ja funktsiooni seoste kohta on kohati vastuolulised, aga üks on selge – Rpb9 osaleb mitme olulise molekulaarse protsessi reguleerimises ja selle valgu funktsiooni kirjeldamine on suure tähtsusega.

1.6.1 Rpb9 roll transkriptsiooni initsiatsioonis

Transkriptsiooni alguskoha täpsus on oluline funktsionaalsete mRNA-de sünteesiks. Teadaolevalt algab initsiatsioon TBP seondumisega TATA-elementidele (või muule reguleerivale elementidele), mis toob kohale teised vajalikud faktorid. Seega, vaatamata sellele, et TBP seondumine TATA-elementidele vastutab polümeraasi üldise positsioneerimise eest, transkriptsiooni initsiatsiooni koha määravad siiski RNA pol II ise ja TFIIB (Li et al. 1994; Furter-Graves et al. 1994). Pagaripärmis algab transkriptsioon tavaliselt 40 – 120 aluspaari TATA-elementidest edasi DNA ahela 3' suunas, vastavalt promootori eripäralt. Rpb9 Δ rakkudes aga kasutab polümeraas lisaks normaalsetele alguskohtadele alternatiivseid, TATA-elementide lähemal asuvaid järjestusi. Sama efekt on ka kahel Rpb9 mutatsioonil, millest üks on Cys7 asendus Phe-ks Zn1 domeenis ning teine mutatsioon on selline, mis põhjustab initsiatsiooni alguskoha nihkumist, on varajane stop-koodon 111-s positsioonis. Defektse või puuduva Rpb9-ga polümeraasi initsiatsiooni alguskoha nihkumist on näidatud nii *in vivo* kui *in vitro*, kasutades erinevate geenide promootoreid. See

näitab, et Rpb9 osaleb RNA pol II positsioneerimisel TATA-elementi suhtes ja on vajalik transkriptsiooni initsiatsiooniks optimaalsetest kohtadest (Furter-Graves et al. 1991, 1994; Hull et al. 1995; Sun et al. 1996) . Kuna mutatsioon Rpb9 Zn1 domeenis põhjustab samade alternatiivsete transkriptsiooni alguskohtade kasutamist, mis Rpb9 deletsioongi ning C-terminuse lõikamine põhjustab samuti initsiatsiooni koha nihet, võiks arvata, et selle funktsiooni omistamine valgu konkreetsele piirkonnale on raskendatud. Hilisemad komplementatsiooni katsed on aga näitanud, et plasmiidilt ekspresseeritud Rpb9 Zn1 domeen on võimeline taastama *rpb9Δ* rakkude normaalset initsiatsioonimustrit (Hemming et al. 2000).

1.6.2 Rpb9 – transkriptsiooni elongatsioon ja selle täpsus

Lisaks rollile transkriptsiooni initsiatsioonis, on näidatud, et Rpb9 osaleb ka elongatsioonis. Esimestena pöörasid sellele tähelepanu D. Awrey kolleegidega 1997. aastal, kui nad näitasid, et RNA pol II Δ Rpb9 peatub transkriptsiooni blokeerivatel järjestustel palju harvemini kui metsiktüüpi polümeraas. Nii Rpb9 Δ kui ka normaalse polümeraasi erireaktiivsus oli sama, mis tähendab, et RNA pol II Δ Rpb9 ei ole normaalsest polümeraasist kiirem vaid lihtsalt ei tunne takistusi ära või on üleminek peatumiseks vajalikku konformatsiooni raskendatud. Samuti näidati nimetatud publikatsioonis, et kui RNA pol II Δ Rpb9 siiski peatub ja läheb üle aresti konformatsiooni, on selle vabastamine faktori TFIIS-i poolt raskendatud (Awrey et al. 1997). *In vitro* katsete põhjal on välja pakutud, et normaalseks elongatsiooniks võib oluline olla C-terminaalne Zn2 domeen. Polümeraas, mille Rpb9 sisaldab mutatsioone Zn2 domeenis või konserveerunud piirkonnas linker-järjestuses, ei reageeri TFIIS-i stimulatsioonile (Hemming ja Edwards 2000). Samas on avaldatud ka tulemusi, kus on näidatud, et just N-terminuse mutandid on tundlikud elongatsioonimürkidele MPA (mükofenoolhape) ja 6-AU (6-azauratsiil) (Li S et al. 2006). Arvatavasti erinevad tulemused katsetes kasutatavate pärmitüvede iseärasuste tõttu, mis teeb Rpb9 subühiku funktsiooni iseloomustamise veelgi raskemaks.

On näidatud, et *rpb9Δ* rakkudes sünteesitud transkriptides esinevad valesi sisestatud nukelotiidid tihedamini, kui normaalse polümeraasi poolt sünteesitutes. Samade katsete raames näidati ka, et

elongatsioonifaktori TFIIIS deletsioon mõjutab transkriptsiooni täpsust vähemal määral kui Rpb9 Δ (Nesser et al. 2006). Autorid pakkusid välja kolm võimalikku viisi, kuidas Rpb9 võib osaleda transkriptsiooni elongatsioonis ja selle täpsuse kontrollimises. Esiteks pakuti välja, et Rpb9 võib osaleda õige nukleotiidi lülitamisel sünteesitavasse mRNA-sse, aga see tähendaks ulatuslikke konformatsioonilisi muutusi. Teiseks, arvestades Rpb9 positsiooni polümeraasil, on võimalikud interaktsioonid näiteks kromatiini remodeleerivate kompleksitega, histoonide modifitseerijatega või Elongaator kompleksiga (Van Mullem et al. 2002). Kolmandaks võimaluseks on see, et Rpb9 on vajalik RNA pol II eksonukleaaaseks aktiivsuseks ja seega valesi sünteesitud nukleotiidide välja lõikamiseks. Ühes hiljem avaldatud artiklis on aga näidatud, et Nesser-i ja tema kolleegide välja pakutud mehhanism, kus Rpb9 osaleb nukleotiidide lülitamises mRNA ahelasse võib olla võimalik just konformatsiooniliste muutuste tõttu. Rpb9 C-terminaalne Zn2 domeen paikneb suhtelises läheduses “trigger loop”-i nimelisele struktuursele üksusele, mis läbib konformatsioonilisi muutusi iga nukleotiidi lülitamisel ahelasse (Walmacq C et al. 2009). Samuti näidati, et Rpb9 on vajalik TFIIIS-i poolt stimuleeritud valede nukleotiidide välja lõikamiseks mRNA ahelast. See seletab ka, miks *rpb9 Δ* rakkudes esineb rohkem valesid nukleotiide sisaldavaid transkripte (Knippa ja Peterson 2013; Reinmets 2014).

1.6.3 Rpb9 poolt vahendatud DNA reparatsioon ja geneetiline ebastabiilsus

Imetajarakkudes vastutavad transkriptsiooniseoselise DNA reparatsiooni (*TCR, transcription coupled repair*) eest kaks valku – CSA ja CSB (ingl. k. *Cockayne syndrome group A and B*). *S. cerevisiae*-s on samuti kaks transkriptsiooniseoselist DNA reparatsiooni rada, millest üks on vahendatud Rad26 ja teine Rpb9 poolt. Rad26 on inimese CSB valgu homoloog ning vastutab reparatsiooni eest, mis toimub nii promootoralas kui ka geeni kodeerivas osas. Rpb9-vahendatud reparatsioon on aga koondunud pigem geeni kodeerivale alale. Mõlemad reparatsioonimehhanismid on kasutatavad transkribeeritava ahela vigade detekteerimiseks ja parandamiseks ning on näidatud, et reparatsioonimuster võib varieeruda erinevatel promootoritel vastavalt sellele, milliseid elemente (TATA, UAS – *upstream activating sequence*) need sisaldavad (Li S ja Smerdon MJ 2002, 2004; Li S et al. 2006). On välja pakutud, et Rpb9 osaleb

DNA parandamises läbi oma funktsiooni transkriptsiooni elongatsioonis. Need järeldused on tehtud katsetest, milles *rpb9Δrad26Δ* rakkudele lisatud *spt4* geeni deletsioon, mis soodustab RNA pol II elongatsiooni, taastab rakkude võimet UV-kahjustustest üle saada (Li S et al. 2006). Samuti on näidatud, et Rpb9 on vajalik RNA pol II suurima subühiku, Rpb1, degradeerimiseks vastusena UV-kahjustustele ning on välja pakutud, et selles osaleb Rpb9 Zn2 domeen (Chen et al. 2007).

Eelmise aasta lõpus oli publitseeritud artikkel, milles Irene Felipe-Abrio koos kolleegidega näitas, et *RPB9* deletsioon suurendab geneetilist ebastabiilsust põhjustades suuremat tundlikkust DNA kahjustuste suhtes, kõrgemat rekombinatsiooni taset rakkudes ning sõltuvust kaksikahelaliste katkete reparatsioonist ellu jäämiseks (Felipe-Abrio et al. 2014). Kuigi loogiline mõtlemine võiks viia järeldusele, et *rpb9Δ* rakkude geneetiline ebastabiilsus on põhjustatud puuduliku TCR mehhanismi poolt, pööravad autorid tähelepanu faktile, et *rad26Δ* rakkudel ei esine hüper-rekombinatsiooni nähtust (González-Barrera et al. 2002). Selle asemel näitasid autorid 2D elektroforeesi meetodil, et *RPB9* deletsioon põhjustab replikatsioonikahvli liikumise aeglustumise ning see võib põhjustada DNA ahela katkemise ja rekombinatsiooni aktiveerimise.

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida histooni H3 atsetüleerimise ja RNA polümeraas II subühiku Rpb9 koosmõju transkriptsioonile mudelorganismis *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Kasutatud *S. cerevisiae* söötmed

S. cerevisiae tüved kasvatati YPD (*yeast extract, peptone, dextrose*) tard – [agar 20 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l (*LAB MTM*), pärmiekstrakt 10 g/l (*LAB MTM*), glükoos 20 g/l (*Medipharmia*)] ja vedelsöötmes [mükoloogiline peptoon 20 g/l (*LAB MTM*), pärmiekstrakt 10 g/l (*LAB MTM*), glükoos 20 g/l või galaktoos 20 g/l (*Medipharmia*)].

Modifitseeritud tüvede konstrueerimisel kasvatati pärmis transformeerunud rakkude selekteerimiseks – HIS SC (*Synthetic complete*) agarsöötmele [agar 20 g/l (*LAB MTM*), YNB (*Yeast nitrogen base, AppliChem*) 6,7 g/l, glükoos 20 g/l (*Medipharmia*), adeniin 20 µg/ml (*Sigma[®]*), uratsiil 20 µg/ml (*SERVA*), trüptofaan 40 µg/ml (*AppliChem*), leutsiin 80 µg/ml (*AppliChem*) ja SC (– URA – ADE – HIS – LEU – TRP) segu (Lisa 1)]. URA3 seleksioonimarkeriga plasmidi puudumist rakkudes kontrolliti 5-FOA-d (*5-fluoroorotci acid*) sisaldaval SC agarsöötmele [5-FOA 1 mg/ml (*Toronto Research Chemicals Inc.*), YNB 6,7 g/l, agar 2%, glükoos 2%, nukleotiidid ja aminohapped – adeniin 20 µg/ml, uratsiil 80 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, histidiin 40 µg/ml (*SERVA*), trüptofaan 40 µg/ml ja SC (– URA – ADE – HIS – LEU – TRP) segu].

Katsetes, kus kasutati tsütoplasmasse sidumise meetodit, kasvatati vastavaid tüvesid rapamütsiini (*Cayman Chemical Company*, lõppkontsentratsioon 100 nM) sisaldavatel YPD agarsöötmetel või YPD vedelsöötmes. YPD vedelsöötmesse oli lisatud eelnevalt 100% -se DMSO-ga (dimetüülsulfoksiid, *Sigma*[®]) lahjendatud rapamütsiin või ainult DMSO (lõppkontsentratsiooniga 1%).

2.2.2 Kasutatud tüved, praimerid ja plasmiidid

Antud töös kasutati *prof. Arnold Kristjuhani* uurimusgrupis valmistatud pärmitüvesid AKY217, AKY796 ja AKY1037 ning *EUROSCARF* (*European Saccharomyces cerevisiae archive for functional analysis*) kollektsoonist hangitud tüve HHY168 põhjal valmistatud tüvesid. Kõik käesolevas töös kasutatud tüved on kirjeldatud tabelis Lisa 2.

Töös kasutatud plasmiidid olid valmistatud *HIS3* markergeeniga pRS413 plasmiiidi põhjal, kuhu viidi *S. cerevisiae* histooni H4 geen ning muteeritud ja 3F12-epitooopjärjestusega märgitud histooni H3 geen. Tsütoplasmasse sidumise meetodiks vajaliku tüve valmistamiseks kasutati *EUROSCARF* kollektsoonist saadud plasmiiidi pFA6a-FRB-HIS3MX põhjal valmistatud plasmiiidi, milles *HIS3* markergeen oli vahetatud *hphMX* markergeeni vastu. Kõik käesolevas töös kasutatud ja valmistatud plasmiidid ja praimerid on välja toodud tabelites Lisa 3 ja Lisa 4.

2.2.3 Mutantset histooni H3 kodeerivate plasmiidide valmistamine

Käesoleva töö raames oli läbi viidud histooni H3 atsetüleeritavate lüsiinide süstemaatiline muteerimine arginiiniks, mis mimikeerib mitteatsetüleeritud lüsiini. Selle käigus kombineeriti lüsiinide K9, K14, K18, K23 ja K27 mutatsioonid alustades kahe lüsiini muteerimisest kuni kõigi viie nimetatud lüsiini muteerimiseni. Plasmiidid konstrueeriti *overlap extension PCR* meetodil (Bryksin ja Matsumura 2010). Nimetatud meetod põhineb insert DNA kasutamisel praimerina PCR reaktsioonis plasmiiidi sünteesimisel. Antud töös valmistati inserti kasutades kõigepealt

selliseid plasmide, mis sisaldasid histooni H3 geeni ühega viiest lüsiin-arginiiniks mutatsioonist ja kombineeriti see ülejäänud nelja mutatsiooniga. Saadud plasmid, mis sisaldas H3 geeni kahe lüsiin-arginiiniks mutatsiooniga, kasutati kolme mutatsiooniga H3 geeni sünteesimiseks. Samasugusel viisil valmistati ka järgnevad plasmidid kuni kõik viis uuritavat positsiooni olid muteeritud arginiiniks. Kokku valmistati 26 plasmidi, mida kasutati järgnevates katsetes (Lisa 3).

2.2.4 Plasmidivahetus ja kolooniate kontrollimine

Tüvesid AKY796, AKY1037, AKY1158, AKY1159 ja AKY1160 kasvatati üleöö 20 ml-s YPD vedelsöötmes temperatuuril 30 °C tiheduseni 5×10^7 rakku/ml. Rakukultuuri tsentrifugeeriti 3 minutit 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F), supernatant eemaldati, lisati 10 ml 0,1 M liitiumatsetaat + TE lahust ning tsentrifugeeriti veel 3 minutit sama kiirusega. Seejärel suspendeeriti rakke 600 µl 0,1 M liitiumatsetaat + TE lahuses ning lisati 100 µl *carrier DNA*-d (2 mg/ml), mis oli eelnevalt denatureeritud 7 minutit temperatuuril 95 °C. Edasi segati kokku transformatsioonisegu: 2 µl (1 µg/ µl) plasmidi ja 50 µl valmistatud kompetentseid rakke. Transformatsioonisegu hoiti 5 minutit toatemperatuuril ja seejärel lisati 300 µl LiOAc + TE + PEG lahust (0,1 M liitiumatsetaat + TE, 40% PEG (Mw = 40 000)). Segu väristati vorteksil ning hoiti toatemperatuuril 15 minutit. Edasi lisati 30 µl 100% DMSO-d, segati vorteksil ja inkubeeriti 10 minutit temperatuuril 42 °C. Seejärel tsentrifugeeriti rakke 1600 g-ga, supernatant eemaldati, rakusade suspendeeriti 150 µl vees ja külvati – HIS SC tassidele. Transformatsioonist saadud kolooniad külvati ümber 5-FOA SC tassidele, et eemaldada rakkudest vana, URA3-e ja metsiktüüpi histooni kodeerivat plasmidi.

2.2.5 Pärmikultuuri lahjenduste rea analüüs

Pärmitüvede kasvamisvõime hindamiseks kasutati rakukultuuri lahjenduste rea analüüsi. Rakud kasvatati 5 ml-s YPD vedelsöötmes temperatuuril 30 °C üleöö tiheduseni $1-3 \times 10^7$. Rakukultuuri tihedust mõõdeti rakuloenduriga (*ZTM COULTER COUNTER[®] Cell and Particle Counter, Beckman Coulter*) ning valmistati rida kümnekordseid lahjendusi vees nii, et kõige tihedam

lahjendus sisaldaks 10 000 rakku/ μ l ja kõige hõredam 1 rakk/ μ l. Seejärel kanti lahjendatud rakukultuurid 5 μ l tilkadena soovitud agarplaatidele, inkubeeriti temperatuuril 30 °C kolm kuni viis päeva, pildistati agartasse ning analüüsiti rakkude kasvu võrreldes kontrolltüvedega.

2.2.6 *Anchor-away* ehk tsütoplasmasse sidumise meetod ja tüve valmistamine

Anchor-away (edaspidi tsütoplasmasse sidumine) meetodit kirjeldati esmakordselt 2008. aastal Ulrich K. Laemmli rühma poolt ning see võimaldab tuumas lokaliseeruvaid valke tsütoplasmasse transportida, takistades sellega nende funktsiooni (Haruki et al. 2008). Meetod seisneb kahe rapamütsiini siduva domeeni interaktsioonis rapamütsiini olemasolul rakus. Üks selline domeen, milleks on inimese mTOR rapamütsiini siduv domeen – FRB, lisatakse uuritava valgu C-terminusse ning teine, milleks on inimese Fkbp12, on lisatud ribosoomi suure subühiku valgule Rpl13a.

RPB9 geenile rapamütsiini siduva domeeni FRB järjestuse lisamiseks viidi läbi PCR reaktsioon, kus matriitsina kasutati FRB järjestust kodeerivat plasmidi pFA6a-FRB-hphMX. Praimerid Rpb9-FRB-F (5' GCTCACACATATTTACTTCAGATCAAAAAACAAAAGGACGCAGTTT TCAGGTCGACGGATCCCCGGGTT 3') ja Rpb9-FRB-R (5' AGTCCCATTTTCTCTCCCTC TGTCATTAATTTTGAAAGTTCGTTGAGCACTCGATGAATTCGAGCTCGTT 3') sisaldasid *RPB9* geeni ja selle terminaatoriga homoloogset ala, mis võimaldas FRB ja markergeeni viimist genoomi homoloogse rekombinatsiooni abil. PCRi reaktsioon viidi läbi 50 μ l-s ning reaktsioonisegu sisaldas 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 2 μ M primereid RPB9-FRB-F ja RPB9-FRB-R, 1x Pfu puhvrit (*Fermentas*, Leedu), 2,5 U Pfu DNA polümeraasi (*Fermentas*, Leedu), 1 ng plasmidi ja lõppmahuni vett.

PCR produkti olemasolu ja pikkust kontrolliti geelelektroforeesiga ning seejärel sadestati ja lahustati 25 μ l-s vees. Saadud DNA transformeeriti rakkudesse elektroporatsiooni meetodil.

2.2.6.1 Pärmirakkude elektroporatsioon ja kolooniate kontrollimine

Tüve HHY168 kasvatati YPD vedelsöötmes üleöö temperatuuril 30 °C kuni tiheduseni 1 x 10⁸ rakku/ml. Rakukultuuri tihedust mõõdeti rakuloenduriga. Seejärel rakukultuuri tsentrifugeeriti 5 minutit 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F), supernatant eemaldati, rakud suspendeeriti 9 ml-s TE-s, lisati 1 ml 1 M liitiumatsetaati ning jäeti loksuma veel 45 minutiks kiirusega 100 rpm (*New Brunswick Scientific Excella™ E25*). 45 minuti möödudes lisati 250 µl 1 M DTT (ditiotreitol) ja jäeti loksuma veel 15 minutiks. Edasi lisati rakkudele 40 ml vett ja tsentrifugeeriti 5 minutit. Seejärel pesti ja tsentrifugeeriti rakke 2 korda 50 ml jääkülma veega. Alates sellest hetkest hoiti rakke jääl. Rakud suspendeeriti 1 ml jääkülmas 1 M sorbitoolis, tõsteti 1,5 ml reaktsioonituubi ja tsentrifugeeriti 1 minut 3300 g-ga. Supernatant eemaldati ja korrati viimast etappi. Seejärel lisati rakkudele 50 µl 1 M sorbitooli, suspendeeriti ja tõsteti saadud tihedast rakusegust 40 µl uude reaktsioonituubi. Rakkudele lisati 15 µl PCRi produkti ning tõsteti saadud segu 2 mm elektroporatsiooni küvettidesse. Elektroporeerimine viidi läbi poraatoriga (*Bio-Rad Gene Pulser Xcell*) ja kasutati pärmile mõeldud eelseadistatud programmi. Pärast poreerimist jäeti rakud 20 minutiks jääle, seejärel tõsteti need 1,5 ml reaktsioonituubi ja tsentrifugeeriti 1 minut 3300 g-ga. Seejärel supernatant eemaldati, rakusade suspendeeriti 100 µl-s vees ning külvati välja YPD tardsöötmele. Järgmisel päeval tembeldati tihedaks kasvanud rakud antibiootikumi hügromütsiin B-d (200 µg/ml) sisaldavale selektiivsöötmele ja inkubeeriti 3 päeva temperatuuril 30°C.

Selektiivtassil saadud kolooniatest eraldati DNA 0,2M LiOAc + 1 % SDS lahusega ja kontrolliti PCR-ga, kasutades praimereid, millest üks seondub *RPB9* geeni kodeerivale alale ja teine plasmiidilt amplifitseeritud järjestusele (*RPB9-N71-F* ja *ADH1-Ctrl-R*, Lisa 4) (Lõoke et al. 2011). Saadud tüve (AKY1116) kasutati plasmiidivahetussüsteemiga pärmitüve valmistamiseks.

2.2.7 Tsütoplasmasse sidumise ja plasmiidivahetuse süsteemi kombineerimine

Käesolevas töös sooviti uurida Rpb9 funktsiooni histooni H3 mutatsioonide kontekstis ja sellest lähtuvalt oli vajalik luua selline tüvi, mis võimaldaks metsiktüüpi histoonide vahetamist

mutantsete vastu ning oleks funktsionaalne ka tsütoplasmasse sidumise meetod, et tekitada *rpb9Δ* sarnane fenotüüp pärast histoonide vahetamist. Tsütoplasmasse sidumise meetodi ja plasmidi vahetuse süsteemi kombineerimiseks ristati tüve AKY1116, mis võimaldab Rpb9 eemaldamist RNA pol II kompleksist rapamütsiini lisamisel kasvukeskkonda, tüvega AKY217, mis võimaldab vahetada histoone H3 ja H4 kodeerivat plasmidi.

Tüve AKY1116 ristati tüvega AKY217 YPD agarsöötmele ja inkubeeriti temperatuuril 30 °C üks ööpäev. Järgmisel päeval tembeldati rakud antibiootikume HGB (hügromütsiin B, 200 µg/ml) ja G418 (genetitsiin 418, 400 µg/ml) sisaldavale YPD agarsöötmele, et selekteerida diploidseid rakke. HGB resistentsusgeen oli pärit tüvest AKY1116 ja G418 resistentsusgeen oli algselt kodeeritud AKY217 genoomis. Selektiivsöötmele tembeldatud rakud inkubeeriti temperatuuril 30 °C kaks päeva. Seejärel külvati diploidseid rakke sporulatsioonitassile (pärmiekstrakt 1 g/l, kaaliumatsetaat 10 g/l, glükoos 0.5 g/l, agar 20 g/l, adeniin 5 mg/l, histidiin 10 mg/l) ning inkubeeriti temperatuuril 30 °C 5 päeva, võimaldades rakkudel läbida sporulatsiooni. Spooride olemasolu kontrolliti valgusmikroskoobi abil. Seejärel võeti sporulatsioonitassilt rakke ja suspendeeriti need 100 µl-s vees. Suspensioonile lisati 1 µl zümolaasi (10mg/ml) rakukesta lagundamiseks, suspendeeriti koheselt, aga õrnalt paar korda ning inkubeeriti 2 minutit toatemperatuuril. Seejärel võeti 15 µl suspensiooni ja tilgutati see YPD agarsöötmele ning kasutati tetraadide otsingulana. Tetraadide eraldamiseks kasutati mikroskoopi *Singer MSM System 300*. Laiali külvatud spooridega tase inkubeeriti temperatuuril 30 °C kolm päeva ning seejärel teostati spoorianalüüs, tembeldades kolooniad erinevatele selektiivtassidele, kontrollimaks markergeenide olemasolu ja aukuotroofsust teatud ainete suhtes (HGB, G418 või NAT sisaldavatel YPD agartassidel ning -URA, -TRP ja -LEU tassidel). *tor1-1* mutatsiooni ehk resistentsust rapamütsiini suhtes kontrolliti 100 nM rapamütsiini sisaldavatel YPD agartassidel. Läbi viidud ristamisest saadi edasisteks katseteks kolm tüve, millest üks oli funktsionaalse tsütoplasmasse sidumise süsteemiga tüvi (AKY1158) ja võimaldab Rpb9 valgu eemaldamist RNA pol II kompleksist ning kaks tüve on kontrolltüved, mis sisaldavad ainult ühte rapamütsiini siduvat domeeni, lisatud kas Rpb9 (AKY1159) või Rpl13a C-terminusse (AKY1160).

2.2.8 Tsütoplasmasse sidumise meetodi efektiivsuse kontrollimine

Valgu tsütoplasmasse sidumise meetodi töötamise kontrollimiseks valmistatud tüvedes teostati lahjenduste rea analüüs 100 nM rapamütsiini sisaldavatel YPD ja tavalistel YPD agartassidel, inkubeerides tase temperatuuril 30 °C või 37 °C. Kuna *rpb9Δ* mutansed rakud on teadaolevalt temperatuuritundlikud, siis oli võimalik kasutada 37 °C kui test-tingimust rapamütsiini efektiivsuse kontrollimiseks soovitud fenotüübi tekitamises.

Rapamütsiini mõjumise kiiruse testimiseks valmistatud tüvedes teostati kasvukiiruse mõõtmise katse. Kõik tüved kasvatati üleöö loksutil 3 ml-s YPD vedelsöötmes temperatuuril 30 °C ligikaudse tiheduseni 1×10^7 rakku/ml. Rakukultuuride tihedust mõõdeti rakuloenduriga ning lahjendati tiheduseni 6×10^6 rakku/ml 2 ml YPD vedelsöötmesse. Rakkude kasvukiiruse leidmiseks mõõdeti rakukultuuri tihedust iga 30 minuti möödudes alates 0h kuni 3h ajapunktini ning seejärel iga tunni möödudes kuni 8h ajapunktini. Graafikute valmistamiseks kasutati programmi *LibreOffice Calc*.

2.2.9 *GAL10* geeni induktsioon

Tsütoplasmasse sidumise meetod võimaldas jäljendada konstrueeritud tüves RNA pol II Δ Rpb9 fenotüüpi ning uurida transkriptsiooni kromatiinil, kus H3 atsetüleerimine oli häiritud. Rakud kasvatati üleöö loksutil 30 ml-s YPD vedelsöötmes temperatuuril 30 °C ligikaudse tiheduseni $4 - 5 \times 10^7$ rakku/ml. Rakukultuuri täpset tihedust mõõdeti rakuloenduriga ning pandi kasvama 25 ml-sse 100 nM rapamütsiini (DMSO-s lahustatud) või 1% DMSO-d sisaldavasse YPD vedelsöötmesse, et kultuuri tihedus oleks 3×10^6 rakku/ml. Rakke loksutati temperatuuril 30 °C kaks tundi, lastes rapamütsiinil mõjuda. Seejärel tsentrifugiti rakud 5 minutit 1500 rpm-ga (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F), supernatant eemaldati ning rakuadet pesti 10 ml veega tsentrifugides veelkord 5 minutit. Seejärel suspendeeriti rakud 10 ml-s vees ning loksutati 15 minutit, et pesta maha raku pinnal olevad glükoosi molekulid. 15 minuti möödudes tsentrifugiti rakud 5 minutit 1500 rpm-ga (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F) ja pesti 10 ml veega. Seejärel suspendeeriti rakud 25 ml-s 2 % galaktoosiga YPD vedelsöötmes, kuhu oli lisatud rapamütsiini

või galaktoosiga YPD kontrollsöötmes, mis sisaldas ainult 1% DMSO-d. *GAL10* geeni indutseerimise detekteerimiseks võeti ajapunkte 0h (galaktoosiga söötmesse kasvama panemisel), 1h, 2h, 4h, 6h ja üleöö (20-24h). Igas ajapunktis võeti 2 ml rakukultuuri RNA eraldamiseks, mida tsentrifuugiti 3 minutit 2000 rpm-ga (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F), pesti 2 ml veega, supernatant eemaldati ning rakuadeti säilitati temperatuuril -80 °C kuni kõikide ajapunktide proovid olid võetud.

2.2.10 RNA eraldamine

Rakusade suspendeeriti 600 µl-s RNA eraldamise puhvris (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 5% SDS). Seejärel lisati 600 µl happelist fenool: kloroformi suhtes 1:1 (*Applichem*), segu väristati vortexil ja inkubeeriti 6 minutit toatemperatuuril rakkude lüüsimiseks. Rakususpensioonile lisati 1,5 g klaaskuule [0,5 mm *Glass beads (Soda Lime)*, *Biospec Products Inc.*] ning väristati vortexil 2 x 2 minutit. Supernatant (umbes 800 µl) kanti üle 1,5 ml *Eppendorf* tuubi ning tsentrifuugiti lauafuugiga 3 minutit maksimum g-ga (11 600). Vesifaas tõsteti ümber uude 1,5 ml tuubi ning lisati võrdses mahus kloroformi. Segu väristati vortexil ning tsentrifuugiti lauafuugiga 3 minutit maksimum kiirusel (11 600 g). Vesifaas tõsteti veel kord uude 1,5 ml katsetuubi ning eraldatud nukleiinhapped sadestati lisades 1/10 mahust 3 M NaOAc ja 3 mahtu 96 % etanooli ja inkubeerides temperatuuril -80 °C 1 tund või kauem. Seejärel tsentrifuugiti proove lauafuugiga 15 minutit temperatuuril + 4 °C maksimum kiirusel, supernatant eemaldati ning pesti 200 µl 70 % külma etanooliga. Proovid fuugiti 3 minutit lauafuugiga maksimum kiirusel, supernatant eemaldati ja etanoolijäägid aurutati inkubeerides RNA-d 37 °C termostaadis. Seejärel lahustati RNA 30 µl-s vees, millest 21 µl kasutati DNase I töötuse tegemiseks. DNase I töötuse viidi läbi kogumahus 30 µl, mis sisaldas 21 µl vees lahustatud RNA-d, 1 x DNase I reaktsioonipuhvrit ning 6 µl DNase I (*Thermo Scientific*, 1 U/µl). DNase I reaktsiooni peatamiseks lisati reaktsioonisegusse 3 µl EDTA-d (lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM) ning inkubeeriti 10 minutit temperatuuril 65 °C. Seejärel sadestati RNA-d lisades 1/10 mahust 3 M NaOAc ja 3 mahtu 96 % etanooli ja inkubeeriti temperatuuril -80 °C kuni 1h. Proovid tsentrifuugiti lauafuugiga 15 minutit maksimum kiirusel, pesti 70 % külma etanooliga, aurutati alles jäänud etanool inkubeerides RNA-d 37 °C termostaadis. Seejärel lahustati RNA 20 – 30 µl-s

vees ja mõõdeti kontsentratsiooni kasutades NanoDrop 1000 spektrofotomeetrit. Eraldatud RNA-d kasutati pöördtranskriptaasi-PCR-i (*one step RT-PCR*) läbiviimiseks. *GAL10* geeni transkriptsiooni indutseerimise jälgimiseks kasutati oligonukleotiide, mis amplifitseerivad geeni algusest 1kb kaugusel paikneva ala. Positiivse kontrollina kasutati oligonukleotiide, mis amplifitseerivad *FBA1* geeni piirkonda. Pöördtranskriptaasi-PCR-i reaktsiooni kogumaht oli 10 µl, mis sisaldas 100 ng RNA-d, 1 x FIREPol® *Master Mix* (*Solis Biodyne*), 2 µM praimereid ning 1,5 U pöördtranskriptaasi (*RevertAid Reverse Transcriptase, Thermo Scientific*). RT-PCR viidi läbi järgmise programmiga:

Pöördtranskriptaasi reaktsioon:	48 °C 30 min	
Pöördtranskriptaasi inaktivatsioon:	95 °C 5 min	
DNA denaturatsioon:	93 °C 3 min	} 20 tsüklit
Praimerite seondumine:	55 °C 30 sek	
Praimerite ekstensioon:	72 °C 30 sek	
Lõpp-ekstensioon:	72 °C 7 min	

Saadud PCR-i produktid lahutati ja visualiseeriti 2,5 % agarosgeelil EtBr abil. *GAL10* ja *FBA1* geenide transkriptidest saadud cDNA signaali intensiivsust kvantifitseeriti kasutades programmi *Image Studio™ Lite* ning graafikud valmistati programmiga *LibreOffice Calc*.

2.3 Tulemused

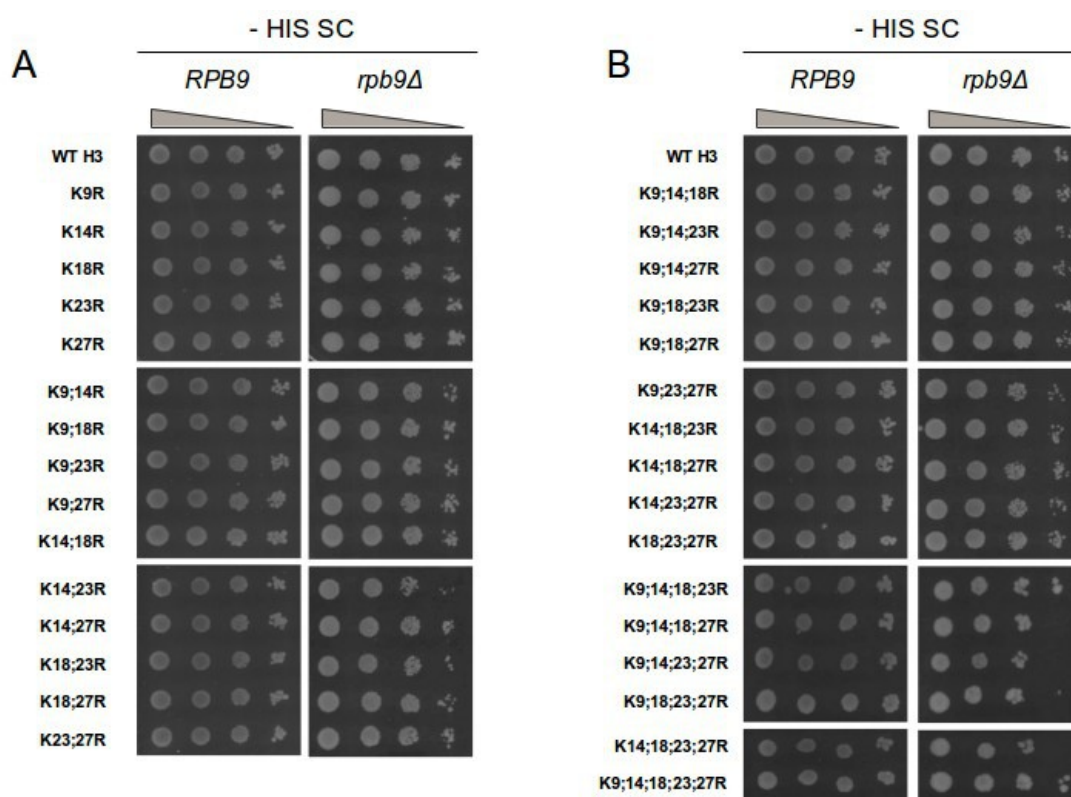
2.3.1 Mutantset histooni H3 kodeerivad plasmiidid

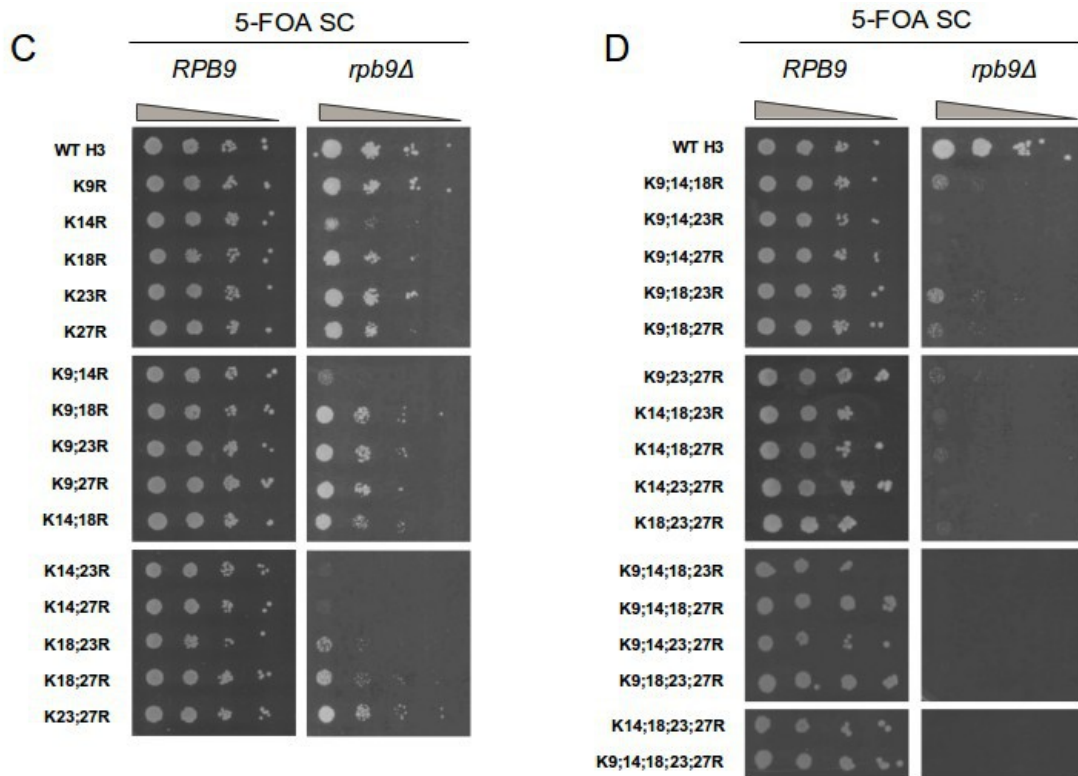
Töös kasutati 32 pRS413 seeria plasmidi, mis kodeerivad erinevaid histooni H3 variante. Nendest 26 plasmidi valmistati käesoleva töö käigus. Histooni H3 atsetüleerimise sihtmärgiks olevad lüsiinid (K9, K14, K18, K23 ja K27) olid muteeritud arginiiniks ning kombineeritud omavahel kõigis võimalikes variantides alates ühekordsetest mutatsioonidest kuni kõigi viie atsetüleeritava lüsiini muteerimiseni. Lüsiini muteerimine arginiiniks mimikeerib rakkudes mitteatsetüleeritud lüsiini ning võimaldab uurida muteeritud positsioonide funktsiooni.

2.3.2 Histooni H3 mutatsioonide mõju rakkude elujõulisusele

Histooni H3 atsetüleeritavate lüsiinide muteerimise mõju uurimiseks transformeeriti mutantset H3-e sisaldavad plasmiidid terve RNA pol II-ga ja subühiku Rpb9 deletsiooniga rakkudesse. Saadud kolooniaid kasutati lahjenduste rea analüüsiks, mis teostati – HIS SC ja 5-FOA-d sisaldaval agarsöötmel. – HIS tassidel kasvavad rakud sisaldavad eeldatavalt nii metsiktüüpi histooni H3, mis on kodeeritud *URA3* markergeeniga plasmiidil kui ka värskelt transformeeritud *HIS3* markergeeniga plasmidi, mis kodeerib mutantset H3 geeni. 5-FOA olemasolul söötmes jäävad ellu aga ainult sellised rakud, mis sisaldavad mutantse H3-ga plasmidi. Nagu on näha Joonise 5 paneelidel A ja B, metsiktüüpi RNA pol II olemasolul ei mõjuta ka kõigi viie atsetüleeritava lüsiini muteerimine arginiiniks histoonimutantide kasvamist agarsöötmel. Muteeritud H3-e transformeerimisel *rpb9Δ* rakkudesse saadud tulemused aga erinevad oluliselt metsiktüüpi polümeraasiga rakkude tulemusest. Joonise 5 paneelil C on näha, et *rpb9* deletsiooniga H3 kaksikmutandid K9;14R, K14;23R ja K14;27R ei ole eluvõimelised. Kolme nimetatud mutanti ühendab lüsiini K14 mutatsioon arginiiniks, andes põhjust arvata, et selle positsiooni atsetüleerimisel on *rpb9Δ* kontekstis teistest lüsiinidest olulisem roll. Huvitaval kombel on *rpb9Δ* kaksikmutandi K14;18R lahjenduste rida märkimisväärselt hea kasvuga, võrreldes eelpool nimetatud kolme mutandiga, mis sisaldavad lüsiini K14R mutatsiooni. Sarnast

efekti on võimalik jälgida ka paneelil D, kus on näidatud kolme-, nelja- ja viiekordsete histoonimutantide lahjendusi. Paneelil D on näha, et alates kolme atsetüleeritava H3 lüsiini muteerimisest ei ole *rpb9Δ* rakud eluvõimelised. Samas, on võimalik täheldada, et kolmikmutantide K9;14;18R, K9;18;23R ning K9;18;27R esimeses (ehk kõige tihedamas) lahjenduspunktis esinevad mõned väikesed kolooniad. Antud nähtuse põhjal ei ole võimalik öelda, et rakud on eluvõimelised, aga tõenäoliselt olid sellised mutandid suutelised läbima mitmeid rakutsükleid enne kasvu peatumist. Lüsiini 18 puudutav tulemus on mõnevõrra üllatav, kuna selle positsiooni atsetüleerimine esineb geenide alguses ning võiks arvata, et on oluline nukleosoomi ja DNA vaheliste interaktsioonide nõrgestamiseks (Liu et al. 2005). Sellisel juhul peaks K18 muteerimine arginiiniks takistama transkriptsiooni. Antud töö tulemus võib aga viidata võimalusele, et positsiooni K18 atsetüleerimine võib osaleda mõne transkriptsiooniks vajaliku valgusidumises, mitte ainult üldise nukleosoomi laengu muutmises.



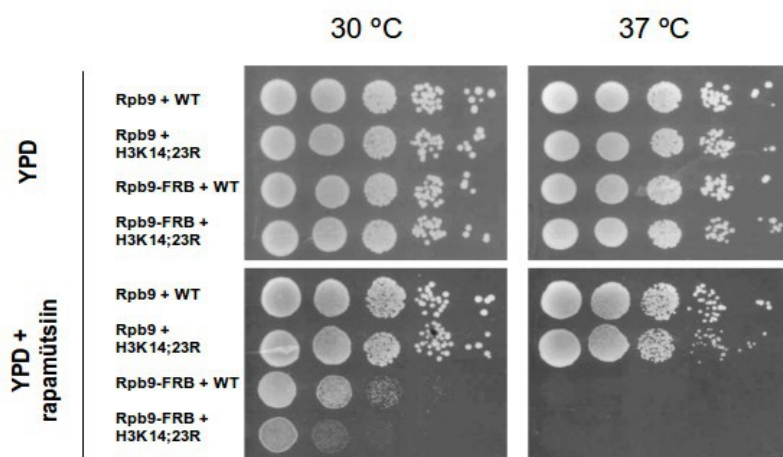


Joonis 5. Histooni H3 mutantide lahjenduste rea analüüs. Paneelidel A ja B on näidatud 10 x lahjenduste rea analüüs, mis oli teostatud – HIS SC agarsöötmel ning paneelidel C ja D on kasutatud 5-FOA-d (1 mg/ml) sisaldavat SC söödet. Esimese lahjenduse kontsentratsioon on 10 000 rakku/ μ l ning viimase kontsentratsioon on vastavalt 10 rakku/ μ l. Metsiktüüpi *RPB9* rakkude lahjendusrea analüüs on tehtud Henel Seina poolt.

2.3.3 Tsütoplasmasse sidumise meetodi pärimised ja rapamütsiini testimine

Uurimaks H3 mutatsioonide letaalsuse põhjust *rpb9* deletsiooniga rakkudes, konstrueeriti pärimised, milles oli võimalik kasutada valgu tsütoplasmasse sidumise süsteemi. Nimetatud süsteemi abil on võimalik eemaldada Rpb9 RNA pol II kompleksist rapamütsiini lisamisel ning jäljendada *rpb9 Δ* -sarnast transkriptsiooni juba eelnevalt muteeritud H3-ga kromatiinil. Selleks oli tsütoplasmasse seotud Rpb9-ga tüvi kombineeritud plasmidivahetussüsteemiga ning olid valmistatud tüved, mis kodeerivad metsiktüüpi histooni H3 geeni või muteeritud H3-e. Tsütoplasmasse sidumise meetodi kontrolliks olid valmistatud kaks kontrolltüve, mis kumbki sisaldavad ainult ühte rapamütsiini siduvat domeeni. Valmistatud tüvede fenotüübi

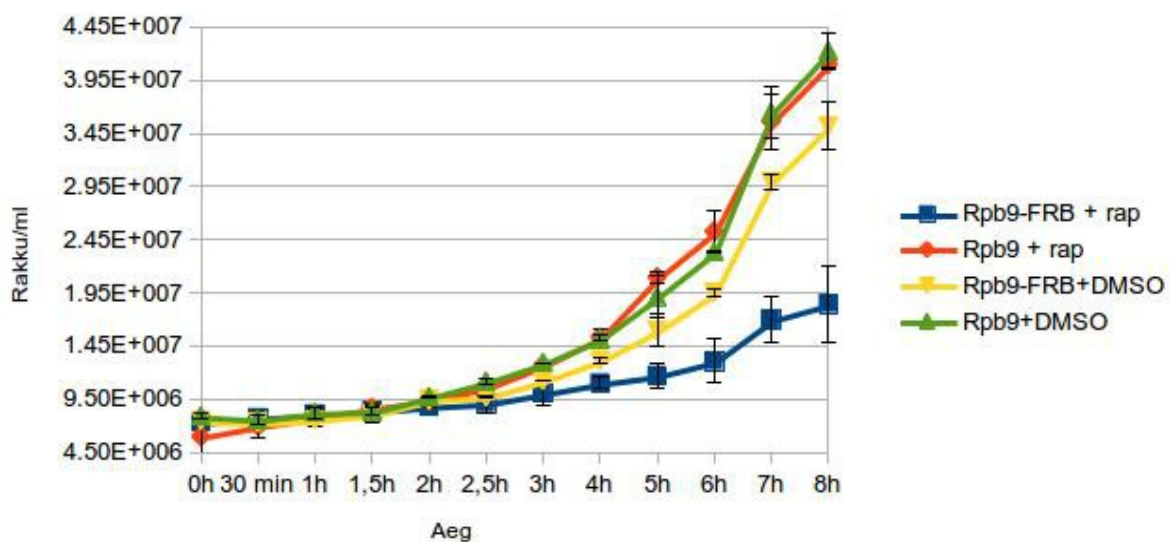
kontrollimiseks kasutati lahjenduste rea analüüsi, milles vaadati metsiktüüpi H3-ga või H3K14;23R histooniga (selline kaksikmutatsioon oli eelnevas lahjenduste rea analüüsis *rpb9Δ* rakkudele letaalne) tsütoplasmasse seotud Rpb9-ga tüvesid. Kontrolliks oli võetud tüvi, mis sisaldas ainult ühte rapamütsiini siduvat domeeni, ribosoomivalgu Rpl13a C-terminuses. Kuna *Rpb9* deletsioon ei ole rakkudele letaalne, aga põhjustab aeglast kasvu ning temperatuuritundlikkust, siis oli võimalik seda ära kasutada rapamütsiini poolt põhjustatud fenotüübi kontrollimiseks. Joonisel 6 on näidatud, et rapamütsiini olemasolul söötmes muutuvad tsütoplasmasse seotud Rpb9-ga metsiktüüpi H3-ga rakud (Rpb9-FRB+ WT) temperatuuril 30 °C aeglasemaks kui kontrolltüve lahjendusread (Rpb9 + WT, Rpb9 + H3K14;23R) ning H3 kaksikmutandi kasv on tugevalt häiritud (Rpb9-FRB + H3K14;23R). Lisades kasvukeskkonda rapamütsiini ja inkubeerides tase temperatuuril 37 °C ei ole aga tsütoplasmasse seotud Rpb9-ga rakud eluvõimelised. Nii 30 °C kui 37 °C tulemused näitavad, et Rpb9 tsütoplasmasse sidumise süsteem töötab ja sobib soovitud katsete sooritamiseks.



Joonis 6. Rapamütsiini efektiivsuse kontrollimine valmistatud tüvedes. Konstrueeritud süsteemi testimiseks kasvatati rakke 100 nM rapamütsiiniga YPD söötmel ja ilma rapamütsiiniga temperatuuridel 30 °C ja 37 °C. Tsütoplasmasse seotud Rpb9-ga tüved on tähistatud kui Rpb9-FRB ning *WT* tähistab normaalset H3 geeni ja H3K14;23R histooni H3 mutanti.

Rapamütsiini efektiivsuse testimine lahjendusrea abil näitas, et tsütoplasmasse sidumise süsteem töötab valmistatud pärmitüvedes piisavalt hästi, et jätkata nendega töötamist. Lahjendusrea

analüüs oli aga teostatud agarsöötmel ning ei võimaldanud rapamütsiini mõjumise kiiruse määramist ajas. Kuna käesolevas töös sooviti uurida tsütoplasmasse seotud Rpb9-ga ja muteeritud H3-ga rakkude transkriptsioonivõimet kasutades indutseeritavat geeni, siis oli oluline teada rapamütsiini mõju kiirust. Selle eesmärgiga olid tehtud katsed mõõtmaks rakkude kasvukiiruse muutust rapamütsiini lisamisel, sest nagu eelpool mainitud ja nagu ka lahjenduste rea analüüs näitas, on *rpb9Δ* rakkudele iseloomulik aeglane kasv. Teostatud katsete andmete põhjal oli tehtud kasvukõverate graafik, mis on kujutatud Joonisel 7. Graafikult on näha, et Rpb9-FRB rakkude kasv aeglustub 2-3 tundi peale rapamütsiini lisamist söötmesse. Arvestades saadud tulemust ja asjaolu, et *GAL10* geeni indutseerimine eelnevalt glükoosis kasvatatud rakkudes võtab 1-2 tundi, otsustati järgnevat katsetes enne *GAL10* geeni transkriptsiooni indutseerimist kasvatada rakke eelnevalt 2 tundi 100 nM rapamütsiini sisaldavas söötmes.

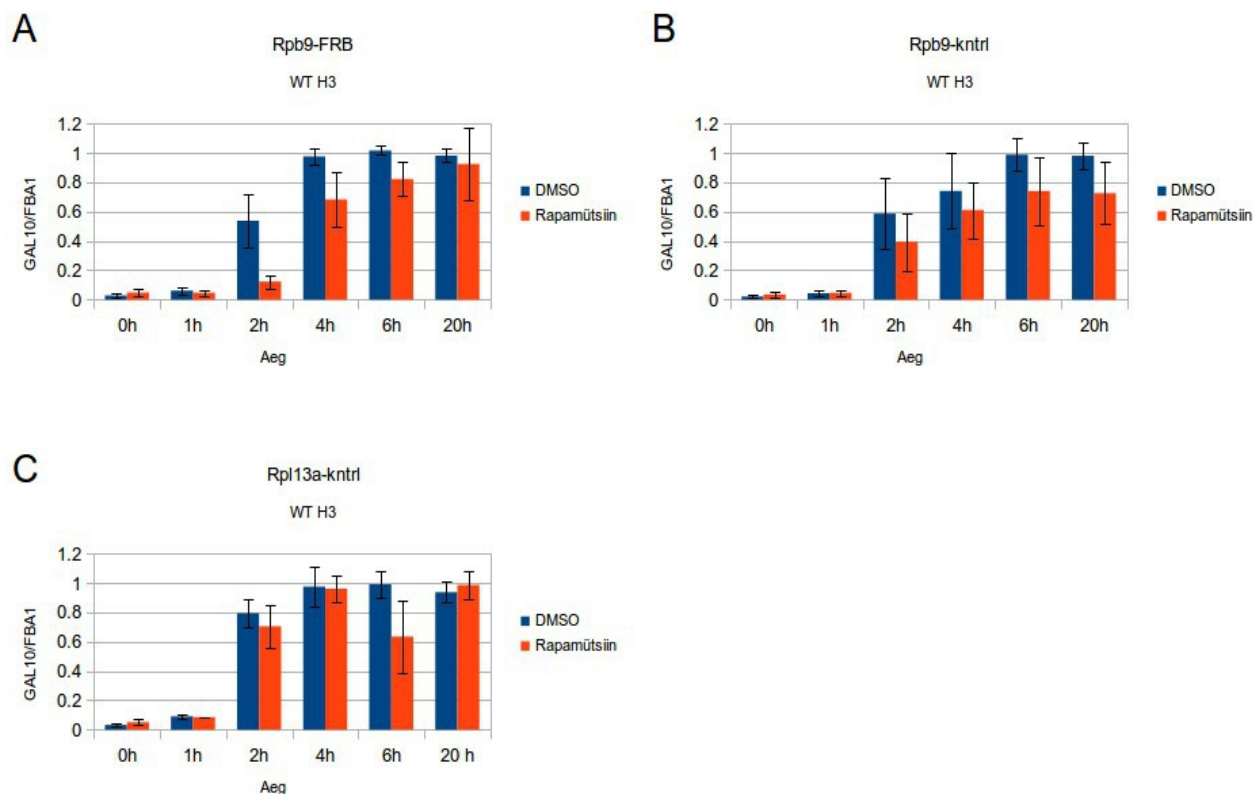


Joonis 7. Rapamütsiini mõju ajas. Graafikul on kujutatud kahe katse tulemused ning veapiiridena on kasutatud standardjaotust. Rpb9-FRB on funktsionaalse tsütoplasmasse sidumise süsteemiga tüvi ning Rpb9 on kontrolltüvi. + rap tähistab 100 nM rapamütsiiniga kasvanud rakkude kõverat ning + DMSO tähistab ilma rapamütsiiniga ehk kontrolltingimustes kasvanud rakkude kõverat.

2.3.4 *GAL10* geeni induktsioon

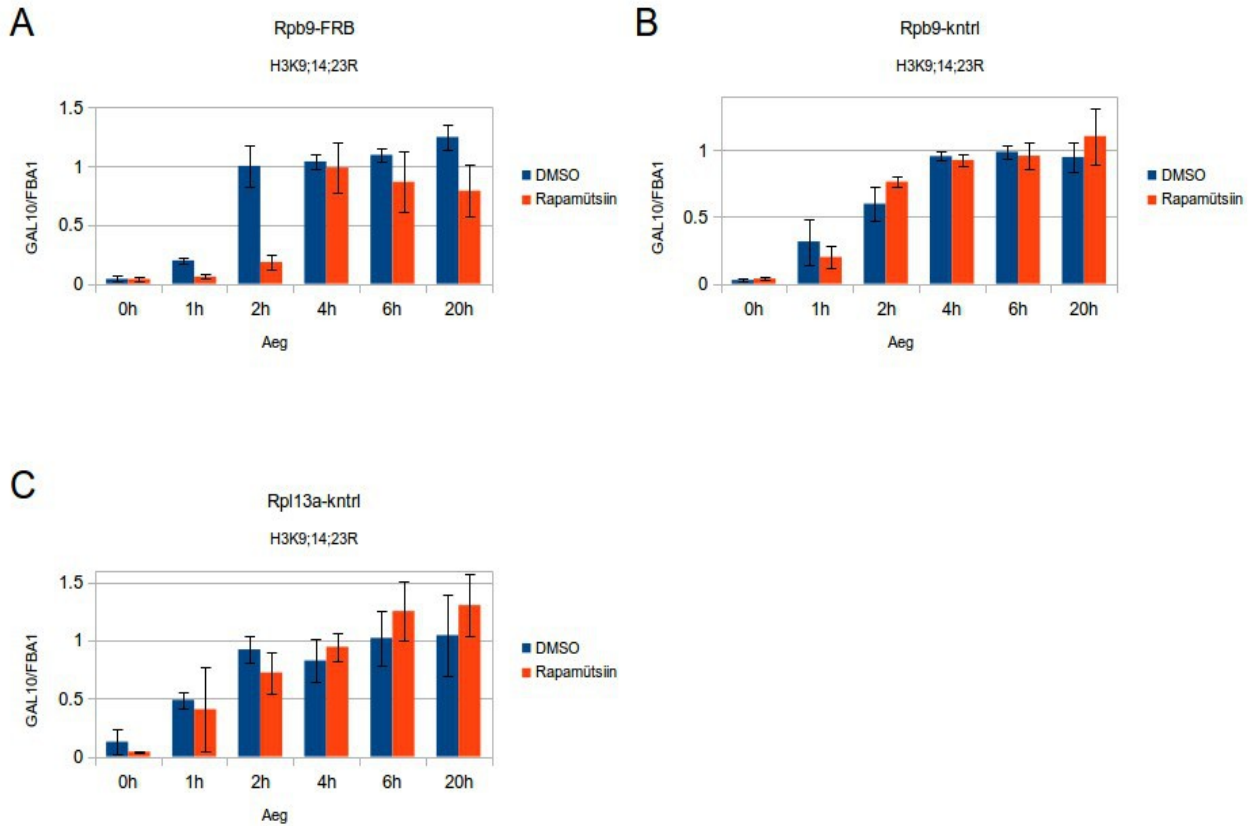
Histooni H3 ja RNA pol II subühiku Rpb9 deletsiooni letaalsuse põhjuse selgitamiseks sooviti antud töös testida RNA pol II Δ Rpb9 võimet indutseerida *GAL10* geeni vähe atsetüleeritud H3-ga kromatiinil. Nimetatud induktsioon toimub galaktoosi kui süsinikuallika kasutusele võtmisel ning *GAL* geenide ja nende promootorite kasutamine on laialt levinud transkriptsiooniga seotud mehhanismide uurimisel. *GAL10* geeni induktsiooni uurimiseks viidi läbi katsed tsütoplasmasse seotava Rpb9-ga rakkudega, mis kodeerisid metsiktüüpi histooni H3 või kolme mutatsiooniga H3K9;14;23R histooni. Kuigi tsütoplasmasse sidumise meetodi efektiivsust testiti kasutades H3 kaksikmutanti H3K9;14R, valiti *GAL10* induktsiooni läbiviimiseks kolme mutatsiooni sisaldavat histooni, sest alates kolmest mutatsioonist on kõik H3 N-terminaalse saba lüsiinide muteerimise kombinatsioonid *rpb9 Δ* rakkudele letaalsed. Kontrolltüvedena kasutati mittefunktsionaalse tsütoplasmasse sidumise süsteemiga rakke, mis sisaldasid ainult ühte rapamütsiini siduvat domeeni.

Olles kooskõlas *rpb9 Δ* rakkude aeglase kasvu fenotüübiga, näitasid läbi viidud katsed, et metsiktüüpi histooni H3 olemasolul, toimub *GAL10* geeni induktsioon Rpb9 eemaldamisel RNA pol II kompleksist hiljem, kui kontrolltüvedes või -katses, kus rapamütsiini ei ole kasvukeskkonda lisatud. Metsiktüüpi H3-ga rakkudes toimub selle histooni modifitseerimine, kaasa arvatud atsetüleerimine, vastavalt raku füsioloogilistele vajadustele. Vaatamata sellele, on Joonise 8 paneelil A näha, et Rpb9 subühiku puudumisel on *GAL10* transkriptsiooni induktsioon märkimisväärselt aeglasem ja toimub ligikaudu kaks tundi hiljem kui terve RNA pol II korral. Antud tulemus viitab, et Rpb9 võib olla oluline efektiivseks transkriptsiooni initsiatsiooniks.



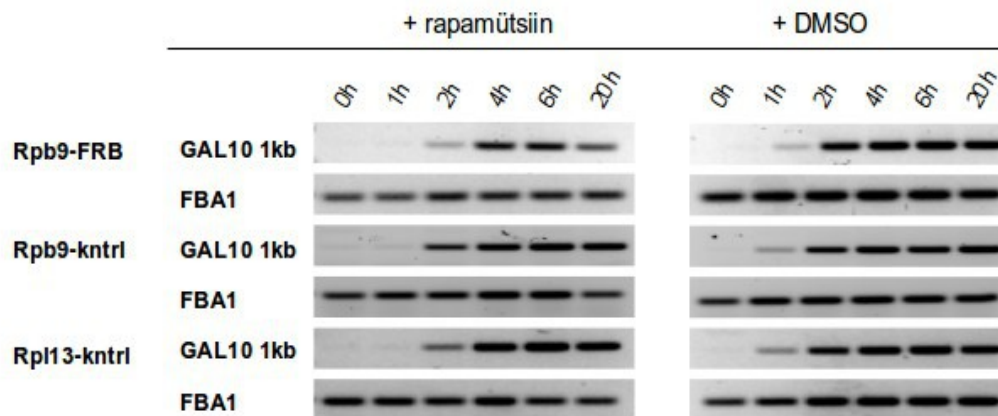
Joonis 8. GAL10 induksioon metsiktüüpi H3-ga tüvedes. *GAL10* transkriptsiooni tase on *GAL10* ja *FBA1* transkriptide cDNA signaali suhe. Graafikutel on näidatud kolme katse tulemused ning veapiirideks on võetud standardviga. Paneelil A on kujutatud metsiktüüpi histooniga H3 ning funktsionaalse tsütoplasmasse sidumise süsteemiga rakkude (Rpb9-FRB) *GAL10* indutseerimise tulpdiaagramm. Paneelidel B ja C on kujutatud kontrolltüvede diagrammid, mis sisaldavad ainult ühte rapamütsiini siduvat domeeni: B – Rpb9 C-terminuses, C – Rpl13a C-terminuses. Tsütoplasmasse sidumise aktiveerimiseks kasutati 100 nM rapamütsiini.

Joonise 9 paneelil A on kujutatud tsütoplasmasse seotud Rpb9-ga rakkude *GAL10* geeni indutseerimise graafik kromatiinil, mis sisaldab mutantset H3K9;14;23R histooni. Nagu ka metsiktüüpi H3 puhul (Joonis 8 paneel A), näeme *GAL10* transkripte ligikaudu kaks tundi hiljem, aga transkriptsioon toimub siiski ning üllatavalt, metsiktüüpi H3 ja H3K9;14;23R tulemused läbiviidud katses üksteisest ei erinenud.



Joonis 9. GAL10 induktsiooni H3K9;14;23R tüvedes. GAL10 transkriptsiooni tase on GAL10 ja FBA1 transkriptide cDNA signaali suhe. Graafikutel on näidatud kolme katse tulemused ning veapiirideks on võetud standardviga. Paneelil A on kujutatud H3K9;14;23R ning funktsionaalse tsütoplasmasse sidumise süsteemiga rakkude (Rpb9-FRB) GAL10 indutseerimise tulpldiagramm. Paneelidel B ja C on kujutatud kontrolltüvede diagrammid, mis sisaldavad ainult ühte rapamütsiini siduvat domeeni: B – Rpb9 C-terminuses, C – Rpl13a C-terminuses. Tsütoplasmasse sidumise aktiveerimiseks kasutati 100 nM rapamütsiini.

GAL10 induktsiooni graafikute valmistamiseks kasutatud väärtused on saadud *GAL10* transkripti ja *FBA1* geeni transkripti suhtest ning ei kajasta H3K9;14;23R ja tsütoplasmasse seotud Rpb9-ga mutandi üldist madalamat transkriptsioonitaset. Seda on näha Joonisel 10, kus on kujutatud ühe katse RT-PCR-i tulemused.



Joonis 10. *GAL10* induktsioon H3K9;14;23R histoonidega. *GAL10* ja *FBA1* transkriptide cDNA agarosgeelil. Katsetes kasutati 100 nM rapamütsiini.

Jooniselt on näha, et rapamütsiini lisamisel, on Rpb9-FRB rakkudes lisaks hilisemale *GAL10* transkripti tekkimisele ka positiivseks kontrolliks võetud *FBA1* produkti hulk väiksem kui DMSO-s kasvanud rakkudes. Samuti on näha, et Rpb9-FRB mutandi *GAL10* produkti hulk on väiksem kui DMSO-ga kontrollrakkudes ning 20h ajapunktis on suur erinevus *GAL10* produkti hulgas, mida ei kajasta graafikud Joonisel 9. Selline nähtus esines nelja tehtud katse korral ja võib viidata, et *GAL10* geeni transkriptsiooni indutseerimine ei pruugi olla hea süsteem uurimaks *rpb9Δ* ja H3 atsetüleerimismutatsioonide letaalsuse põhjust. *GAL* geenide aktivatsioon on väga robustne protsess, mille korral on sünteesitavate transkriptide hulk kõrgem kui paljudel konstitutiivselt aktiivsetel geenidel. *Rpb9Δ* H3 atsetüleerimismutantide eluvõimetus võib olla põhjustatud aga just madalalt ekspresseeritavate geenide transkriptsiooni puudulikkuse tõttu ning selle uurimiseks oleks usaldusväärsem kasutada geeni, mille ekspressioonitase on madalam kui indutseeritavatel geenidel.

2.4 Arutelu

RNA polümeraas II sõltuva transkriptsiooni täpseks ja efektiivseks toimumiseks on vajalik selle korrektne regulatsioon, võimaldamaks sünteesida organismi eluks vajalikke valkude mRNA-d õiges hulgas ja õigel ajal. Selline regulatsioon on võimalik suures osas läbi DNA-ga seotud histoonide modifikatsioonide, mis mõjutavad kromatiini avatuse taset, muutes DNA kättesaadavust teistele valkudele ning on ka otsesteks märgisteks kromatiinil töötavate valkude seondumiseks. Seetõttu, geeniekspressiooni ja selle reguleerimise mõistmiseks, on oluline teada, kuidas toimub RNA polümeraas II ja histoonide modifikatsioonide vaheline interaktsioon ja suhtlemine ning kuidas need mõjutavad transkriptsiooni.

Käesolevas töös uuriti histooni H3 atsetüleerimise ja RNA polümeraas II subühiku Rpb9 koosmõju transkriptsioonile. Töö esimese poole tulemused näitasid, et metsiktüüpi RNA polümeraas II olemasolul rakkudes, ka viie atsetüleeritava lüsiini muteerimine arginiiniks histoonil H3 ei anna fenotüübilist efekti. Arvatavasti on RNA pol II transkriptsioon piisavalt robustne, et olema võimeline kätte saada ka tavalisest tugevamalt nukleosoomi seotud DNA-d. Antud töös muteeriti ainult histooni H3 atsetüleeritavaid positsioone ning on võimalik, et histooni H4 atsetüleerimine on metsiktüüpi polümeraasiga rakkudele piisav.

RNA polümeraas II subühiku Rpb9 puudumisel, ei ole rakud eluvõimelised alates histooni H3 kolme atsetüleeritava lüsiini muteerimisest ning ka selliste kahekordsete mutatsioonide kombinatsioonid nagu H3K9;14R, H3K14;23R ja H3K14;27R on letaalsed. Esiteks, viitavad saadud tulemused, et subühiku Rpb9 puudumisel võib polümeraasi efektiivsus olla väiksem ja transkriptsioon väheatsetüleeritud kromatiinil on raskendatud. Kuna geeniekspressioon peab toimuma igal ajahetkel kindlal tasemel, siis on võimalik, et *rpb9Δ* H3 atsetüleerimismutantides tekib globaalne transkriptsioonistress, mis võib osutada letaalseks. Huvitav on see, et ka kolme eelpool nimetatud kahekordse histoonimutatsiooni kombineerimine *rpb9* deletsiooniga on letaalne ning kõik kolm kombinatsiooni sisaldavad lüsiini 14. Histooni H3 lüsiin 14, nagu ka kõik teised antud töös uuritud lüsiinid, on positsioon, mille atsetüleerimine esineb geenide 5' otsas ning on seotud aktiivse transkriptsiooniga (Liu et al. 2005). Teiseks huvitavaks tähelepanekuks

oli see, et histooni H3 K18 muteerimisel arginiiniks oli rakkude kasvu soodustav efekt. Ka H3K18 atsetüleerimine on geeni 5' otsas positsioneeruv modifikatsioon, aga saadud tulemus näitab, et Rpb9 subühiku funktsioon võib olla seotud kindlate H3 atsetüleerimise positsioonidega. Lüsüini 14 esinemine kolmes kahekordses mutatsioonis, mis on letaalsed *rpb9Δ* rakkudele viitab sellele, et antud positsioonil võib olla suurem seos Rpb9-ga. On võimalik, et Rpb9 vahendab polümeraasi ja histoonimodifikatsioone lugeva valgusinteraktsiooni ning on vajalik polümeraasi stabiliseerimiseks promotooril ja geenide 5' otsas. Samas, on näidatud, et H3K14 atsetüleerimine osaleb DNA reparatsioonis, olles seondumismärgiseks kromatiini remodeleerijale RSC (Duan ja Smerdon 2014). Arvestades Rpb9 funktsiooni transkriptsiooniseoselises reparatsioonis, võiks pakkude üheks *rpb9Δ* ja H3 mutantide eluvõimetuse põhjuseks DNA kahjustuste kogunemise rakkudes. See ei ole aga kõige ratsionaalsem seletus kolmekordsete mutatsioonidega H3 ja *rpb9* deletsiooni letaalsusele, sest tegu on aktiivse transkriptsiooniga seotud atsetüleeritavate histooni H3 positsioonidega ning RNA polümeraas II-ga.

Lähtuvalt eelnevatest teadmistest, sooviti antud töös uurida RNA pol IIΔRpb9 võimet indutseerida transkriptsiooni puudulikult atsetüleeritud H3-ga kromatiinil. Selleks kasutati tsütoplasmasse sidumise (*anchor-away*) meetodit ja indutseeritavat geeni *GAL10*. Läbiviidud katsete tulemused näitasid, et Rpb9 subühiku puudumisel toimub transkriptsiooni indutseerimine ligikaudu kaks tundi hiljem kui metsiktüüpi RNA pol II-ga rakkudes. Induktsioonimustri erinevust metsiktüüpi histooniga H3 ja mutantse H3K9;14;23R rakkude vahel, kvantifitseerides *GAL10* transkriptide signaali *FBA1* transkriptide suhtes, ei täheldatud. Erinevuse puudumine *GAL10* geeni induktsioonis metsiktüüpi ja mutantse histoon H3-ga rakkudes oli ootamatu, aga täheldasime, et mutantse H3-ga ja tsütoplasmasse seotud Rpb9-ga rakkudes olid nii *GAL10* kui *FBA1* geenide ekspressioonitasemed madalamad kui metsiktüüpi polümeraasiga rakkudes. Seetõttu ei olnud transkriptsiooni indutseerimise erinevus detekteeritav valitud meetodiga. On võimalik, et *GAL10* geeni induktsioon on nii metsiktüüpi H3-ga kui mutantse H3-ga rakkudes sarnane, sest *GAL10* geeni indutseerimine on robustne ja pealesunnitud protsess, ning selle transkriptsioonitase on väga kõrge. Paljud eluliselt tähtsad geenid on aga ekspresseeritud madalal tasemel kuid konstitutiivselt. Sellisel juhul ei sobi *GAL10* geeni transkriptsiooni uurimine selleks, et uurida, miks ei ole *rpb9Δ* ja H3 mutantid eluvõimelised. Kui sellistes rakkudes on transkriptsiooni toimumine tõepoolest globaalselt takistatud, siis rakkude hukkumise põhjuseks

võib olla hoopis võimetus transkribeerida geene, millede ekspressioonitase on alati madal. Selle teooria kontrollimiseks oleks vajalik välja valida geen, mille ekspressioonitase on madalam kui *GAL10* geenil.

Veel üheks võimalikuks seletuseks *rpb9Δ* H3 mutantide eluvõimetusele on transkriptsiooni ja replikatsiooni vahelise konflikti ja sellest ka geneetilise ebastabiilsuse tekkimine. On näidatud, et *rpb9Δ* rakkudes esinevad replikatsioonikahvli liikumise häired ning teadaolevalt võib replikatsioonikahvli peatumine alata reparatsiooniprotsesse, mis põhjustavad DNA-s üheaheelalisi katkeid ja soodustavad geneetilist ebastabiilsust läbi rekombinatsiooni (Felipe-Abrio et al. 2014).

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida histooni H3 atsetüleerimise ja RNA polümeraas II subühiku Rpb9 koosmõju transkriptsioonile mudelorganismis *Saccharomyces cerevisiae*.

Töö käigus muteeriti histooni H3 viite atsetüleeritavat lüsiini positsioonides 9, 14, 18, 23 ja 27. Histoonimutatsioonid kombineeriti omavahel kõigis võimalikes variantides alates ühest mutatsioonist kuni kõigi viie lüsiini muteerimiseni. Histooni H3 mutatsioonide mõju rakkude kasvuvõimele uuriti metsiktüüpi RNA polümeraas II-ga ja *rpb9Δ* pärmitüvedes. Tulemused näitasid, et metsiktüüpi RNA polümeraas II-ga rakkudes ei avalda fenotüübilist mõju ka kõigi viie uuritud H3 lüsiini muteerimine arginiiniks. Töös näidati, et RNA pol II subühiku Rpb9 puudumisel on letaalsed histooni H3 kaksikmutatsioonid K9;14R, K14;23R ja K14;27R. Alates kolme atsetüleeritava lüsiini muteerimisest histoonil H3 on kõik mutatsioonid *rpb9Δ* rakkudele letaalse mõjuga. Kindlate positsioonide mõju *rpb9* deletsiooniga rakkudele võib viidata, et Rpb9 osaleb nende positsioonide atsetüleerimise äratundmises. Rpb9 positsioon RNA polümeraas II-l on soodne interaktsioonideks teiste transkriptsioonis osalevate valkudega ning on võimalik, et osaleb ka histoonimodifikatsioonide äratundmise vahendamises ja läbi selle ka polümeraasi stabiliseerimises.

GAL10 geeni indutseerimise katsed ei näitanud tsütoplasmasse seotud Rpb9-ga rakkudes erinevust metsiktüüpi histooniga H3 ja mutantse H3K9;14;23R vahel. Kuna *rpb9Δ* H3K9;14;23R mutant ei ole eluvõimeline, siis võib järeldada, et *GAL10* ei pruugi olla sobiv mudelgeen soovitud küsimuste uurimiseks. Teiseks, *rpb9Δ* ja histooni H3 mutatsioonide letaalsus võib olla põhjustatud ka DNA reparatsiooni häirete poolt. Seetõttu vajab antud töös leitud seos RNA polümeraas II subühiku Rpb9 ja histooni H3 atsetüleerimise vahel edasist uurimist, et jõuda transkriptsiooni kui essentsiaalse protsessi parema mõistmiseni.

The impact of RNA polymerase II subunit Rpb9 and histone H3 acetylation on transcription in *Saccharomyces cerevisiae*.

Kristina Reinmets

SUMMARY

Maintenance, inheritance and highly regulated expression of genetic information stored in DNA is essential for every living organism. In eukaryotic cells, this is achieved by organizing the genome into dynamic nucleoprotein complex called chromatin. In chromatin, DNA is bound by small basic proteins called histones whose function is not only to package and organize the DNA but also to protect and regulate its' accessibility to other protein factors that operate on chromatin. These sophisticated tasks of histones are possible through numerous post-translational modifications that are crucial for DNA-histone interactions and thus, for molecular processes like transcription, replication, recombination, and DNA damage repair.

Transcription of protein-coding genes by RNA polymerase II, is indeed a chromatin-based process and highly dependant on histone modifications. Hence, understanding the interactions between RNA polymerase II and histone modifications would bring us closer to understanding one of the fundamental events of life – transcription. It is also known to be common for cancer cells to have abnormal pattern of histone modifications which leads to and deepens the chaos in gene expression.

The aim of this work was to investigate the role of histone H3 acetylation and RNA polymerase II subunit Rpb9 in eukaryotic transcription. Five lysine residues on histone H3 – K9, K14, K18, K23 and K27, which are normally targets of acetylation were systematically mutated to arginins and combined with each other to mimic poorly acetylated state of H3. Results showed that cells encoding a wildtype RNA polymerase II have no phenotype even when all five H3 lysines are mutated to arginine. However, cells lacking RNA polymerase II subunit Rpb9 showed synthetic lethality with H3 double-mutants H3K9;14R, H3K14;23R and H3K14;27R. Starting from triple lysine-to-arginine mutations, all further disruptions of H3 acetylation were lethal in *rpb9Δ*

background. Lethality of the *rpb9Δ* cells with certain H3 double-mutations suggest, that Rpb9 subunit may have a role in recognizing these particular modifications, for example, in order to stabilize RNA polymerase II. Considering Rpb9's role in transcription-coupled DNA repair and the fact that H3K14 acetylation has also been shown to be important in DNA damage repair, it is possible that lethality of the named mutants may be caused by DNA damage accumulation.

Since all of the mutated H3 lysines are known to be acetylated at the promoter and/or 5' regions of protein-coding genes, I tried to test if *rpb9Δ* H3K9,14,23R mutant is able to efficiently induce the transcription of *GAL10* gene. Interestingly, there was no difference in the induction efficiency or level between *rpb9Δ* cells with wildtype H3 or H3K9;14;23R when compared to the levels of a reference gene *FBA1*. However, it was noticed that both *GAL10* and *FBA1* expression in cells where Rpb9 was removed from RNA pol II complex was lower than in control strains. This indicates that chosen approach to investigate the reason of *rpb9Δ* H3 acetylation mutants lethality may not be suitable. Nevertheless, results of this study are intriguing as no such interactions between RNA polymerase II subunit Rpb9 and histone H3 have been shown before and are being further investigated.

KIRJANDUSE LOETELU

- Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN. 1991. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10148–52.
- Awrey DE, Weilbaecher RG, Hemming SA, Orlicky SM, Kane CM, Edwards AM. 1997. Transcription elongation through DNA arrest sites. A multistep process involving both RNA polymerase II subunit RPB9 and TFIIS. *J Biol Chem* **272**: 14747–54.
- Batta K, Zhang Z, Yen K, Goffman DB, Pugh BF. 2011. Genome-wide function of H2B ubiquitylation in promoter and genic regions. *Genes Dev* **25**: 2254–65.
- Bryksin A V, Matsumura I. 2010. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques* **48**: 463–5.
- Bushnell DA, Kornberg RD. 2003. Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6969–73.
- Carrozza MJ, Li B, Florens L, Suganuma T, Swanson SK, Lee KK, Shia W-J, Anderson S, Yates J, Washburn MP, et al. 2005. Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* **123**: 581–92.
- Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Côté J. 2003. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* **19**: 321–9.
- Di Cerbo V, Mohn F, Ryan DP, Montellier E, Kacem S, Tropberger P, Kallis E, Holzner M, Hoerner L, Feldmann A, et al. 2014. Acetylation of histone H3 at lysine 64 regulates nucleosome dynamics and facilitates transcription. *Elife* **3**: e01632.
- Chen X, Ruggiero C, Li S. 2007. Yeast Rpb9 plays an important role in ubiquitylation and degradation of Rpb1 in response to UV-induced DNA damage. *Mol Cell Biol* **27**: 4617–25.
- Dekker J. 2008. Mapping in vivo chromatin interactions in yeast suggests an extended chromatin fiber with regional variation in compaction. *J Biol Chem* **283**: 34532–40.
- Desmoucelles C, Pinson B, Saint-Marc C, Daignan-Fornier B. 2002. Screening the yeast “disruptome” for mutants affecting resistance to the immunosuppressive drug, mycophenolic acid. *J Biol Chem* **277**: 27036–44.
- Duan MR, Smerdon MJ. 2014. Histone H3 Lysine 14 (H3K14) Acetylation Facilitates DNA Repair in a Positioned Nucleosome by Stabilizing the Binding of the Chromatin Remodeler RSC (Remodels Structure of Chromatin). *J Biol Chem* **289**: 8353–63.
- Duan R, Rhie B-H, Ryu H-Y, Ahn SH. 2013. The RNA polymerase II Rpb4/7 subcomplex regulates cellular lifespan through an mRNA decay process. *Biochem Biophys Res Commun* **441**: 266–70.
- Dudley AM, Janse DM, Tanay A, Shamir R, Church GM. 2005. A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Mol Syst Biol* **1**: 2005.0001.
- Eltsov M, Maclellan KM, Maeshima K, Frangakis AS, Dubochet J. 2008. Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in

- mitotic chromosomes in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 19732–7.
- Feaver WJ, Gileadi O, Li Y, Kornberg RD. 1991. CTD kinase associated with yeast RNA polymerase II initiation factor b. *Cell* **67**: 1223–30.
- Felipe-Abrio I, Lafuente-Barquero J, García-Rubio ML, Aguilera A. 2014. RNA polymerase II contributes to preventing transcription-mediated replication fork stalls. *EMBO J* **34**: 236–50.
- Fierz B, Chatterjee C, McGinty RK, Bar-Dagan M, Raleigh DP, Muir TW. 2011. Histone H2B ubiquitylation disrupts local and higher-order chromatin compaction. *Nat Chem Biol* **7**: 113–9.
- Finch JT, Klug A. 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 1897–901.
- Fleming AB, Kao C-F, Hillyer C, Pikaart M, Osley MA. 2008. H2B ubiquitylation plays a role in nucleosome dynamics during transcription elongation. *Mol Cell* **31**: 57–66.
- Furter-Graves EM, Furter R, Hall BD. 1991. SHI, a new yeast gene affecting the spacing between TATA and transcription initiation sites. *Mol Cell Biol* **11**: 4121–7.
- Furter-Graves EM, Hall BD, Furter R. 1994. Role of a small RNA pol II subunit in TATA to transcription start site spacing. *Nucleic Acids Res* **22**: 4932–6.
- Fussner E, Ching RW, Bazett-Jones DP. 2011. Living without 30nm chromatin fibers. *Trends Biochem Sci* **36**: 1–6.
- Gangloff YG, Romier C, Thuault S, Werten S, Davidson I. 2001. The histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID. *Trends Biochem Sci* **26**: 250–7.
- Gibney PA, Fries T, Bailer SM, Morano KA. 2008. Rtr1 is the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of a novel family of RNA polymerase II-binding proteins. *Eukaryot Cell* **7**: 938–48.
- González-Barrera S, Prado F, Verhage R, Brouwer J, Aguilera A. 2002. Defective nucleotide excision repair in yeast *hpr1* and *tho2* mutants. *Nucleic Acids Res* **30**: 2193–201.
- Green MR. 2000. TBP-associated factors (TAFIIs): multiple, selective transcriptional mediators in common complexes. *Trends Biochem Sci* **25**: 59–63.
- Guccione E, Bassi C, Casadio F, Martinato F, Cesaroni M, Schuchlantz H, Lüscher B, Amati B. 2007. Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* **449**: 933–7.
- Hahn S. 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 394–403.
- Hainer SJ, Martens JA. 2011. Identification of histone mutants that are defective for transcription-coupled nucleosome occupancy. *Mol Cell Biol* **31**: 3557–68.
- Harel-Sharvit L, Eldad N, Haimovich G, Barkai O, Duek L, Choder M. 2010. RNA Polymerase II Subunits Link Transcription and mRNA Decay to Translation. *Cell* **143**: 552–563.
- Haruki H, Nishikawa J, Laemmli UK. 2008. The anchor-away technique: rapid, conditional establishment of yeast mutant phenotypes. *Mol Cell* **31**: 925–32.
- Hassan AH, Prochasson P, Neely KE, Galasinski SC, Chandy M, Carrozza MJ, Workman JL.

2002. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* **111**: 369–79.
- Hemming SA, Edwards AM. 2000. Yeast RNA polymerase II subunit RPB9. Mapping of domains required for transcription elongation. *J Biol Chem* **275**: 2288–94.
- Hemming SA, Jansma DB, Macgregor PF, Goryachev A, Friesen JD, Edwards AM. 2000. RNA polymerase II subunit Rpb9 regulates transcription elongation in vivo. *J Biol Chem* **275**: 35506–11.
- Hsin J-P, Manley JL. 2012. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev* **26**: 2119–37.
- Hull MW, McKune K, Woychik NA. 1995. RNA polymerase II subunit RPB9 is required for accurate start site selection. *Genes Dev* **9**: 481–90.
- Kadonaga JT. Perspectives on the RNA polymerase II core promoter. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1**: 40–51.
- Kasten M, Szerlong H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Werner M, Cairns BR. 2004. Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *EMBO J* **23**: 1348–59.
- Keogh M-C, Kurdistani SK, Morris SA, Ahn SH, Podolny V, Collins SR, Schuldiner M, Chin K, Punna T, Thompson NJ, et al. 2005. Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* **123**: 593–605.
- Kirmizis A, Santos-Rosa H, Penkett CJ, Singer MA, Vermeulen M, Mann M, Bähler J, Green RD, Kouzarides T. 2007. Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature* **449**: 928–32.
- Knippa K, Peterson DO. 2013. Fidelity of RNA polymerase II transcription: Role of Rbp9 in error detection and proofreading. *Biochemistry* **52**: 7807–17.
- Kornberg RD. 1977. Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* **46**: 931–54.
- Krishnan V, Chow MZY, Wang Z, Zhang L, Liu B, Liu X, Zhou Z. 2011. Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 12325–30.
- Kuo Y-M, Andrews AJ. 2013. Quantitating the specificity and selectivity of Gcn5-mediated acetylation of histone H3. *PLoS One* **8**: e54896.
- Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP. 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**: 73–84.
- Lee KK, Workman JL. 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 284–95.
- Lee KM, Hayes JJ. 1997. The N-terminal tail of histone H2A binds to two distinct sites within the nucleosome core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8959–64.
- Li S, Chen X, Ruggiero C, Ding B, Smerdon MJ. 2006a. Modulation of Rad26- and Rpb9-mediated DNA repair by different promoter elements. *J Biol Chem* **281**: 36643–51.
- Li S, Ding B, Chen R, Ruggiero C, Chen X. 2006b. Evidence that the transcription elongation

- function of Rpb9 is involved in transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**: 9430–41.
- Li S, Smerdon MJ. 2004. Dissecting transcription-coupled and global genomic repair in the chromatin of yeast GAL1-10 genes. *J Biol Chem* **279**: 14418–26.
- Li S, Smerdon MJ. 2002. Rpb4 and Rpb9 mediate subpathways of transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **21**: 5921–9.
- Li Y, Flanagan PM, Tschochner H, Kornberg RD. 1994. RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science* **263**: 805–7.
- Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO, et al. 2009. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* **326**: 289–93.
- Liu CL, Kaplan T, Kim M, Buratowski S, Schreiber SL, Friedman N, Rando OJ. 2005. Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol* **3**: e328.
- Liu X, Bushnell DA, Silva D-A, Huang X, Kornberg RD. 2011. Initiation complex structure and promoter proofreading. *Science* **333**: 633–7.
- Lõoke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* **50**: 325–8.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251–60.
- Maeshima K, Hihara S, Eltsov M. 2010. Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr Opin Cell Biol* **22**: 291–7.
- Masumoto H, Hawke D, Kobayashi R, Verreault A. 2005. A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature* **436**: 294–8.
- McKune K, Moore PA, Hull MW, Woychik NA. 1995. Six human RNA polymerase subunits functionally substitute for their yeast counterparts. *Mol Cell Biol* **15**: 6895–900.
- Megee PC, Morgan BA, Mittman BA, Smith MM. 1990. Genetic analysis of histone H4: essential role of lysines subject to reversible acetylation. *Science* **247**: 841–5.
- Meyer PA, Ye P, Suh M-H, Zhang M, Fu J. 2009. Structure of the 12-subunit RNA polymerase II refined with the aid of anomalous diffraction data. *J Biol Chem* **284**: 12933–9.
- Mujtaba S, Zeng L, Zhou M-M. 2007. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* **26**: 5521–7.
- Van Mullem V, Wery M, Werner M, Vandehaute J, Thuriaux P. 2002. The Rpb9 subunit of RNA polymerase II binds transcription factor TFIIE and interferes with the SAGA and elongator histone acetyltransferases. *J Biol Chem* **277**: 10220–5.
- Nagy Z, Tora L. 2007. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* **26**: 5341–57.
- Nesser NK, Peterson DO, Hawley DK. 2006. RNA polymerase II subunit Rpb9 is important for transcriptional fidelity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3268–73.
- Ng HH, Ciccone DN, Morshead KB, Oettinger MA, Struhl K. 2003. Lysine-79 of histone H3 is

- hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1820–5.
- Olins AL, Olins DE. 1974. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* **183**: 330–2.
- Phillips DM. 1963. The presence of acetyl groups of histones. *Biochem J* **87**: 258–63.
- Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolsheimer E, et al. 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* **122**: 517–27.
- Poss ZC, Ebmeier CC, Taatjes DJ. The Mediator complex and transcription regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**: 575–608.
- Prabakaran S, Lippens G, Steen H, Gunawardena J. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **4**: 565–83.
- Rao SSP, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, Sanborn AL, Machol I, Omer AD, Lander ES, et al. 2014. A 3D Map of the Human Genome at Kilobase Resolution Reveals Principles of Chromatin Looping. *Cell* **159**: 1665–80.
- Reinmets K. 2014. Histoonide H3 ja H4 mutatsioonide mõju RNA polümeraas II sõltuvalle transkriptsioonile pagaripärmis. Bakalureusetöö, Tartu Ülikool.
- Rhee HS, Pugh BF. 2012. Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature* **483**: 295–301.
- Robzyk K, Recht J, Osley MA. 2000. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* **287**: 501–4.
- Runner VM, Podolny V, Buratowski S. 2008. The Rpb4 subunit of RNA polymerase II contributes to cotranscriptional recruitment of 3' processing factors. *Mol Cell Biol* **28**: 1883–91.
- Sainsbury S, Niesser J, Cramer P. 2013. Structure and function of the initially transcribing RNA polymerase II-TFIIB complex. *Nature* **493**: 437–40.
- Saunders A, Core LJ, Lis JT. 2006. Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 557–67.
- Schalch T, Duda S, Sargent DF, Richmond TJ. 2005. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* **436**: 138–41.
- Shieh GS, Pan C-H, Wu J-H, Sun Y-J, Wang C-C, Hsiao W-C, Lin C-Y, Tung L, Chang T-H, Fleming AB, et al. 2011. H2B ubiquitylation is part of chromatin architecture that marks exon-intron structure in budding yeast. *BMC Genomics* **12**: 627.
- Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun J-M, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL. 2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**: 844–7.
- Smart SK, Mackintosh SG, Edmondson RD, Taverna SD, Tackett AJ. 2009. Mapping the local protein interactome of the NuA3 histone acetyltransferase. *Protein Sci* **18**: 1987–97.
- Smolle M, Workman JL. 2013. Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 84–97.

- Sobel RE, Cook RG, Perry CA, Annunziato AT, Allis CD. 1995. Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1237–41.
- Sun ZW, Tessmer A, Hampsey M. 1996. Functional interaction between TFIIB and the Rpb9 (Ssu73) subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **24**: 2560–6.
- Tropberger P, Pott S, Keller C, Kamieniarz-Gdula K, Caron M, Richter F, Li G, Mittler G, Liu ET, Bühler M, et al. 2013. Regulation of transcription through acetylation of H3K122 on the lateral surface of the histone octamer. *Cell* **152**: 859–72.
- Walmacq C, Kireeva ML, Irvin J, Nedialkov Y, Lubkowska L, Malagon F, Strathern JN, Kashlev M. 2009. Rpb9 subunit controls transcription fidelity by delaying NTP sequestration in RNA polymerase II. *J Biol Chem* **284**: 19601–12.
- Walter PP, Owen-Hughes TA, Côté J, Workman JL. 1995. Stimulation of transcription factor binding and histone displacement by nucleosome assembly protein 1 and nucleoplasmin requires disruption of the histone octamer. *Mol Cell Biol* **15**: 6178–87.
- Wang X, Hayes JJ. 2008. Acetylation mimics within individual core histone tail domains indicate distinct roles in regulating the stability of higher-order chromatin structure. *Mol Cell Biol* **28**: 227–36.
- Widom J, Klug A. 1985. Structure of the 300Å chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples. *Cell* **43**: 207–13.
- Williams SP, Athey BD, Muglia LJ, Schappe RS, Gough AH, Langmore JP. 1986. Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length. *Biophys J* **49**: 233–248.
- Wittschieben BO, Fellows J, Du W, Stillman DJ, Svejstrup JQ. 2000. Overlapping roles for the histone acetyltransferase activities of SAGA and elongator in vivo. *EMBO J* **19**: 3060–8.
- Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Golshani A, Zhang Y, Greenblatt JF, et al. 2003. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* **11**: 267–74.
- Woodcock CL, Frado LL, Rattner JB. 1984. The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J Cell Biol* **99**: 42–52.
- Woychik NA, Lane WS, Young RA. 1991. Yeast RNA polymerase II subunit RPB9 is essential for growth at temperature extremes. *J Biol Chem* **266**: 19053–5.
- Xiao T, Kao C-F, Krogan NJ, Sun Z-W, Greenblatt JF, Osley MA, Strahl BD. 2005. Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **25**: 637–51.
- Xu F, Zhang K, Grunstein M. 2005. Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell* **121**: 375–85.
- Yamada T, Yamaguchi Y, Inukai N, Okamoto S, Mura T, Handa H. 2006. P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell* **21**: 227–37.
- Yang Z, Zheng C, Thiriet C, Hayes JJ. 2005. The core histone N-terminal tail domains negatively

regulate binding of transcription factor IIIA to a nucleosome containing a 5S RNA gene via a novel mechanism. *Mol Cell Biol* **25**: 241–9.

LISAD

Lisa 1. *Drop-out* segu koostis SC söötmete jaoks

Valmistatud segust kasutatakse 2 g 1 liitri söötme kohta

Ühend	Kogus
Alaniin	2 g
Arginiin	2 g
Asparagiin	2 g
Aspartaat	2 g
Tsüsteiin	2 g
Glutamiin	2 g
Glutamaat	2 g
Glütsiin	2 g
Inositol	2 g
Isoleutsiin	2 g
Lüsiin	2 g
Metioniin	2 g
Para-aminobensoehape	2 g
Fenüülalaniin	2 g
Proliin	2 g
Seriin	2 g
Treoniin	2 g
Türosiin	2 g
Valiin	2 g

Lisa 2. Kasutatud pärimüved

Tüvi	Genotüüp
W303	<i>S. cerevisiae</i> , MAT A, <i>ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1, can1-100R lys2</i>
AKY217	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX Ycp50:hht2-hhf2 (URA3)</i> (saadud tüvest DY5733, (Wittschieben et al. 2000))
AKY796	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX rpb9-natMX6 Ycp50:hht2-hhf2 (URA3)</i>
AKY1037	W303, MAT α , <i>hht1-hhf1::LEU2 gal-pr-vps13::TRP1 hht2-hhf2::kanMX rpb9::natMX6 Ycp50:hht2-hhf2 (URA3)</i>
HHY168 (AKY1115)	MAT α , <i>ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ rpl13a-2-fkbp12::TRP1 fpr1::natMX6 tor1-1</i>
AKY1116	HHY168, MAT α , <i>rpl13a-2-fkbp12::TRP1 fpr1::natMX6 tor1-1 rpb9-frb::hghMX</i>
AKY1158	MAT A, <i>ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ rpl13a-2-fkbp12::TRP1 fpr1::natMX6 tor1-1 rpb9-frb::hghMX hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX Ycp50:hht2-hhf2 (URA3)</i>
AKY1159	MAT A, <i>ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ fpr1::natMX6 tor1-1 rpb9-frb::hghMX hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX Ycp50:hht2-hhf2 (URA3)</i>
AKY1160	MAT α , <i>ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ rpl13a-2-fkbp12::TRP1 fpr1::natMX6 tor1-1 hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX Ycp50:hht2-hhf2 (URA3)</i>
AKY1162	MAT A, <i>ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ rpl13a-2-fkbp12::TRP1 fpr1::natMX6 tor1-1 rpb9-frb::hghMX hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX [pRS413-H3H4-3F12(HIS3)]</i>
AKY1163	MAT A, <i>ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ rpl13a-2-fkbp12::TRP1 fpr1::natMX6 tor1-1 rpb9-frb::hghMX hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX [pRS413-H3H4-3F12-H3K14;23R(HIS3)]</i>
AKY1164	MAT α , <i>ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ rpl13a-2-fkbp12::TRP1 fpr1::natMX6 tor1-1 hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX [pRS413-H3H4-3F12(HIS3)]</i>
AKY1165	MAT α , <i>ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ rpl13a-2-fkbp12::TRP1 fpr1::natMX6 tor1-1 hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX [pRS413-H3H4-3F12-H3K14;23R(HIS3)]</i>

AKY1167	MAT A, <i>ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ fpr1::natMX6 tor1-1 rpb9-frb::hghMX hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12(HIS3)]
AKY1190	MAT A, <i>ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ rpl13a-2-fkbp12::TRP1 fpr1::natMX6 tor1-1 rpb9-frb::hghMX hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3K9;14;23R(HIS3)]
AKY1191	MAT A, <i>ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ fpr1::natMX6 tor1-1 rpb9-frb::hghMX hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3K9;14;23R(HIS3)]
AKY1192	MAT A, <i>ade 2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ rpl13a-2-fkbp12::TRP1 fpr1::natMX6 tor1-1 hht1-hhf1::LEU2 hht2-hhf2::kanMX</i> [pRS413-H3H4-3F12-H3K9;14;23R(HIS3)]

Lisa 3. Kasutatud plasmiidid

	Plasmiid	Kirjeldus	Valmistatud antud töö käigus
1	pRS413-H3H4-3F12	CEN, <i>HIS3</i> , H3-3F12; H4	Ei
2	pRS413-H3H4-2F12-H3K9R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9R-3F12; H4	Ei
3	pRS413-H3H4-3F12-H3K14R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K14R-3F12; H4	Ei
4	pRS413-H3H4-3F12-H3K18R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K18R-3F12; H4	Ei
5	pRS413-H3H4-3F12-H3K23R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K23R-3F12; H4	Ei
6	pRS413-H3H4-3F12-H3K27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K27R-3F12; H4	Ei
7	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;14R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;14R-3F12; H4	Jah
8	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;18R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;18R-3F12; H4	Jah
9	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;23R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;23R-3F12; H4	Jah
10	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;27R-3F12; H4	Jah
11	pRS413-H3H4-3F12-H3K14;18R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K14;18R-3F12; H4	Jah
12	pRS413-H3H4-3F12-H3K14;23R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K14;23R-3F12; H4	Jah
13	pRS413-H3H4-3F12-H3K14;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K14;27R-3F12; H4	Jah
14	pRS413-H3H4-3F12-H3K18;23R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K18;23R-3F12; H4	Jah
15	pRS413-H3H4-3F12-H3K18;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K18;27R-3F12; H4	Jah
16	pRS413-H3H4-3F12-H3K23;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K23;27R-3F12; H4	Jah
17	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;14;18R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;14;18R-3F12; H4	Jah
18	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;14;23R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;14;23R-3F12; H4	Jah
19	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;14;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;14;27R-	Jah

		3F12; H4	
20	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;18;23R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;18;23R-3F12; H4	Jah
21	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;18;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;18;27R-3F12; H4	Jah
22	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;23;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;23;27R-3F12; H4	Jah
23	pRS413-H3H4-3F12-H3K14;18;23R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K14;18;23R-3F12; H4	Jah
24	pRS413-H3H4-3F12-H3K14;18;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K14;18;27R-3F12; H4	Jah
25	pRS413-H3H4-3F12-H3K14;23;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K14;23;27R-3F12; H4	Jah
26	pRS413-H3H4-3F12-H3K18;23;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K18;23;27R-3F12; H4	Jah
27	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;14;18;23R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;14;18;23R-3F12; H4	Jah
28	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;14;18;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;14;18;27R-3F12; H4	Jah
29	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;14;23;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;14;23;27R-3F12; H4	Jah
30	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;18;23;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;18;23;27R-3F12; H4	Jah
31	pRS413-H3H4-3F12-H3K14;18;23;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K14;18;23;27R-3F12; H4	Jah
32	pRS413-H3H4-3F12-H3K9;14;18;23;27R	CEN, <i>HIS3</i> , H3K9;14;18;23;27R-3F12; H4	Jah
33	pFA6a-FRB-HIS3MX	<i>HIS3</i> , <i>FRB</i>	Ei
34	pFA6a-FRB-hphMX	<i>hphMX</i> , <i>FRB</i>	Ei

Lisa 4. Kasutatud oligonukleotiidid

	Oligonukleotiidi nimi	Järjestus
1	PRS413-F	5' GCGTAATACGACTCACTATAGG 3'
2	HHT2-F	5' CTCGGTGTCAAAACATAGTTTG 3'
3	H3-K9R_1	5' CAAACAGCTAGAAGATCCACTGGTGGT 3'
4	H3-K9R_2	5' ACCACCAGTGGATCTTCTAGCTGTTTG 3'
5	H3-K14R_1	5' CCACTGGTGGTAGAGCCCCAAGAAAACAA 3'
6	H3-K14R_2	5' TTTCTTGGGGCTCTACCACCAGTGGATT 3'
7	H3-K18R_1	5' GCCCAAGAAGACAATTAGCCTCC 3'
8	H3-K18R_2	5' GGAGGCTAATTGTCTTCTTGGGGC 3'
9	H3-K23R_11	5' CAATTAGCCTCCAGGGCTGCCAGA 3'
10	H3-K23R_21	5' TCTGGCAGCCCTGGAGGCTAATTG 3'
11	H3-K27R_1	5' GCTGCCAGAAGATCCGCCCCATCTACC 3'
12	H3-K27R_2	5' GGTAGATGGGGCGGATCTTCTGGCAGC 3'
13	Rpb9-FRB-F	5' GCTCACACATATTTACTTCAGATCAAAAAACAAA AGGACGCAGTTTTTCAGGTCGACGGATCCCCGGGTT 3'
14	Rpb9-FRB-R	5' AGTCCCATTTTCTCTCCCTCTGTCATTAATTTGA AAGTTCGTTGAGCACTCGATGAATTCGAGCTCGTT 3'
15	Rpb9-N71-F	5' ATTCTAGAATG TCTGATAGAGAATGTCCCAAAT GTC 3'
16	ADH1-ctrl-R	5' AGCAACCTGACCTACAGGAAAGA 3'
17	FBA1-REAL-D1-F	5' TTGCACCCAATCTCTCCAAACTT 3'
18	FBA1-RREAL-D1-R	5' ATTTCTGGTCTCAAAGCGATGTCA 3'
19	GAL10-1kb-F	5' ACCGAGTTGCAGGTTGAAGAC 3'
20	GAL10-1kb-R	5' TGCCGGCACCAATAGTCAC 3'

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma juhendajat Arnold Kristjuhanit abi ja juhendamise, meie uurimisrühma ja kogu rakubioloogia õppetooli lõbusa seltskonna ning oma pere ja lähedasi igakülgse toetuse eest.

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristina Reinmets (sünnikuupäev: 28.12.1991),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Histooni H3 atsetüleerimise ja RNA polümeraas II subühiku Rpb9 koosmõju transkriptsioonile pagaripärmis“, mille juhendaja on Prof. Arnold Kristjuhan,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015