

TARTU ÜLIKOOL

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

**Yaf9 valgu vajalikkus DNA kaheahelaliste katkete parandamisel  
pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae***

Bakalaureusetöö

12 EAP

Ronald Varik

Juhendajad PhD Kadri Peil

Prof. Arnold Kristjuhan

TARTU 2023

## **INFOLEHT**

### **Yaf9 valgu vajalikkus DNA kaheaheelaliste katkete parandamisel pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae***

Yaf9 on üks kolmest YEATS domeeni sisaldavast valgust pagaripärmis ja on osa kahest valgu kompleksist, mis teostavad kromatiini modifikatsioone. Yaf9 pole pärmis eluks ega kasvuks vajalik valk, kuid Yaf9 mängib olulist rolli DNA kaheaheelaliste katkete parandamisel. Yaf9W89A mutandi DNA kaheaheelalise katke parandamise efektiivsust võrreldi metsiktüüpi Yaf9 ja Yaf9 deletsiooni tüvedega.

**Märksõnad:** Yaf9, YEATS, DSB, kromatiin

**CERCS kood:** B220 Geneetika, tsütogeneetika

### **Requirement of Yaf9 protein in DNA double-strand break repair in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae***

Yaf9 is one of three YEATS domain proteins in baker's yeast and is part of two protein complexes that perform chromatin modifications. Yaf9 is not a protein required for yeast life or growth, but Yaf9 plays an important role in repairing DNA double-strand breaks. DNA double-strand break repair efficiency of the Yaf9W89A mutant was compared with wild-type Yaf9 and Yaf9 deletion strains.

**Keywords:** Yaf9, YEATS, DSB, chromatin

**CERCS code:** B220 Genetics, cytogenetics

## SISUKORD

INFOLEHT .....	2
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	8
1.1 Pärm kui mudelorganism.....	8
1.2 Kromatiin.....	9
1.3 Kromatiini struktuur.....	9
1.4 Kromatiini modifikatsioonid.....	11
1.5 YEATS domeen .....	12
1.6 Yaf9 .....	13
1.7 SWR1 ja NuA4 .....	14
1.8 DNA kaheaheelalise katke parandamise mehhanismid .....	15
1.9 Paardumistüübi vahetus.....	16
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	19
2.1 Töö eesmärgid.....	19
2.2 Metoodika .....	19
2.2.1 Kasutatud tüved, plasmiidid ja söötmed .....	19
2.2.2 URA3 markergeeni ja Yaf9W89A ekspressioonikasseti PCR amplifitseerimine .....	20
2.2.3 Liitiumatsetaadiga DNA eraldamine .....	20
2.2.4 Kolooniade kontrollimine .....	21
2.2.5 Agaroosgeelelektroforees.....	21
2.2.6 Transformatsioon.....	22
2.2.7 Elektroporatsioon.....	22

2.2.8 Lahjenduste rea analüüs .....	23
2.2.9 DNA kaheaahelalise katke (DSB) parandamise analüüs .....	23
2.2.10 Genoomse DNA eraldamine pärmirakkudest ja MAT lookuse lõikuse kontroll PCR meetodil .....	23
2.3 TULEMUSED. ARUTELU .....	25
2.3.1 Yaf9 $\Delta$ ja Yaf9W89A tüve konstrueerimine.....	25
2.3.2 Lahjenduste rea analüüs testimaks Yaf9 olulisust MMS-i talumisel .....	28
2.3.3 HO-endonukleaasi ekspresseerivate Yaf9W89A ja Yaf9 $\Delta$ tüve konstrueerimine.....	29
2.3.4 Lahjenduste rea analüüs testimaks GAL-HO endonukleaasi efektiivsust.....	31
2.3.5 Galaktoosiga indutseeritava HO-endonukleaasiga tehtud DNA kaheaahelalise katke analüüs .....	32
KOKKUVÕTE.....	35
SUMMARY .....	36
TÄNUSÕNAD .....	37
KASUTATUD KIRJANDUS .....	38
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	43
LISAD.....	44
Lisa 1 .....	44
Lisa 2 .....	46
Lisa 3 .....	47
LIHTLITSENT.....	48

## KASUTATUD LÜHENDID

5-FOA – *5-Fluoroorotic acid* (5-fluoro-oroothape)

BIR – **break-induced replication** (katkestusest põhjustatud replikatsioon)

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

HAT – *histone acetyltransferases* (histoonide atsetüültransferaasid)

HDAC – *histone deacetylases* (histoonide deatsetülaasid)

HML – *homothallic mating left* (homotallismi alleel vasakul)

HMR – *homothallic mating right* (homotallismi alleel paremal)

HMT – *histone methyltransferases* (histoonide metüültransferaasid)

HR – *homologous recombination* (homoloogiline rekombinatsioon)

MAT – *mating type* (paardumistüüp)

MMS – *methyl methanesulfonate* (metüülmetaan sulfonaat)

NHEJ – *non-homologous end joining* (mitte homoloogiline otste ühendamine)

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

ODCaas – *orotidine 5'-phosphate decarboxylase* (orotiin-5-monofosfaat dekarboksülaas)

PTM – *post-translational modification* (post-translatoorsed modifikatsioonid)

SC – *synthetic complete medium* (sünteetiline täissööde)

SDSA – **synthesis-dependent strand annealing** (sünteesist sõltuv ahela kokkusulandumine)

SSA – **single-strand annealing** (üheaheelaline kokkusulandumine)

SWI/SNF – *switching defective/sucrose nonfermenting* (defektseid väljavahetav/sahharoosi mittefermenteeriv) kromatiini modifitseerivate valkude perekond

SWR1 – *SWI2/SNF2-related 1 chromatin remodeling complex* (SWI2/SNF2-ga sarnane kromatiini ümber kujundamise kompleks)

TAE – *Tris-acetate-EDTA* (Tris-atsetaat, EDTA)

Yaf9 – *yeast AF9* (pärmis AF9)

YEATS – Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5

YNB – *yeast nitrogen base* (pärmis lämmastiku alus)

YPD – *yeast extract peptone dextrose* (pagaripärmis ekstrakt, peptoon, dekstroos)

## SISSEJUHATUS

Oma pärliliku materjali kaitsmine ja edasi pärandamine on organismidele kõige tähtsam ülesanne elus. DNA kaitsmiseks on nii prokariootides kui ka eukariootides kindlad meetodid, olgu need kaitsemehhanismid või parandusmehhanismid. Üks nendest valkudest, mis võib olla oluline DNA kahjustuste parandamisel pagaripärmis, on Yaf9, mille homolooge leidub ka teistes eukariootides.

Yaf9 on üks kolmest YEATS domeeni valgust pagaripärmis. YEATS domeeni tähtsus seisneb atsetüleeritud lüsiini jääkide ära tundmisest ja neile seondumisest. Yaf9 valk on osa kahest kromatiini modifitseerivast valgukompleksist. Esimene neist kompleksidest on NuA4 (*nucleosomal acetyltransferase of H4*), mille ülesanne on atsetüleerida histooni H4 lüsiinijääke. Teiseks on SWR1 (*SWI2/SNF2-related 1 chromatin remodeling complex*) kompleks, mis vahetab H2A-H2B histoonide dimeeri Htz1-H2B dimeeri vastu. Mõlemad on olulised kompleksid, mis viivad läbi kromatiini modifikatsioone ja mõlemad osalevad DNA parandamisel.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida Yaf9 tähtsust DNA kaheaheelalise katke parandamisel ja võrrelda tulemusi inaktiivset YEATS domeeni sisaldava Yaf9 valguga. Selleks kasutati mudelorganismina pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*). Konstrueeriti Yaf9 deletsiooniga tüvi ja Yaf9 mutant, kus 89 positsioonil on trüptofaan asendatudalaniiniga, mille tulemusel ei seondu valgu YEATS domeen enam atsetüleeritud H3 histooniga. DNA katked tekitati keemiliselt MMS (*methyl methanesulfonate*) lahusega või galaktoosi poolt indutseeritud HO-endonukleasiga.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Pärm kui mudelorganism

Pagaripärm (*Saccharomyces cerevisiae*) on mikrobioloogia- ja geneetikalaborites kasutusel mudelorganismina, mille abil õpitakse teiste eukarüootide k.a inimese bioloogiat (Nielsen, 2019).

Pagaripärm on klassifitseeritud kui üherakuline eukarüootne seen. Pärm sobib hästi mudelorganismiks, sest tema genoom on laboritingimustes kergelt modifitseeritav, teda on lihtne kasvatada ning pagaripärm ei ole patogeenne (Duina, Miller, Keeney, 2014). Pärm jaguneb mitoosi teel 30 °C juures keskmiselt iga 90 minuti järel (Duina, Miller, Keeney, 2014). Pagaripärmi kasvatatakse tavaliselt YPD (*yeast extract peptone dextrose*) agarsöötmele, enamasti on söötmesse lisatud suhkruks glükoos (2%), mis on *S. cerevisiae* eelistatuim süsinikuallikas. Lisaks suhkrule sisaldab YPD sööde pagaripärmide kasvuks vajalikke aminohappeid, 1% pärmiekstrakti ja lämmastikuallikaks 2% peptooni (Duina, Miller, Keeney, 2014).

Võrreldes teiste eukarüootidega on pagaripärmide kerge transformeerida ja kloonida (Sherman, 2002). Plasmiide saab integreerida pagaripärmide genoomi, sest pärmide DNA integreerumine toimub läbi homoloogilise rekombinatsiooni (Sherman, 2002).

Looduses on pärmil kaks paardumistüüpi, haploid  $a$  ja haploid  $\alpha$ , mis moodustavad diploidse raku, mis jaguneb mitoosi teel. Halvematel keskkonnatingimustel on diploididel raku vajadusel võime jaguneda meiosis teel, moodustades haploidsed spoorid (Duina, Miller, Keeney, 2014). Laboritingimustes eelistatakse kasutada haploidsed rakke, sest see vähendab mutantide ja vanematest geneetiliselt erinevate järglaste teket. Eri *S. cerevisiae* tüvesid on kerge säilitada aastaid, külmutades neid –80 °C juures glütseroolilahuses (Duina, Miller, Keeney, 2014).

Pagaripärm oli esimene eukarüootne organism, kelle genoom sekveneeriti 1996. aastal (Goffeau *et al.*, 1996). See on tähtis, kuna pärm on üherakuline eukarüoot, kelles toimuvad sarnased kui mitte samad protsessid, mis teistes päristuumsetes organismides nagu inimesed.

## 1.2 Kromatiin

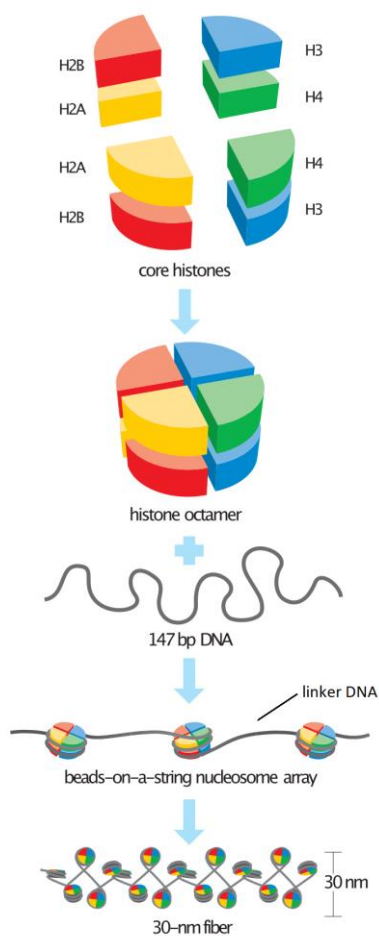
1879-ndal aastal nägi Walther Flemming mikroskoobi all kergesti värvitavaid niidikesi, mida tema nimetas kromatiiniks. Tänapäeval on teada, et see mis ta nägi oli mitoosi ajal väga tihedalt pakitud kromosoom. Flemmingu poolt pakitud sõna „kromatiin“ sai hiljem endale uue tähenduse: nukleoproteiini kompleks, kus histoonide abil on DNA pakitud kompaktsemaks struktuuriks (Deichmann, 2015).

Kromatiin eksisteerib kahes erinevas konfiguratsioonis, esiteks tihedalt pakitud ning inaktiivne heterokromatiin, milles transkriptsioon on vaigistatud. Lisaks on avatum, vähesemal määral kondenseerunud eukromatiin, kus DNA on erinevatele valkudele kergemini ligipääsetav ning see omadus lubab transkriptsioonil toimuda (Tamaru, 2010). Suurem osa pagaripärmi geenidest paikneb eukromatiinis, vaigistatud heterokromatiinsed piirkonnad on telomeerid, ribosomaalse DNA (rDNA) lookus ja vaigistatud paardumistüübi lookused (Rusche *et al.*, 2003).

## 1.3 Kromatiini struktuur

Kromatiini struktuuri esmaseks pakkimisastmeks on nukleosoomid, mis koosnevad histooni oktameeridest, mille ümber on keerdunud umbes 146–147 aluspaari DNA-d, selline struktuur kordub iga 100 ongströmi tagant (Joonis 1) (Kornberg, 1974). Nukleosoomis olev histooni oktameer koosneb tavaliselt kahest koopiast H2A-H2B ja H3-H4 dimeerist, H1 histoon ei osale nukleosoomi kompleksi moodustumisel, vaid kinnitub valmis kompleksi külge lukustades histoonide ümber keritud DNA (Luger *et al.*, 1997). Histoonid seovad DNA-d fosfodiester selgroo kaudu iga 10 bp tagant. DNAd, millele seondub H1 histoon ning mis seob ühe nukleosoomi teisega, nimetatakse *linker* DNA-ks (Joonis 1) (Kornberg ja Lorch, 1999). DNA teeb histooni oktameeri ümber 1,65 kordse vasakukäelise pöörde (Luger *et al.*, 1997). H1 histoon on kõrgemates eukariootides väga vajalik, kuid pagaripärmis H1 histooni homoloogi HHO1 deletsioon ei mõjuta pärmis kasvu, paardumist ega kromatiini struktuuri (Patterton *et al.*, 1998). Histoonid on üldiselt konserveerunud, erandiks on pärmides HHO1, nt inimese H4 ja pärmis H4 vahel on 94% homoloogiat, aga inimese H1 ja pärmis HHO1 vahel on 31% homoloogiat (Harshman *et al.*, 2013).

Histoonid jagunevad põhiliselt kaheks osaks: N-terminaalne osa ehk histooni saba ja C-terminaalses osas olev konserveerunud histooni voldi domeen (*histone fold*). Mõnel histoonil on ka C-terminaalne saba, mis ulatub nukleosoomi kerest välja. N-terminaalne osa ulatub nukleosoomist välja ja seal toimuvad suurem osa post-translatsioonilisi modifikatsioone (PTM) (Luger et al., 1998). Järjestikused nukleosoomid moodustavad “pärlid nõõril” struktuuri, mis moodustab 30 nm laia fiibri, selline pakkimine vähendab DNA pikkust umbes 66% võrra (Morgan, 2007).



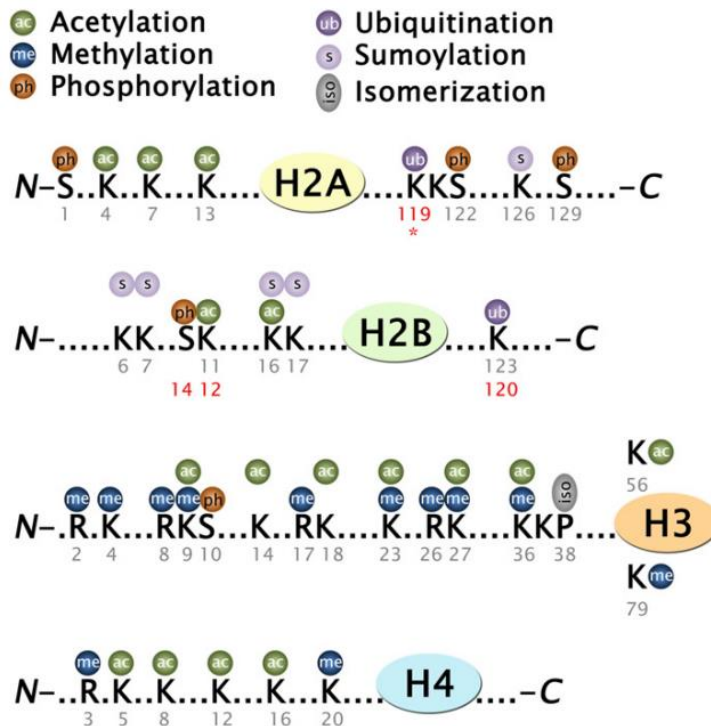
**Joonis 1. Kromatiini struktuur.** Histooni oktameeri moodustavad histoonid (kaks koopiat H2B, H2A, H3 ja H4 histoone). 147 bp pikkune DNA lõik ja histooni oktameer moodustavad *linker* DNA poolt ühendatud nukleosoomid, mis omakorda moodustavad kõrgema pakkimise astme, 30 nm fiibri. (Morgan, 2007, modifitseeritud).

#### 1.4 Kromatiini modifikatsioonid

DNA hulk, mida on vaja pidevalt kokku pakkida ja lahti kerida, olgu see transkriptsiooni, replikatsiooni või DNA paranduste jaoks on märkimisväärne (näiteks inimese rakkudes on peaaegu 2 m DNA-d) (Clapier *et al.*, 2009). Selle toimumiseks on vajalikud kromatiini remodelleerivad valgukompleksid (*remodelers*). Need kompleksid kasutavad ATP hüdrolyüüsi energiat, et muuta kromatiini pakkimise taset (Clapier *et al.*, 2009).

Kromatiini remodelleerijad jagatakse nelja valguperekonda: SWI/SNF, ISWI, CHD ja INO80. Kõigil neil on järgmised ühised omadused: ATPaasi domeen, kovalentseid histooni modifikatsioone ära tundev domeen, afiinsus nukleosoomi vastu, domeenid ja valgud, mis reguleerivad ATPaasi ning domeenid ja valgud, mis mõjutavad teisi kromatiini- või transkriptsioonifaktoreid (Clapier *et al.*, 2009). Igal remodelleerija grupil on ka kindlad erisused, mis tagavad neile spetsialiseerumise (Clapier *et al.*, 2009).

Põhilised post-translatsioonilised modifikatsioonid leiavad aset histoonide N-terminaalsetes otstes. Kõige tavalisemad PTM-d on atsetüleerimine, metüleerimine, fosforüleerimine ja ubikvitinüleerimine (Joonis 2) (Kouzarides, 2007). Histonide metüleerimine toimub H3 ja H4 histoonide lüsiini (K, Lys) ja arginiini (R, Arg) jääkide juures. Seda protsessi viivad läbi histooni metüültransferaasid (HMT). Metüleeritud lüsiinid tuvastavad ära valgud, mis sisaldavad kromodomeeni (Schulze *et al.*, 2009). Histonide metüleerimine suurendab või vähendab geenide transkriptsiooni, olenevalt metüleeritavuse astmest (Zhang *et al.*, 2021). Histonide atsetüleerimist kontrollivad histoonide atsetüültransferaasid (HAT) ja histoonide deatsetülaasid (HDAC) (Barnes *et al.*, 2019). Enamus HAT komplekse sisaldavad bromodomeeni, mis tunneb ära atsetüleeritud lüsiini (Zeng & Zhou, 2002). Lüsiini atsetüleerimine muudab lüsiini laengut ja seetõttu langeb lüsiini afiinsus kromatiini suhtes, langetades kromatiini pakkimise taset, mis avab DNA transkriptsioonile (Barnes *et al.*, 2019). Fosforüleerimine toimub seriini (S, Ser) ja türosiini (Y, Tyr) jääkidel, olles oluline protsess, mis mõjutab geenide ekspressiooni, rakutsükli regulatsiooni ja DNA parandamist (Zhang *et al.*, 2021).



**Joonis 2. Histonide post-translatsioonilised modifikatsioonid.** Joonisel on näha histoonide C- ja N-terminaalsetes sabades toimuvaid post-translatsioonilisi modifikatsioone, aminohappeid ja nende positsioone, kus modifikatsioonid aset leiavad (Smolle & Workman, 2012).

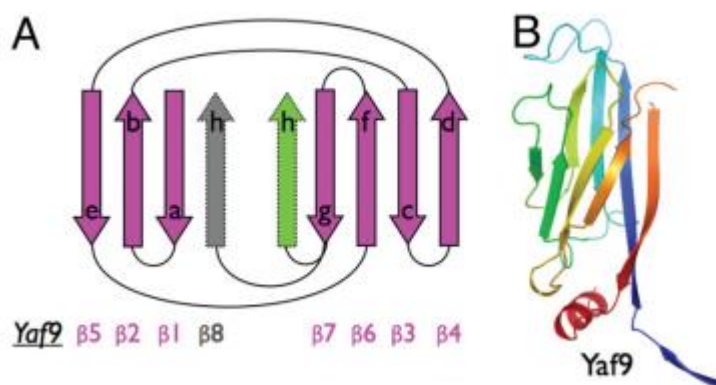
### 1.5 YEATS domeen

YEATS domeen on oma nime saanud valkude järgi, kus YEATS domeen esimesena avastati: Yaf9, ENL, AF9, Taf14, ja Sas5 (Schulze *et al.*, 2009). YEATS domeen on evolutsiooniliselt tugevalt konserveerunud valgu struktuur, asudes ka teistes eukariootsetes organismides, tavaliselt suure homoloogiaga (Zhang *et al.*, 2004).

Pagaripärmis leiduvad YEATS domeeni valgud on: Taf14, Sas5 ja Yaf9. YEATS-i valgud on vajalikud geeniekspressiooni jaoks, transkriptsiooni toetamiseks ja kromatiini remodelleerimiseks (Zhang *et al.*, 2004). YEATS domeen asub igas valgus ainult ühes korduses, see on erinev teistest kromatiini modifikatsioonidega seonduvatest domeenidest, mida võib olla valgus ka mitmes korduses, näiteks pärmis Bdf1 valk sisaldab kahte

bromodomeeni (Schulze *et al.*, 2009). YEATS domeen seondub atsetüleeritud või krotonüleeritud lüsiinidega histoonide N-terminaalsetel sabadel, mis võib olla viisiks, kuidas tuua kromatiinile erinevaid kromatiini modifikatsioone tegevaid komplekse (Schulze *et al.*, 2010).

YEATS domeen on voltunud  $\beta$ -lehe kompleksiks, mis koosneb kaheksast antiparalleelsest ehk paralleelsetest, aga erinevate suundadega  $\beta$ -lehtedest, mille ühes otsas on kaks lühikest  $\alpha$ -heeliksit (Joonis 3) (Wang *et al.*, 2009). YEATS domeeni keskmiseks pikkuseks on 83 aminohappet ja tihti asub valgu N-terminaalses otsas (Schulze *et al.*, 2009).



**Joonis 3. Yaf9 YEATS domeeni struktuur.** Joonisel A on näha lihtsustatud Yaf9 YEATS domeeni antiparalleelsete  $\beta$ -lehtede paigutust ja joonisel B on näha Yaf9 YEATS domeeni lintdiagrammi (Wang *et al.*, 2009).

### 1.6 Yaf9

Yaf9 (*yeast* AF9) valk sisaldab YEATS domeeni ning on osa NuA4 ja SWR1 valgukompleksidest (Joonis 4). Yaf9 on vajalik H2A.Z (Htz1) histoonide lisamiseks kromatiini. Yaf9W89A on mutantne Yaf9, kus trüptofaan (W, Trp) on 89 positsioonil asendatud alaniiniga (A, Ala). Selline modifikatsioon muudab YEATS domeeni ja seetõttu YEATS domeen ei tunne enam atsetüleeritud histoone ära nagu näiteks H3K27ac (Klein *et al.*, 2018). Yaf9 $\Delta$  ja Yaf9W89A tüved on tundlikumad DNA kahjustustele ja stressi tekitavatele teguritele. Nendes tüvedes H2A.Z histoone ei atsetüleerita, kuid H3K27ac atsetüleerimist Yaf9 mutatsioon või deletsioon ei mõjuta (Klein *et al.*, 2018). NuA4 kompleks ilma Yaf9 valguta säilitab oma omaduse atsetüleerida H4 histoone, mis viitab sellele, et Yaf9 roll on pigem NuA4

suunamisel või reguleerimisel, mitte ensümaatilise aktiivsuse regulatsioonis (Zhang *et al.*, 2004). Lisaks on Yaf9 deletsiooniga tüvedel vähenenud telomeeride läheduses paiknevate geenide ekspressioon (Klein *et al.*, 2018).



**Joonis 4. Yaf9 valgu struktuur.** Yaf9 valk, mis koosneb konserveerunud YEATS domeenist, A-box ja B-box/coiled-coil otsast, Yaf9 pikkuseks on 226 aminohapet (Schulze *et al.*, 2009).

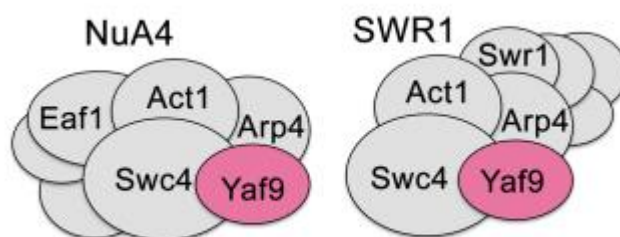
Eelnev viitab sellele, et Yaf9 on vajalik DNA katkete parandamiseks. Valgu olemasolu tõstab pagaripärmi tolerantsi madalamate temperatuuride, kofeiini, metüülmetaan sulfonaadi (*methyl methanesulfonate* ehk MMS), UV-kiirguse ja teiste DNA-d lõhkuvate või mutatsioone põhjustavate ainete vastu (Schulze *et al.*, 2009). See tähendab, et Yaf9-ga rakud on võimelised ka halvemates tingimustes kasvama ja paljunema. Yaf9 on oluline DNA parandamisel ja histoonide ümber oleva DNA kokku ja lahti kerimisel (Zhang *et al.*, 2004).

## 1.7 SWR1 ja NuA4

SWI/SNF (*switch/sucrose non-fermentable*) on kromatiini remodelleerimisvalgud, mis avastati esimesena pagaripärmis (Clapier *et al.*, 2009). SWR1 (*SWI2/SNF2-related 1 chromatin remodeling complex*) kompleks koosneb kuni 14-st subühikust, millest üks on Yaf9 (Joonis 5). SWR1 kompleks vahetab nukleosoomis H2A-H2B dimeeri Htz1-H2B (H2A.Z inimeses) dimeeri vastu (Willhoft *et al.*, 2018). H2A.Z (Htz1 pärmis) on oluline transkriptsiooni reguleerimiseks ja DNA parandamiseks (Schulze *et al.*, 2010). SWI/SNF perekonna valkude, k.a SWR1, ATPaas sisaldab bromodomeeni, mis tuvastab ja kinnitub atsetüleeritud histoonide külge (Zhang *et al.*, 2021). Atsetüleeritud lüsiinide tuvastajaks selles kompleksis on ka Yaf9 valgus asuv YEATS domeen (Schulze *et al.*, 2010).

Teine Yaf9 valku sisaldav kompleks, mis kujundab ümber kromatiini, on NuA4 (*nucleosomal acetyltransferase of H4*) (Joonis 5). Lisaks histoonide H4, H2A ja H2A.Z (Htz1 pagaripärmis)

atsetüleerimisele, reguleerib NuA4 transkriptsiooni ja DNA parandusmehhanismi (Klein *et al.*, 2018). NuA4 atsetüleerib N-terminaalse saba 5, 8 ja 12 positsioonis olevaid lüsiine. NuA4 valgukompleks koosneb umbes 12-st subühikust (Le Masson *et al.*, 2003). NuA4 funktsioon atsetüleerida H4 histoone, ei ole häiritud, kui tegemist on Yaf9A tüvega (Le Masson *et al.*, 2003).



**Joonis 5. NuA4 ja SWR1 komplekside struktuur.** Joonisel on näha Yaf9 paigutust NuA4 ja SWR1 kompleksides (Klein *et al.*, 2018).

### 1.8 DNA kaheaahelalise katke parandamise mehhanismid

Pagaripärmis toimub DSB (*double-strand break*) parandamine homoloogilise rekombinatsiooni (HR) kaudu või mittehomoogilise otste ühendamise (NHEJ) mehhanismi läbi (Frigerio *et al.*, 2023). HR puhul DNA 5' otsad degradeerib DNA nukleas ja sellele järgneb üleulatuvate 3' ssDNA otsade homoloogiline rekombinatsioon, mida teostab DNA ligaas. NHEJ puhul ligeeritakse DNA lahtised otsad DNA ligaasi poolt kokku, selle meetodiga on suurem võimalus vigade tekkeks kuna tihti toimub mõne nukleotiidi deletsioon või insertioon (Emerson & Bertuch, 2016). Homoloogiline rekombinatsioon on turvalisem, kuid on võimalus, et toimub mõne geeni deletsioon, amplifikatsioon, mutatsioon või lugemisraami nihe. Pärmis on peamiseks kaheaahelaliste DNA katkete parandamise viisiks homoloogiline rekombinatsioon, kuna pärmi genoom on väike ja esineb vähe korduva DNA järjestusi (Frigerio *et al.*, 2023).

Kaheaahelalise katke juures tuleb kromatiini struktuur muuta vähem pakituks, et DNA parandamine saaks toimuda. Seda saavutatakse terve nukleosoomi eemaldamisega või

histoonide post-translatsiooniliste muudatustega (Frigerio *et al.*, 2023). DSB parandamist pärmis koordineerivad Tel1 ja Mec1 valgud, mis tunnevad ära irregulaarseid valgu struktuure kromatiinis ning fosforüleerivad neid, märgistatud kohad arutatakse nukleosoomi pealt lahti ja parandatakse ära enne järgmist rakutsükli faasi (Waterman *et al.*, 2020). NHEJ puhul liituvad lahtiste DNA otstega Ku heterodimeerid (Ku70-Ku80), mis omakorda kutsuvad DNA ligaasi IV kompleksi, mis DNA lahtised otsad kokku paneb, HR korral MRX/MRN valgu kompleksid koos Sae2/CtIP kompleksiga lõikavad 5' otsasid, valmistades DNA-d ette homoloogiliseks rekombinatsiooniks (Casari *et al.*, 2019).

NuA4 ja SWR1 osalevad DNA parandamisel, pakkides lahti kromatiidi kaheaahelalise katke tekkimisel. H2A.X histooni C-terminaalses otsas seriini jäägid fosforüleeritakse, mille järel Arp4 füüsiliselt interakteerub lõikekohaga kutsudes NuA4, mis atsetüleerib H4 histoonid kaheaahelalise katke juures. Järgmisena tulevad SWR1-C ja INO80 kompleksid, mis eemaldavad fosforüleeritud H2A.X (Schulze *et al.*, 2010). Sellest interaktsioonist eeldatakse, et Yaf9 kaasab mõlemad NuA4 ja SWR1 kaheaahelalise katke juurde ja koordineerib nende tegevust ja asukohta (Schulze *et al.*, 2010).

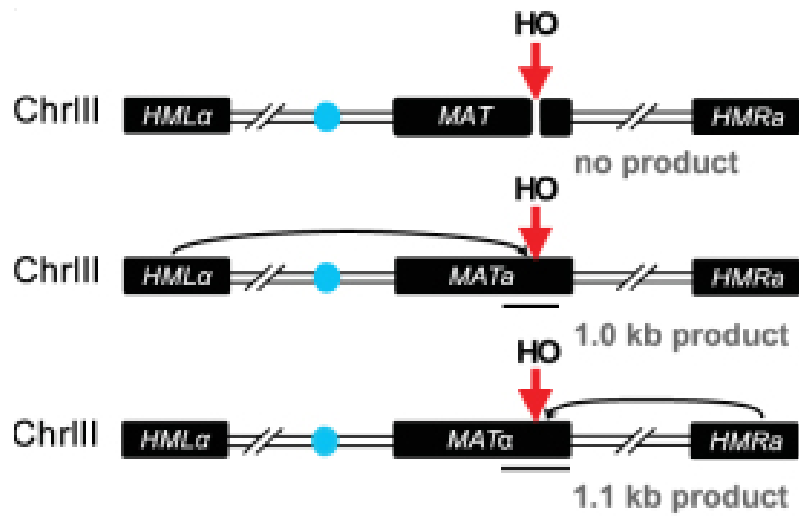
## 1.9 Paardumistüübi vahetus

Pagaripärmis on kaks haploidset paardumistüüpi MATa ja MAT $\alpha$ , mis kodeerivad vastavalt, kas a või  $\alpha$  feromooni. Nende ühinemisel tekib diploidne rakk, mis jaguneb meioosi teel, moodustades kaks a ja kaks  $\alpha$  haploidset rakku (Nasmyth & Tatchell, 1980). Pärmidel on võimalik oma paardumistüüpi vahetada, selleks on pärmidel homotallismi alleel (HO), mis kodeerib HO-endonukleaasi, mis tekitab katke MAT lookusesse ja seetõttu kontrollib paardumistüübi vahetust. Laboritingimustes kasutatakse ho tüve, kus HO alleel on välja lülitatud, et vältida paardumistüübi vahetusi ja diploidsete rakkude moodustumist (Strathern & Herskowitz, 1979). Mõlemast paardumistüübi alleelist eksisteerib koopia kolmandas kromosoomis: HMLa (*homothallic mating left*), mis asub kromosoomi vasaku õla telomeeris ja HMRA (*homothallic mating right*), mis asub kromosoomi parema õla telomeeris. Juhul kui kolmanda kromosoomi MAT lookusesse tekib katke, kasutab pärm HMLa või HMRA-s

asuvaid koopiaid ja homoloogilist rekombinatsiooni, mille tulemusena võib raku paardumistüüp vahetuda (Nasmyth & Tatchell, 1980).

Paardumistüübi vahetust indutseerib kaheaahelaline katke MAT lookuses, mida parandatakse geenikonversiooni mehhanismi kaudu, kus homoloogiline rekombinatsioon toimub suure homoloogia puhul, kuid mitte täiesti identsete doonori ja aktseptori vahel (Thon *et al.*, 2019). HO-endonukleaas teeb MAT lookusesse kaheaahelalise DNA katke. Selline lõige toimub rakutsükli G1 faasis ja selliseks paardumistüübi vahetuseks on vaja ka homoloogilise rekombinatsiooni proteiini Rad51 ja selle mediaatorit Rad52 (Thon *et al.*, 2019).

Selleks, et kontrollida HO-endonukleaasi aktiivsust on võimalik transformeerida rakkudesse plasmiid, kus HO-endonukleaas on galaktoosiga indutseeritava promotori kontrolli all (GAL promootor). Kui keskkonnas leidub galaktoosi, siis promootor aktiveerub ja hakkab tootma HO-endonukleaasi, kui galaktoosi pole või kui keskkonnas esineb glükoosi, mida pärm eelistab galaktoosile, siis muutub promootor inaktiivseks (Sein *et al.*, 2018). Selleks, et lõiget parandada, kasutab pärm homoloogilist rekombinatsiooni samas kromosoomis asuvate paardumistüübi doonorjärjestustega (HML $\alpha$  või HMRA), mille tulemuseks on kahe erineva paardumistüübiga pärmid, mida on võimalik detekteerida geelelektroforeesil (Joonis 6) (Sein *et al.*, 2018).



**Joonis 6. DNA-s kaheahelalise katke tekitamine HO-endonukleaasiga.** Joonisel on näha, kuidas GAL-HO restriktas teeb lõike kolmanda kromosoomi MAT lookusesse, mille järgselt lõige parandatakse doonorjärjestusega, mis pärineb kas HML $\alpha$  või HMRa alleelilt. See muudab pärmis paardumistüübi kas MATa-ks või MAT $\alpha$ -ks. MATa paardumistüübiga pärm annab antud töö mudelsüsteemis PCR (*polymerase chain reaction*) amplifitseerimisel 1,0 kb suuruse produkti ja MAT $\alpha$  annab 1,1 kb produkti (Sein *et al.*, 2018).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas Yaf9 valk on oluline DNA kaheaheelaliste katkete parandmises ja kas seejuures on vajalik funktsionaalse YEATS-domeeni olemasolu. Loodi järgnev katsete skeem:

1. Konstrueerida Yaf9 *knock-out* tüvi (Yaf9 $\Delta$ ) ja inaktiivse YEATS-domeeniga Yaf9W89A valku ekspresseeriv pärmitüvi ning võrrelda nende tüvede kasvu WT pärmitüvega DNA-s kaheaheelalisi katkeid tekitava MMS kemikaali juuresolekul.
2. Konstrueerida indutseeritava GAL-promootoriga HO-endonukleaasi ekspresseerivast tüvest Yaf9 $\Delta$  ja inaktiivse YEATS-domeeniga Yaf9W89A valku ekspresseeriv pärmitüvi.
3. Võrrelda HO-endonukleaasiga tekitatud DNA kaheaheelalise katke parandamist WT, mutantset Yaf9W89A valku ekspresseerivas ja Yaf9 $\Delta$  tüves.

### 2.2 Metoodika

#### 2.2.1 Kasutatud tüved, plasmiidid ja söötmed

Kõik töös kasutatud ja valmistatud pagaripärmi tüved baseeruvad W303 tüvel, AKY1863 erineb W303 seetõttu, et ADE2 geen on parandatud ja AKY2154 on HO-endonukleaas viidud galaktoosi promootori kontrolli alla. Lisaks on kõikide tüvede paardumistüüp MATa (Thomas & Rothstein, 1989). Transformatsioonide jaoks kasutati töögrupis eelnevalt valmistatud p-3x3F12-URA3 plasmiidilt (URA3 markergeeni) või pRS413Yaf9W89A plasmiidilt (Yaf9W89A ekspressioonikasseti) PCR meetodil spetsiaalsete praimeritega amplifitseeritud DNAd. Kasutatud praimerite paarid, seonduvad vektoril homoloogsete piirkondadega ning lisaks sisaldavad 5'-otsas 50 nukleotiidi pikkusi üleulatuvaid järjestusi, mis on homoloogilised Yaf9 geeniga külgnevatele aladele. Kõik töös kasutatud pagaripärmi tüved, söötmed ja praimerid on välja toodud vastavalt Lisas 1, Lisas 2 ja Lisas 3.

## 2.2.2 URA3 markergeeni ja Yaf9W89A ekspressioonikasseti PCR amplifitseerimine

Yaf9 geeni deleteerimiseks amplifitseeriti PCR meetodil p-3x3F12-URA3 plasmiidilt Yaf9KO\_5' ja Yaf9KO\_3' praimeritega URA3 resistentsusgeen. Yaf9W89A ekspressioonikasseti amplifitseerimiseks pRS413Yaf9W89A plasmiidilt kasutati Yaf9\_NotI\_F ja Yaf9\_SacI\_R primereid. Reaktsioonimaht oli 50 µl, mis sisaldas 0,5 ng p-3x3F12-URA3 või pRS413Yaf9W89A plasmidi, 0,5 µM Yaf9KO\_5' ja Yaf9KO\_3' või Yaf9\_CTRL ja Yaf9\_SacI\_R praimerit, 10 µl 5x *FIREPol Master Mix*'i ja lõpp-mahuni Milli-Q vett.

Markergeeni amplifitseerimiseks kasutatud PCR programm:

Eeldenaturatsioon:	95°C, 3 min	} 30 tsüklit
Denaturatsioon:	95°C, 30 s	
Praimerite seondumine:	54°C, 25 s	
Süntees:	72°C, 2 min	
Järelsüntees:	72°C, 5 min	

Saadud PCR produktidest kontrolliti 5 µl 0,8% agarosgeelil. Ülejäänud PCR produktile lisati 155 µl TE puhvrit (10 Mm Tris, 0,1 mM EDTA), 20 µl 3 M NaAc, 1 µl glükogeeni, 600 µl 96%-list piiritust ning hoiti 30 minutit -20°C juures. Proove tsentrifugeeriti 15 min 13200 rpm juures, supernatant eemaldati ja sadet pesti 500 µl 70%-lise etanooliga. Seejärel tsentrifugeeriti proove 10 min 13200 rpm juures, supernatant eemaldati ning sade lahustati 10 µl-is vees.

## 2.2.3 Liitiumatsetaadiga DNA eraldamine

Rakud võeti üles 100 µl LiOAc + SDS (Naatriumdodetsüülsulfaat) lahuses. Järgmisena hoiti rakke 15 min 70°C juures ning peale seda lisati 300 µl 96% etanooli. Rakke segati vortexil (*Scientific Industries Vortex-Genie 2*) ja tsentrifugeeriti 3 min 13000 rpm juures. Seejärel

eemaldati supernatant ja kuivatati rakusadet 40°C juures, sade võeti üles 100 µl TE puhvriss ning tsentrifuugiti 1 min 13000 rpm juures. Supernatant tõsteti teise katsutisse.

#### 2.2.4 Kolooniade kontrollimine

Selektiivtassidel üleskasvanud kolooniatest eraldati DNA LiOAc meetodil ja Yaf9 geeni deletsiooni või mutantse Yaf9W89A ekspressioonikasseti olemasolu kontrolliti PCR-ga. Selleks kasutati Yaf9\_CTRL ja FBA\_CTRL2 praimerid. PCR maht oli 10 µl, mis sisaldas 1 µl DNA-d, 2 µl *FIREPol Master Mix*, 0,25 µl Yaf9\_CTRL praimerit, 0,25 µl FBA\_CTRL praimerit ja 6,5 µl Milli-Q vett.

Kolooniade kontrollimisel kasutatud PCR programm:

Eeldenaturatsioon:	95°C, 3 min	} 30 tsükli
Denaturatsioon:	95°C, 30 s	
Praimerite seondumine:	54°C, 25 s	
Süntees:	72°C, 40 s	
Järelsüntees:	72°C, 5 min	

#### 2.2.5 Agaroosgeelelektroforees

Käesolevas töös läbiviidud PCR-i kontrolliks kasutati DNA analüüsimiseks agaroosgeelelektroforeesi. Agaroosgeeli valmistamisel kasutati 1x TAE puhvrit (40 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8). Agaroosi kontsentratsioonid olid vahemikus 0,8-2% ning DNA visualiseerimiseks UV kiirguse all lisati etiidiumbromiidi (EtBr) (0,5 µg/ml).

### 2.2.6 Transformatsioon

Üleöö YPD vedelsöötmes 30°C juures kasvatatud rakud tsentrifugeeriti 3 min 5000 rpm juures. Eemaldati sööde ja rakke pesti 500 µl-i LiOAc+TE puhvriga, seejärel rakke tsentrifugeeriti sama programmiga ja rakuks lahustati 40 µl-is LiOAc+TE-s. Sinna lisati juurde 7 µl *carrier* DNA-d, mida eelnevalt denatureeriti 95-100°C juures 6-7 min ning kiirelt jääl jahutati. Seejärel segati kokku rakud ja 10 µl PCR produkti. Peale 5 min toatemperatuuril inkubeerimist lisati 300 µl LiOAc+TE+PEG lahust, segati vortexil (*Scientific Industries Vortex-Genie 2*) ja inkubeeriti 15 min toatemperatuuril. Lisati 30 µl DMSO-d, segati vortexil ja rakkudele tehti kuumašokk 42°C juures 10 min, seejärel pandi rakud minutiks jääle. Pämirakke tsentrifugeeriti 3 min 3000 rpm-ga 4°C juures, eemaldati supernatant ja pesti milliQ veega. Rakulahus kanti petri tassile ning aeti laiali. Petri tase inkubeeriti 30°C juures.

### 2.2.7 Elektroporatsioon

Üleöö YPD vedelsöötmes 30°C juures kasvatatud rakud tsentrifugeeriti 5 min 1500 rpm juures. Sade eemaldati ja rakud suspendeeriti 8,5 ml-s TE-s ja 1 ml-s 1 M LiAc-s. Seejärel inkubeeriti rakke 30°C loksutil 80 rpm juures 45 minutit, pärast mida lisati 250 µl 1 M DDT-d (ditiotreitool) ja inkubeeriti rakke veel 15 min 30 °C juures. Järgnevalt lisati rakkudele 40 ml jääkülma vett ja tsentrifugeeriti 5 minutit 2000 rpm. Rakke pesti ja tsentrifugeeriti kaks korda 50 ml jääkülma veega ning suspendeeriti 1 ml-is jääkülmas 1 M sorbitoolis. Edasi tõsteti rakulahus 1.5 ml *Eppendorfi* tuubi ning tsentrifugeeriti 1 min 6000 rpm. Sorbitooliga pesu korrati 1 kord, supernatant eemaldati ja rakuks suspendeeriti 30 µl-is sorbitoolis. Elektroporeerimiseks pipeteeriti 30 µl rakke ja 10 µl sadestatud PCR produkti 2 mm küvetti. Poreerimine teostati elektroporaatoriga Bio-Rad Gene Pulser Xcell, kasutades pärmi elektroporatsiooniks eelseadistatud programmi. Poreeritud rakkudele lisati 1 ml sorbitooli ja tsentrifugeeriti 3000 rpm juures 3 minutit. Järgmisena eemaldati kolmveerand supernatandist, rakud suspendeeriti ja külvati edasi -URA selektiivsöötmele või tavalisele YPD tardsöötmele. Järgmisel päeval tehti templikülv YPD tassidelt 5-fluoro-orothapet (5-FOA) sisaldavale selektiivsöötmele ja tase inkubeeriti kaks päeva temperatuuril 30 °C.

### **2.2.8 Lahjenduste rea analüüs**

Erinevaid tüvesid võrreldi MMS-i sisaldavatel söötmetel (kontsentratsioonidel 0,01% ja 0,005%). Selleks mõõdeti rakukultuuri tihedust rakuloenduriga (ZTM COULTER COUNTER *Cell and Particle Counter, Beckman Coulter*) ja hiljem NanoDrop-iga (*NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific*). Saadud tulemustest arvutati lahjendused nii, et kõige väiksemas lahjenduses oleks 10 000 rakku/ $\mu$ l ja kõige suuremas lahjenduses oleks 1 rakk/ $\mu$ l. Valmistatud lahjendused pipeteeriti 5  $\mu$ l kaupa galaktoosi, MMS-i ja SC+AA (*synthetic complete medium + amino acids*) tardsöötme tassidele. Rakke kasvatati inkubaatoris 30°C juures 2-3 päeva.

### **2.2.9 DNA kaheaheelalise katke (DSB) parandamise analüüs**

Rakke kasvatati üleöö 10 ml rafinoosiga vedelsöötmes. Sellest koguti 1,5 ml rakukultuuri tsentrifuugides 3000 rpm 3 minutit, sööde eemaldati ja rakusadet pesti 5 ml milliQ veega. Seejärel eemaldati vesi ja rakusade säilitati -80 °C juures, et hiljem eraldada rakkudest genoomne DNA MAT lookuse PCR-i jaoks (0 ajapunkt). Ülejäänud rakud koguti samuti tsentrifuugides, rafinoosiga sööde eemaldati ning rakud suspendeeriti 8 ml-is galaktoosiga söötmes. Rakke kasvatati 30 °C juures 3 tundi, seejärel koguti 1,5 ml rakukultuurist nagu eelnevas ajapunktis ning rakusade säilitati -80 °C juures. Ülejäänud rakud viidi glükoosiga söötmesse ja kasvatati 30 °C juures. Peale 1,5 h ja 3 h möödumist koguti sarnaselt eelnevaga 1,5 ml rakukultuuri ning rakusade säilitati -80°C juures.

### **2.2.10 Genoomse DNA eraldamine pärmirakkudest ja MAT lookuse lõikuse kontroll PCR meetodil**

Rakke lüüsi 400  $\mu$ l-i FA-puhvri [1 mM EDTA, pH 8; 50 mM HEPES-KOH, pH 7,5; 140 mM NaCl; Triton X-100 (1%, v/v); Proteaasi inhibiitorid (1X); Naatriumdeoksükolaat (0.1%, w/v)] ja 400  $\mu$ l-i fenool:kloroformiga 6 min, seejärel lisati klaaskuulid ja segati vortexil 4 min. Eemaldati supernatant ja tsentrifuugiti 5 min maksimum pööretel. Fenooli pealt eraldati vesifaas, sellele lisati 200  $\mu$ l-t kloroformi ja tsentrifuugiti 5 min maksimum pööretel.

Kloroformi pealt eemaldati vesifaas ning lisati 20 µl-t 3 M NaAc, 1 µl glükogeeni ja 600 µl-t 96%-list piiritust. DNA lahustati tsentrifugeerimiseks maksimum pööratel 4°C juures ning pesti 750 µl-i 70%-lise piiritusega. Sade lahustati 50 µl-s TE-s.

Kõikidele proovidele tehti DNA amplifitseerimiseks PCR. PCR tehti HO*cut*-F ja HO*cut*-R, VPSq2.6 F ja VPSq3.5 R praimeridega. PCR reaktsioonimaht oli 10 µl, mis sisaldas 2 µl DNA-d, 0,25 µl praimereid, 2 µl *FIREPol Master Mix* ja 6,75 µl Milli-Q vett. PCR-i tulemusi analüüsiti 2% TAE agarosgeelil, kuhu lisati 10 µl (0,5 µg/ml) EtBr.

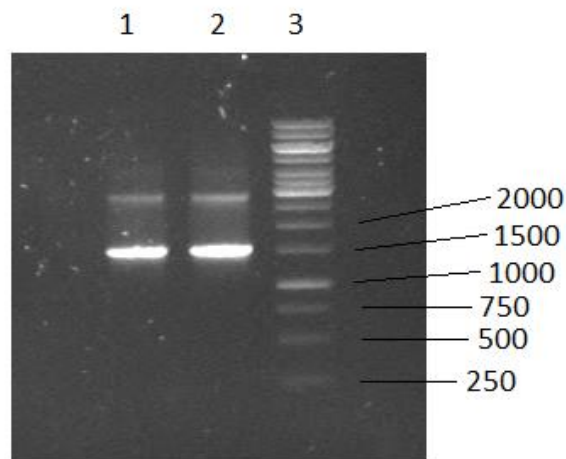
PCR programm:

Eeldenaturatsioon:	95°C, 3 min	} 23 tsüklit
Denaturatsioon:	95°C, 30 s	
Praimerite seondumine:	55°C, 30 s	
Süntees:	72°C, 1 min 30 s	
Järelsüntees:	72°C, 5 min	

## 2.3 TULEMUSED. ARUTELU

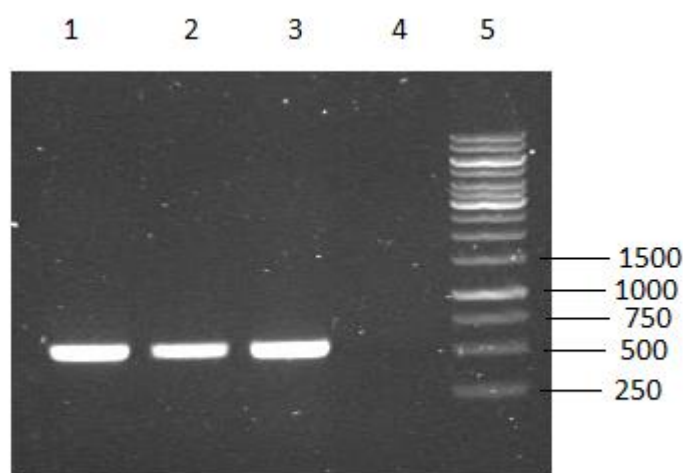
### 2.3.1 Yaf9 $\Delta$ ja Yaf9W89A tüve konstrueerimine

Töö esimeseks etapiks oli konstrueerida Yaf9 $\Delta$  ja Yaf9W89A tüved. Kõigepealt deleteeriti WT tüvest (AKY1863) Yaf9 geen, kasutades URA3 markergeeni. Selleks amplifitseeriti PCR-iga p-3x3F12-URA3 plasmiidilt URA3 markergeen praimeritega, mille otstes on homoloogilised järjestused genoomis paikneva Yaf9 geeni alguse ja lõpu piirkonnaga. PCR tehti kahes korduses, et saada transformatsiooniks vajalik kogus DNA-d. Saadud umbes 1500 bp pikkune PCR produkt (Joonis 7) transformeeriti AKY1863 pärmitüvesse. Homoloogilise rekombinatsiooni käigus vahetab pärm Yaf9 geeni URA3 markergeeni vastu kuna markergeeni otstes on homoloogilised järjestused genoomis paikneva Yaf9 geeni alguse ja lõpuga. Selleks, et kontrollida, kas transformatsioon oli edukas, pandi rakud -URA selektiivtassile, sest sellel suudavad rakud kasvada juhul, kui neil on olemas URA3 geen.



**Joonis 7. PCR meetodil amplifitseeritud URA3 markergeeni kontroll agarosgeelelektroforeesil.** Radadel 1 ja 2 on amplifitseeritud URA3 ekspressioonikassett, mille otstes on Yaf9 valku kodeeriva ala alguse ja lõpuga homoloogsed järjestused. Rajal 3 on 1 kb marker (*1 kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). DNA visualiseeriti EtBr-ga UV valguses.

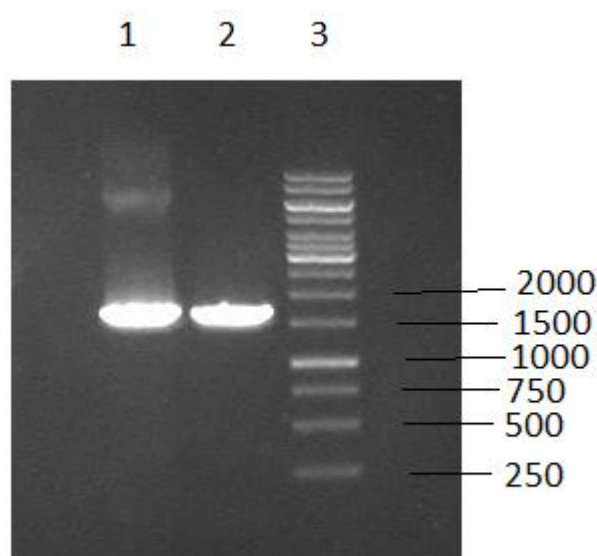
Selleks, et kontrollida, kas URA3 markergeen on integreerunud just Yaf9 geeni asemele, eraldati neljast -URA tassil kasvanud kolooniast DNA ja PCR-iga amplifitseeriti DNA-d selliste praimeritega, millest üks seondub pärmigenoomis Yaf9 geeni ees oleva piirkonnaga ning teine praimer plasmiidilt paljundatud URA3 markergeeni järel oleva piirkonnaga. Selliste praimerite puhul on oodatav PCR-i ampliconi suurus umbes 500 bp suurune. Selgus, et esimeses kolmes koloonias (Joonis 8, rajad 1, 2, 3) oli transformatsioon olnud edukas ning URA3 markergeen oli integreerunud genoomis Yaf9 geeni asemele. Neljandas koloonias (Joonis 8, 4. rada) ei detekteeritud PCR produkti, mis tähendab, et ilmselt on URA3 markergeen integreerunud genoomi mujale ning tegemist ei ole Yaf9A tüvega. Joonisel on näha, et PCR produkt asub 500 bp markeri juures, mis tõestab, et tegemist on URA3 markeriga. Edasi hakati kasutama esimese koloonia rakke (AKY2377).



**Joonis 8. Yaf9A kolooniade kontroll agarosgeelelektroforeesil.** Radadel 1, 2, 3, 4 on AKY1863 transformatsioonil saadud neljast kolooniast eraldatud DNA-lt amplifitseeritud PCR produkt, 5. rajal on 1 kb marker (*1 kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). DNA visualiseeriti EtBr-ga UV valguses.

Järgnevalt transformeeriti saadud Yaf9A tüvesse (AKY2377) pRSYaf9W89A geeni ekspressioonikassett, et saada mutantset Yaf9W89A valku ekspresseeriv pärmitüvi. Selleks amplifitseeriti PCR-iga plasmiidilt pRS413Yaf9W89A Yaf9W89A geen ja saadi 1709 bp pikkune PCR produkt (Joonis 9). PCR tehti kahes korduses, et saada transformatsiooniks vajalik kogus DNA-d. Transformeeritud rakud külvati kõigepealt YPD agarile, et pärm saaks

homoloogilise rekombinatsiooniga DNA genoomi integreerida. Järgmisel päeval tembeldati kasvanud kolooniad edasi 5-FOA tassile. 5-FOA-d sisaldaval söötmel suudavad kasvada rakud, kus URA3 markergeen on asendatud Yaf9W89A geeniga, sest URA3 poolt kodeeritud ODCaas (orotiin-5-monofosfaadi dekarboksülaas) reageerib 5-FOA-ga moodustades fluorodeoksüuridiini, mis on pärmile toksiline (Boeke *et al.*, 1984).



**Joonis 9. PCR meetodil amplifitseeritud Yaf9W89A geeni kontroll agarosegelelektroforeesil.** Radadel 1 ja 2 on amplifitseeritud Yaf9W89A ekspressioonikassett ja 3. rajal on 1 kb marker (*1 kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). DNA visualiseeriti EtBr-ga UV valguses.

5-FOA peal kasvanud kolooniatest eraldati DNA, mida amplifitseeriti PCR-ga kasutades primereid, mis amplifitseerivad URA3 geeni. Juhul kui URA3 markergeeni asemel on integreerunud Yaf9W89A, siis PCR produkti ei teki. Saadud produkte analüüsiti gelelektroforeesil (Joonis 10, rajad 4-6). PCR tehti positiivse kontrolliga, mis asus 2. rajal (AKY2377 ehk Yaf9 $\Delta$ ) ja negatiivse kontrolliga, mis asus 3. rajal (AKY1863 ehk Yaf9 WT). Joonisel on näha, et positiivne kontroll annab signaali 500 bp juures ja negatiivne kontroll ega ükski proov ei anna signaali. PCR tulemus ja 5-FOA peal kasvamine kinnitavad, et elektroporeerimine oli edukas ja URA3 marker on asendatud Yaf9W89A geeniga. Edasi hakati kasutama esimese koloonia rakke (Joonis 10, rada 4) (AKY2394).

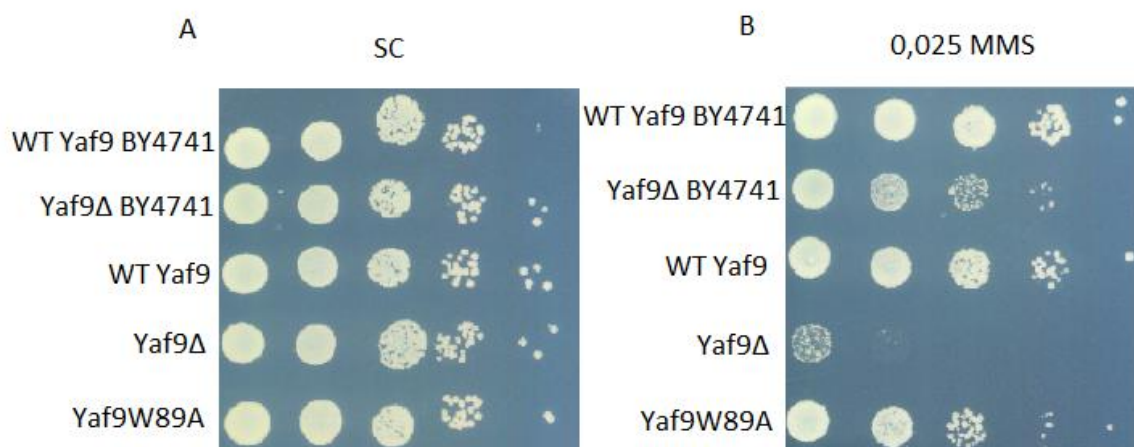


**Joonis 10. Yaf9W89A kolooniate kontroll agarosgeelelektroforeesil.** 2. rajal on positiivne kontroll (AKY2377). 3. rajal on negatiivne kontroll (AKY1863). Radadel 4-6 on AKY2394 kolooniatest eraldatud DNA ja radadel 7-9 on AKY2395 tüve kolooniatest eraldatud DNA. 1. ja 10. rajal on 1 kb marker (*1 kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). DNA visualiseeriti EtBr-ga UV valguses.

### 2.3.2 Lahjenduste rea analüüs testimaks Yaf9 olulisust MMS-i talumisel

Lahjenduste rea analüüs võimaldab hinnata erinevate tüvede kasvuvõimekust kindlates kasvutingimustes. Esimesena kontrolliti, kuidas transformatsiooniga saavutatud tüved kasvavad söötmel, kuhu oli lisatud DNA kahjustusi tekitavat MMS kemikaali. Eelnevalt on leitud, et Yaf9Δ tüved ei suuda MMS-i poolt põhjustatud DNA vigastusi parandada ja seetõttu kasvada, eriti W303 pärmitüved. Selleks pandi tüved lahjendusreana kasvama SC kontrolltassile ja MMS-iga tardsöötme tassile (Joonis 11). Kontrolliks lisati ka BY4741 baasil valmistatud Y00000 (WT Yaf9) ja 7240 (Yaf9Δ) tüved, mille MMS-i taluvus on suurem. Joonisel 11A on näha, kuidas kontrolltassil on kõigil tüvedel võrdne kasvuvõimekus, mis näitab seda, et isegi selline pärmitüvi, kus Yaf9 geen on deleteeritud, suudab rikkal söötmel kasvada samaväärselt WT tüvega. Joonisel 11B on näha lahjendusrida tardsöötmel, kuhu oli lisatud 0,025% MMS-i. Sellelt selgub, et Yaf9 *knock-out* tüvi on väga tundlik MMS-i poolt tekitatud DNA kahjustustele, samas kui Yaf9W89A mutandi kasv on pigem sarnasem Yaf9 WT tüvega. Joonisel 11B on näha, et W303 baasil valmistatud tüved on väiksema MMS-i tolerantsiga kui BY4741 taustaga tüved. Lahjenduste rea analüüsist saab järeldada, et Yaf9 on MMS-i talumiseks ehk DNA kahjustustele vastamiseks väga oluline. Lisaks saab järeldada, et selliste kahjustuste puhul pole oluline ainult YEATS domeeni võimekus interakteeruda atsetüleeritud histoon H3-ga. Yaf9 *knock-out* tüve suurem tundlikkus võrreldes Yaf9W89A

mutantse tüvega võib seejuures olla tingitud kahest erinevast põhjusest. Esiteks võib DNA kahjustustele vastamises olla oluline just Yaf9 C-terminaalne domeen, mille kaudu Yaf9 valk seondub nii NuA4 kui ka SWR1 kompleksiga. Teiseks ei saa välistada, et lisaks W89 aminohappele, mis on vajalik Yaf9 YEATS domeeni seondumiseks atsetüleeritud H3 histooniga, võib YEATS domeenis olla ka mõni teine motiiv, mis võimaldab seonduda mõne teise kromatiini modifikatsiooniga ning Yaf9 *knock-out* tüve suur tundlikkus MMS-ile on ikkagi põhjustatud funktsionaalse YEATS domeeni puudumisest.



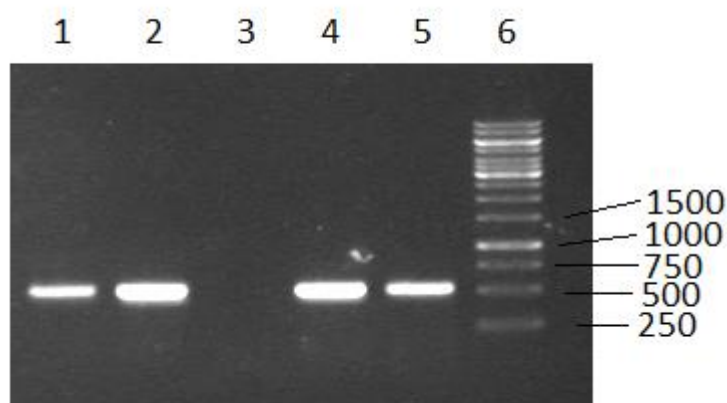
**Joonis 11. Lahjenduste rea analüüs testimaks Yaf9 olulisust MMS-i talumisel.** Joonisel A on SC kontrolltass ja joonisel B on 0,0025% MMS-i sisaldusega tass. Võrdlevalt on külvatud WT Yaf9 BY4741 (tüvi Y00000), Yaf9Δ BY4741 (tüvi 7240) ja W303 taustaga WT Yaf9 (tüvi AKY1863), Yaf9Δ (tüvi AKY2377) ja Yaf9W89A (tüvi AKY2394).

### 2.3.3 HO-endonukleaasi ekspresseerivate Yaf9W89A ja Yaf9Δ tüve konstrueerimine

Galaktoosi poolt aktiveeritud HO-endonukleaasiga tüvede tegemiseks võeti AKY2154 tüvi, kus HO-endonukleaasi aktiivsus on galaktoosi promootori kontrolli all. Selles tüves asendati Yaf9 geen p-3x3F12-URA3 plasmiidilt amplifitseeritud URA3 markeriga homoloogilise rekombinatsiooni käigus (Joonis 7).

Yaf9Δ kolooniate kontrollil selgus, et kolooniates 1, 2, 4 ja 5 (Joonis 12, rajad 1, 2, 4, 5) oli transformatsioon olnud edukas ehk URA3 markergeen on asendanud Yaf9 geeni. Joonisel on

näha produkti 500 bp markeri juures, mis kinnitab, et tegemist on Yaf9 $\Delta$  tüvega. Edasi hakati kasutama esimese koloonia rakke (AKY2384).



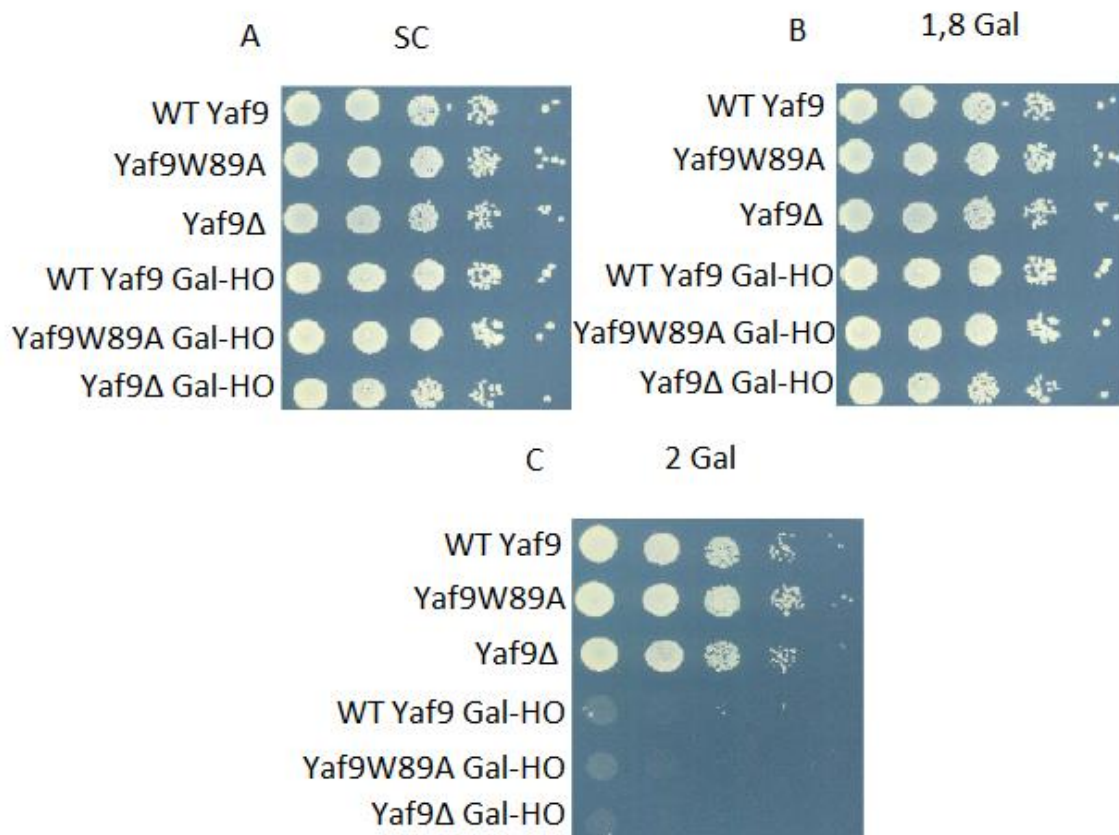
**Joonis 12. GAL-HO tüves Yaf9 $\Delta$  kolooniate kontroll agarosgeelelektroforeesil.** Radadel 1-5 on kolooniatest eraldatud DNA ja rajal 6 on 1 kb marker (*1 kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). DNA visualiseeriti EtBr-ga UV valguses.

Järgmisena paljundati PCR meetodil pRS413Yaf9W89A plasmiidilt DNA, mis sisaldas Yaf9W89A kodeerivat järjestust (Joonis 9). Saadud DNA elektroporeeriti AKY2384 (Yaf9 $\Delta$ ) rakkudesse ja pandi YPD söötmele kasvama selleks et, pärm saaks sisestatud DNA homoloogilise rekombinatsiooniga integreerida genoomi URA3 markeri asemele. Elektroporatsiooni edukuse kontrolliks tembeldati YPD peal kasvatatud kolooniad ümber 5-FOA tassile.

Selleks, et olla kindel kas 5-FOA peal kasvavad kolooniad olid edukalt URA3 markeri asendanud Yaf9W89A geeniga, eraldati kolooniatest DNA, amplifitseeriti PCR-iga ja tulemusi analüüsiti 0,8% agarosgeelelektroforeesil (Joonis 10, rajad 7-9). PCR kontrolliks kasutati primereid, mis amplifitseerivad URA3 markergeeni. Kasutati positiivset kontrolli, mis andis signaali ja negatiivset kontrolli, mis ei andnud signaali. Radadel 7-9 olid GAL-HO Yaf9W89A tüve kolooniad, mis ei andnud signaali. Sellest saab järeldada, et URA3 markergeen on edukalt asendatud Yaf9W89A geeniga. Edasi hakati kasutama viienda koloonia rakke (Joonis 10, rada 7) (AKY2395).

### 2.3.4 Lahjenduste rea analüüs testimaks GAL-HO endonukleaasi efektiivsust

Selleks, et võrrelda omavahel, kuidas mõjutab MAT lookusesse kaheaahelalise katke tegemine WT Yaf9 (AKY2152), Yaf9W89A (AKY2395) või Yaf9Δ (AKY2384) pärmitüvede kasvu, kasutati lahjenduste rea analüüsi. Lisaks nendele tüvedele võrreldi kontrolliks ka selliseid WT Yaf9 (AKY1863), Yaf9W89A (AKY2394) ja Yaf9Δ (AKY2377) tüve, kus puudub GAL-HO endonukleaas ning galaktoosiga söötmel kaheaahelalist katket MAT lookusesse ei tehta. Selline võrdlus oli vajalik selleks, et näha, kas erinevate tüvede kasvamist mõjutab söötmesse lisatud suhkruna galaktoosi kasutamine või on võimalikud erinevused tingitud just kaheaahelalise katke tegemisest. Lisaks SC (2% glükoosiga sööde) ja 2% galaktoosiga tardsöötme tassidele kasutati ka sellist söötmetassi, kuhu oli suhkruna lisatud 1,8% galaktoosi ja 0,2% glükoosi (Joonis 13). Nagu näha jooniselt ei erine glükoosiga SC tardsöötmega tassil WT Yaf9 (tüved AKY1853 ja AKY2154), Yaf9W89A (tüved AKY2394 ja AKY2395) või Yaf9Δ (tüved AKY2377 ja AKY2384) kasv märkimisväärselt. Samuti suudavad 2% galaktoosiga tardsöötmel kasvada sarnaselt kõik sellised tüved, kus puudub GAL-HO endonukleaas. Seega saab antud süsteemi kasutada tehtud tüvede omavaheliseks võrdluseks just DNA katkele reageerimises, sest on välistatud võimalus, et Yaf9 on hoopis oluline tagamaks pärmi kasvu galaktoosiga söötmel. HO-endonukleaasi ekspresseerivate tüvedel, oli kõigil kolmel raskusi DNA kaheaahelalise katke parandamisega juhul, kui pärm kasvab söötmetassil, kuhu ainukese suhkruna on lisatud galaktoos. Sellisel juhul toimub pidevalt HO-endonukleaasi ekspressioon ning isegi WT tüvi ei suuda kasvada. Juhul kui lisaks galaktoosile on söötmesse lisatud ka 0,2% glükoosi, suudavad nii WT Yaf9 (AKY2154) kui ka mutantne Yaf9W89A (AKY2395) tüvi kasvada sama efektiivselt. Yaf9Δ tüve (AKY2394) kasv oli häiritud, kuid vahe WT tüvega ei olnud nii suur kui MMS kemikaali sisaldaval söötmel.

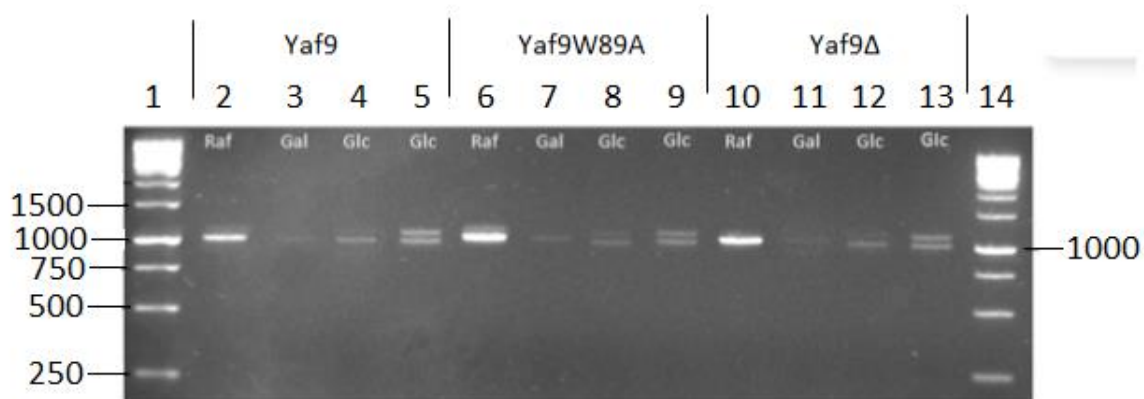


**Joonis 13. Lahjenduste rea analüüs testimaks GAL-HO restriктаasi efektiivsust.** Joonisel A on näha glükoosi sisaldavat kontrolltassi (SC), HO-endonukleaasi ei ekspresseerita. Joonisel B on söötmesse lisatud 1,8% galaktoosi ja 0,2% glükoosi (1,8 Gal), HO-endonukleaasi ekspresseeritakse teatud määral. Joonisel C on söötmesse lisatud 2% galaktoosi (2 Gal), HO-endonukleaasi ekspresseeritakse pidevalt. Võrreldud on WT Yaf9 (AKY1863), Yaf9W89A (AKY2394) ja Yaf9 $\Delta$  (AKY2377) tüvesid ja WT Yaf9 GAL-HO (AKY2154), Yaf9W89A GAL-HO (AKY2395) ja Yaf9 $\Delta$  GAL-HO (AKY2384) tüvesid.

### 2.3.5 Galaktoosiga indutseeritava HO-endonukleasiga tehtud DNA kaheahelalise katke analüüs

HO-endonukleasiga katke tegemiseks kasvatati pärmes kõigepealt 2% rafinoosiga vedelsöötmes. Selles söötmes on GAL promootor inaktiivne ning HO-endonukleasi ei ekspresseerita. Üleöö rafinoosis kasvatatud rakud jagati kaheks osaks, esimesest osast eraldati DNA kasutades fenool:kloroformi ja ülejäänud rakud kanti edasi vedelsöötmesse, mis sisaldas galaktoosi. Selles söötmes hakkas GAL promootor tööle ja ekspresseerunud HO-endonukleas tekitas DNA-s kaheahelalise katke kolmanda kromosoomi MAT lookuses. Peale kolme tundi

korral DNA eraldamine ja ülejäänud rakud kanti edasi glükoosiga söötmesse. Glükoos on pärmidele kõige eelistatuim süsinikuallikas, lisaks represserib glükoos GAL promootori ja seetõttu ka HO-endonukleaasi ekspressiooni. Rakkude sattumisel glükoosiga söötmesse hakkab toimuma DNA parandamine, mille käigus vahetub ka pärmi paardumistüüp. Paardumistüübi vahetumist on võimalik detekteerida kasutades PCR-meetodit, kuna MATa ja MAT $\alpha$  paardumistüübi PCR produkt erineb 100 bp võrra (vastavalt 1000 bp ja 1100 bp). Glükoosiga söötmes kasvanud rakkudest võeti proov 1,5 h ajapunktis ja 3 h ajapunktis (Joonis 14).

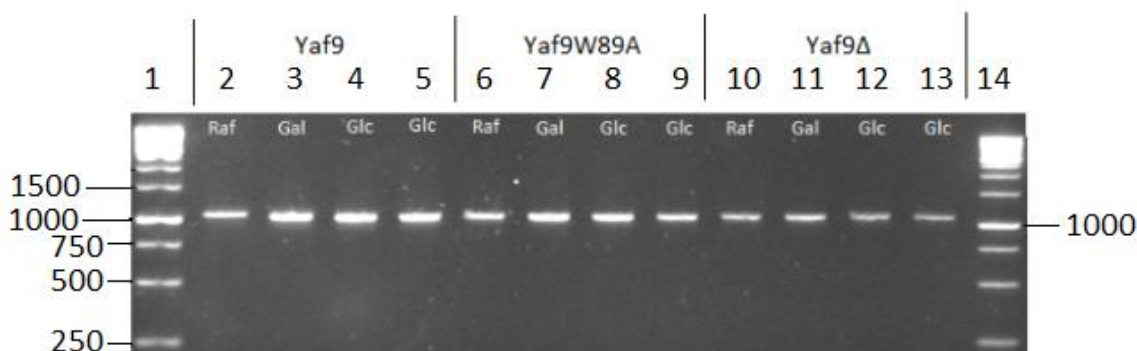


**Joonis 14. MAT lookuse PCR-i tulemused HOcut\_CTRLF ja HOcut\_CTRLR praimeritega.** Radadel 1 ja 14 on marker (*1 kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). Radadel 2-5 on WT Yaf9 GAL-HO (AKY2154), radadel 6-9 Yaf9W89A GAL-HO (AKY2395) ja radadel 10-13 Yaf9 $\Delta$  GAL-HO (AKY2384) tüvede erinevates suhkrutes kasvatatud rakkudest eraldatud genoomselt DNA-lt amplifitseeritud MAT lookus. DNA visualiseeriti EtBr-ga UV valguses.

Pärmitüved, millel puudub kaheaahelise katke parandamise mehhanism, ei suuda HO-endonukleaasiga tekitatud katket parandada ja seetõttu ei suuda kasvada. Reparatsioonidefektsetes tüvedes on MAT lookuse parandamine aeglasem (Sein *et al.*, 2018). Rafinoosi ajapunktis (Joonis 14, rajad 2, 6 ja 10) on näha ühte produkti 1000 bp markeri juures, kinnitades, et tegu on MATa paardumistüübiga. Galaktoosi ajapunktis (Joonis 14, rajad 3, 7 ja 11) on näha produkti signaali märkimisväärset vähenemist kuna toimub lõige MAT lookuses. Glükoosi ajapunktis (Joonis 14, 1,5 h ajapunkt rajad 4, 8 ja 12, 3 h ajapunkt rajad 5, 9 ja 13) on näha kuidas MAT lookuse parandamise käigus on tekkinud erinevate paardumistüüpidega

pärmid, andes signaali 1000 bp ja 1100 bp juures. Kuigi nii WT Yaf9 (AKY2377) kui ka Yaf9W89A (AKY2395) tüved suutsid galaktoosiga keskkonnas kasvada pisut paremini kui Yaf9 *knock-out* tüvi (AKY2384) (Joonis 13B), siis PCR meetodil katke parandamise efektiivsusel vahet ei nähtud (Joonis 14).

Selleks, et kontrollida, kas igas proovis oli sama hulk genomset DNA-d tehti PCR VPSq2.6 F ja VPSq3.5 R praimeritega, mille tulemusi analüüsiti 2%-lisel agarosgeelil (Joonis 15). VPS praimerid valiti kuna HO-endonukleaasi lõikus ei mõjuta VPS13 geeni ja seetõttu peaks igast proovist saama samaväärse koguse produkti. Joonisel on näha, et kõikide tüvede erinevates söötmetes kasvatatud rakkudest eraldatud DNA-lt saadi sarnane kogus produkti, mis kinnitab, et HOcut\_CTRLF ja HOcut\_CTRLR praimeritega tehtud PCR-il nähtud produkti koguse muutused olid tingitud endonukleaasi poolt tehtud MAT lookuse katkest.



**Joonis 15. PCR-i tulemused VPS praimeritega.** Radadel 1 ja 14 on marker (*1 kb Thermo Scientific GeneRuler DNA ladder*). Radadel 2-5 on WT Yaf9 GAL-HO (AKY2154), radadel 6-9 Yaf9W89A GAL-HO (AKY2395) ja radadel 10-13 Yaf9Δ GAL-HO (AKY2384) tüvede erinevates suhkrutes kasvatatud rakkudest eraldatud genoomselt DNA-lt amplifitseeritud VPS13 geenifragment. DNA visualiseeriti EtBr-ga UV valguses.

Tehtud ühest katsest on keeruline järeldada, kas Yaf9Δ GAL-HO (AKY2384) tüves on MAT lookuses oleva katke parandamine aeglasem, kui WT tüve (AKY2154) puhul. Antud katset tuleks kindlasti korrata vähemalt kolm korda ning proovida saadud signaale kvantiteerida.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas töös konstrueeriti Yaf9 $\Delta$  ja mutantset Yaf9W89A valku ekspresseerivad pärmitüved, mida kasvatati MMS-iga keskkonnas, et näha, kas Yaf9 valk või just selle funktsionaalne YEATS domeen on oluline DNA kahjustustele reageerimises. Võrreldes selliste tüvede kasvamist MMS-i sisaldaval SC tardsöötme tassil, leiti, et Yaf9 $\Delta$  (AKY2377) kasvas aeglasemalt ja ei suutnud seega DNA kahjustusele nii efektiivselt reageerida kui WT Yaf9 (AKY1863) tüvi. Yaf9W89A (AKY2394) tüve kasv oli veidi aeglasem, kuid pigem sarnane WT tüvega (Joonis 11B).

Kuna MMS ei põhjusta ainult kaheaheelalisi katkeid, vaid tekitab erinevaid DNA kahjustusi, konstrueeriti ka sellised Yaf9 $\Delta$  ja Yaf9W89A valku ekspresseerivad pärmitüved, kus galaktoosiga indutseeritava promootori alt oli võimalik ekspresseerida HO-endonukleaas, mis tekitab ühe kaheaheelalise katke MAT lookusesse. Sellises tüves on võimalik hinnata Yaf9 valgu rolli just ühe, kindlasse kohta tehtud kaheaheelalise DNA katke parandamises. Leiti, et Yaf9W89A (AKY2395) tüvi suudab HO-endonukleaasi põhjustatud DNA katket parandada sarnaselt Yaf9 WT (AKY2154) tüvele, kuigi MMS-iga keskkonnas, kus erinevaid DNA kahjustusi on palju, oli sellise tüve kasvamine võrreldes WT tüvega aeglasem. Yaf9 $\Delta$  tüvi (AKY2384) kasvas HO-endonukleaasi poolt tekitatud katke puhul küll WT tüvest aeglasemalt, kuid võrreldes MMS-i sisaldaval söötmel nähtud kasvu erinevusega, oli vahe väga väike.

Antud töö tulemuseks on, et Yaf9 valk on vajalik, et reageerida efektiivselt DNA kahjustustele. Samas mõjutab YEATS domeeni inaktiveerimine, kui valgu 89-ndal positsioonil olev trüptofaan on muteeritudalaniiniks, DNA kahjustustele reageerimise efektiivsust võrreldes Yaf9 valgu täieliku puudumisega oluliselt vähem.

**Requirement of Yaf9 protein in DNA double-strand break repair in baker's yeast  
(*Saccharomyces cerevisiae*)**

Ronald Varik

**SUMMARY**

Yaf9 is one of three YEATS domain proteins in baker's yeast. It is also a subunit of NuA4 a histone acetyltransferase complex and SWR1 a chromatin-remodeling complex. Both of these protein complexes play a crucial role in DNA double-strand break repair. In Yaf9W89A, a mutated version of Yaf9, the replacement of tryptophan by alanine in the 89th position disables the YEATS domain of the protein.

Firstly, two yeast strains were constructed, one was unable to produce Yaf9 (Yaf9 $\Delta$ ) and the other produced the mutated Yaf9W89A protein. To see the importance of Yaf9 and its YEATS domain in DNA repair, wild-type Yaf9, Yaf9 $\Delta$  and Yaf9W89A were placed in a medium containing MMS, a chemical, which creates double-strand breaks in DNA, but it also creates other types of DNA damage. Wild-type Yaf9 was able to repair the damage effectively, Yaf9W89A was also successful in repairing DNA, albeit a bit slower, but Yaf9 $\Delta$  had problems repairing the double-strand breaks.

Secondly, another two yeast strains were constructed, in order to see the repair of a single double-strand break. This was accomplished by using the yeast's own HO-endonuclease to create a single break in the MAT locus, which is responsible for switching the mating type of the yeast. HO-endonuclease production was put under the control of a promoter that was activated by galactose in the environment. The yeasts then used homologous recombination in order to repair the break, this results in yeasts with different mating types and therefore give different sized MAT loci when genomic DNA is extracted and analyzed with PCR. The difference in growth on the MMS plate between Yaf9 and Yaf9W89A strain was not detected when just a single DNA double-strand break was induced. The Yaf9 $\Delta$  strain had a modest growth defect when a single DNA double-strand break was induced.

The results suggest that Yaf9 is important in effective response to DNA damage and DNA double-strand break repair. The results of the Yaf9W89A mutant suggest that the YEATS domain helps with the effectiveness of the repairs but is not necessary.

## **TÄNUSÕNAD**

Sooviksin tänada oma juhendajat Kadri Peili, kes õpetas mulle häid laboritavasid ja aitas töö valmimisele kaasa nii laboris kui ka töö kirjutamisel ja vormistamisel, andes häid nõuandeid terve selle pika tee vältel. Sooviksin tänada ka Signe Värvi, kelle hoolsa pilgu all mõned katsed valmisid, kes mu tööd parandas ning kelle õppesõnad pikaks ajaks meelde jäävad, lisaks tänaksin ka Arnold Kristjuhanit heade näpunäidete eest ja ka teisi Rakubioloogia õpetooli inimesi.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Boeke, J. D., LaCroute, F., & Fink, G. R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Molecular & general genetics : MGG*, 197(2), 345–346. <https://doi.org/10.1007/BF00330984>
- Casari, E., Rinaldi, C., Marsella, A., Gnugnoli, M., Colombo, C. V., Bonetti, D., & Longhese, M. P. (2019). Processing of DNA Double-Strand Breaks by the MRX Complex in a Chromatin Context. *Frontiers in molecular biosciences*, 6, 43. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00043>
- Claire E. Barnes, David M. English, Shaun M. Cowley; Acetylation & Co: an expanding repertoire of histone acylations regulates chromatin and transcription. *Essays Biochem* 23 April 2019; 63 (1): 97–107. doi: <https://doi.org/10.1042/EBC20180061>
- Clapier, C. R., & Cairns, B. R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry*, 78, 273–304. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223>
- Deichmann U. (2015). Chromatin: Its history, current research, and the seminal researchers and their philosophy. *Perspectives in Biology and Medicine* 58(2), 143-164. <https://doi.org/10.1353/pbm.2015.0024>
- Duina, A. A., Miller, M. E., & Keeney, J. B. (2014). Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 197(1), 33–48. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163188>
- Emerson, C. H., & Bertuch, A. A. (2016). Consider the workhorse: Nonhomologous end-joining in budding yeast. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 94(5), 396–406. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0001>
- Frigerio, C., Di Nisio, E., Galli, M., Colombo, C. V., Negri, R., & Clerici, M. (2023). The Chromatin Landscape around DNA Double-Strand Breaks in Yeast and Its Influence on DNA Repair Pathway Choice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3248. <https://doi.org/10.3390/ijms24043248>
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F.,

Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5287), 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>

Harshman, S. W., Young, N. L., Parthun, M. R., & Freitas, M. A. (2013). H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic acids research*, 41(21), 9593–9609. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt700>

Kim A. Nasmyth, Kelly Tatchell, The structure of transposable yeast mating type loci, *Cell*, Volume 19, Issue 3, 1980, Pages 753-764, ISSN 0092-8674, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(80\)80051-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(80)80051-1)

Klein, B. J., Ahmad, S., Vann, K. R., Andrews, F. H., Mayo, Z. A., Bourriquen, G., Bridgers, J. B., Zhang, J., Strahl, B. D., Côté, J., ja Kutateladze, T. G. (2018). Yaf9 subunit of the NuA4 and SWR1 complexes targets histone H3K27ac through its YEATS domain. *Nucleic Acids Research*, 46(1), 421–430. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1151>

Kornberg R. D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 184(4139), 868–871. <https://doi.org/10.1126/science.184.4139.868>

Kornberg, R. D., & Lorch, Y. (1999). *Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome*. *Cell*, 98(3), 285–294. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81958-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81958-3)

Kouzarides, T. (2007). *Chromatin Modifications and Their Function*. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

Le Masson, I., Yu, D. Y., Jensen, K., Chevalier, A., Courbeyrette, R., Boulard, Y., Smith, M. M., & Mann, C. (2003). Yaf9, a novel NuA4 histone acetyltransferase subunit, is required for the cellular response to spindle stress in yeast. *Molecular and cellular biology*, 23(17), 6086–6102. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.17.6086-6102.2003>

Luger, K., Mäder, A., Richmond, R. *et al.* Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260 (1997). <https://doi.org/10.1038/38444>

Luger, K., & Richmond, T. J. (1998). The histone tails of the nucleosome. *Current opinion in*

*genetics & development*, 8(2), 140–146. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(98\)80134-2](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(98)80134-2)

Morgan, D. O. 2007. Basic Chromatin Structure , p. 76. *The Cell Cycle: Principles of Control*. New Science Press Ltd, London, UK.

Nielsen, J. (2019), *Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory*. *Biotechnol. J.*, 14: 1800421. <https://doi.org/10.1002/biot.201800421>

Patterson, H. G., Landel, C. C., Landsman, D., Peterson, C. L., & Simpson, R. T. (1998). The biochemical and phenotypic characterization of Hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 273(13), 7268–7276. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7268>

Rusche, L.N., Kirchmaier, A.L., and Rine, J. (2003). The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* 72, 481-516. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161547>

Schulze, J. M., Wang, A. Y., & Kobor, M. S. (2009). YEATS domain proteins: a diverse family with many links to chromatin modification and transcription. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 87(1), 65–75. <https://doi.org/10.1139/O08-111>

Schulze, J. M., Wang, A. Y., & Kobor, M. S. (2010). Reading chromatin: insights from yeast into YEATS domain structure and function. *Epigenetics*, 5(7), 573–577. <https://doi.org/10.4161/epi.5.7.12856>

Sein, H., Reinmets, K., Peil, K., Kristjuhan, K., Väriv, S., & Kristjuhan, A. (2018). Rpb9-deficient cells are defective in DNA damage response and require histone H3 acetylation for survival. *Scientific reports*, 8(1), 2949. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21110-9>

Sherman, F. (2002). Getting Started with Yeast. *Methods in Enzymology*, 350, 3–41. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50954-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50954-X)

Smolle, M., & Workman, J. (2012). Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochimica et biophysica acta*, 1829. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.08.008>

Strathern, J. N., & Herskowitz, I. (1979). Asymmetry and directionality in production of new

cell types during clonal growth: the switching pattern of homothallic yeast. *Cell*, 17(2), 371–381. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90163-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90163-6)

Thomas, B. J., & Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, 56(4), 619–630. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90584-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90584-9)

Zeng, L., & Zhou, M. M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS letters*, 513(1), 124–128. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)03309-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)03309-9)

Zhang, Y., Zhang, Y., Sun, Z., Jia, J., Du, T., Zhang, N., Tang, Y., Fang, Y., & Fang, D. (2021). Overview of Histone Modification. In: Fang, D., Han, J. (eds) *Histone Mutations and Cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1283. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5_1)

Zhang, H., Richardson, D. O., Roberts, D. N., Utley, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Côté, J., & Cairns, B. R. (2004). The Yaf9 component of the SWR1 and NuA4 complexes is required for proper gene expression, histone H4 acetylation, and Htz1 replacement near telomeres. *Molecular and cellular biology*, 24(21), 9424–9436. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9424-9436.2004>

Tamaru H. (2010). Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line. *Genes & development*, 24(14), 1465–1478. <https://doi.org/10.1101%2Fgad.1941010>

Thon, G., Maki, T., Haber, J. E., & Iwasaki, H. (2019). Mating-type switching by homology-directed recombinational repair: a matter of choice. *Current genetics*, 65(2), 351–362. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0900-2>

Wang, X., Ahmad, S., Zhang, Z. et al. Architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* NuA4/TIP60 complex. *Nat Commun* 9, 1147 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03504-5>

Wang, A. Y., Schulze, J. M., Skordalakes, E., Gin, J. W., Berger, J. M., Rine, J., & Kobor, M. S. (2009). Asf1-like structure of the conserved Yaf9 YEATS domain and role in H2A.Z deposition and acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21573–21578. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906539106>

Waterman, D. P., Haber, J. E., & Smolka, M. B. (2020). Checkpoint Responses to DNA Double-Strand Breaks. *Annual review of biochemistry*, 89, 103–133. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-104722>

Willhoft, O., Ghoneim, M., Lin, C. L., Chua, E. Y. D., Wilkinson, M., Chaban, Y., Ayala, R., McCormack, E. A., Ocloo, L., Rueda, D. S., & Wigley, D. B. (2018). Structure and dynamics of the yeast SWR1-nucleosome complex. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6411), eaat7716. <https://doi.org/10.1126/science.aat7716>

## **KASUTATUD VEEBIAADRESSID**

Snapgene. <https://www.snapgene.com/>. Kasutatud 05.05.2023

Euroscarf. <http://www.euroscarf.de/search.php?search=Y00000&updateSearch=>. Kasutatud 16.05.2023

Euroscarf. <http://www.euroscarf.de/search.php?search=7240&project=>. Kasutatud 16.05.2023

## LISAD

### Lisa 1

Järgmises tabelis (Tabel 1) on kõik töös kasutatud ja koostatud tüved, nende genotüüp ja valmistaja.

**Tabel 1.** Kasutatud tüved, nende genotüüp ja nende valmistaja.

<b>Tüvi</b>	<b>Genotüüp</b>	<b>Valmistaja</b>
AKY1863	W303, MAT A, ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-101 lys2D can1-100, pBlueScript-ADE2	Kadri Peil
AKY2154	W303, MAT A, ura3 leu2 his3 trp1 ade2 lys2, GAL-HO	Kadri Peil
AKY2377	W303, MAT A, leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-101 lys2D can1-100, pBlueScript-ADE2, Yaf9 $\Delta$	Valminud töö käigus
AKY2384	W303, MAT A, ura3 leu2 his3 trp1 ade2 lys2, GAL-HO, Yaf9 $\Delta$	Valminud töö käigus
AKY2394	W303, MAT A, leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-101 lys2D can1-100, pBlueScript-ADE2, Yaf9-W89A	Valminud töö käigus
AKY2395	W303, MAT A, ura3 leu2 his3 trp1 ade2 lys2, GAL-HO, Yaf9-W89A	Valminud töö käigus
Y00000	BY4741, MAT A, his3D1, leu2D0, met15D0, ura3D0	Euroscarf

Y07240	BY4741, MAT A, his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0, YNL107w::kanMX4, Yaf9 $\Delta$	Euroscarf
--------	--	-----------

## Lisa 2

Järgnevas tabelis (Tabel 2) on kõik töös kasutatud söötmed ja nende koostised.

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

Sööde	Koostis
YPD	Agar 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l, glükoos 20 g/l.
SC ( <i>Synthetic complete medium</i> )	Agar 20 g/l, YNB ( <i>yeast nitrogen base</i> ) 6,7 g/l, glükoos 20 g/l, adeniin 20 µg/ml, uratsiil 20 µg/ml, trüptofaan 40 µg/ml, histidiin 40 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, lüsiin 80 µg/ml.
-HIS	Agar 20 g/l, YNB 6,7 g/l, glükoos 20 g/l, uratsiil 0,2 g/l, trüptofaan 0,08 g/l, lüsiin 0,08 g/l, leutsiin 0,08 g/l, adeniin 0,2 g/l.
0,01% MMS	MMS 0,02 g/l, agar 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l, glükoos 20 g/l.
0,005% MMS	MMS 0,01 g/l, agar 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l, glükoos 20 g/l.
-URA	Agar 20 g/l, glükoos 20 g/l, YNB 20 g/l, trüptofaan 0,08 g/l, lüsiin 0,08 g/l, leutsiin 0,08 g/l, adeniin 0,2 g/l, histidiin 0,16 g/l.
5-FOA ( <i>5-fluoroorotic acid</i> )	Agar 20 g/l, YNB 6,7 g/l, glükoos 20 g/l, uratsiil 0,2 g/l, trüptofaan 0,08 g/l, lüsiin 0,08 g/l, leutsiin 0,08 g/l, adeniin 0,2 g/l, 5-FOA 1 mg/ml.
1,8% Gal	Agar 20 g/l, YNB 6,7 g/l, galaktoos 18 g/l, glükoos 2 g/l, uratsiil 0,08 g/l, histidiin, leutsiin 0,08 g/l, trüptofaan 0,04 g/l, adeniin 0,02 g/l, lüsiin 0,04 g/l.
2% Gal	Agar 20 g/l, YNB 6,7 g/l, galaktoos 20 g/l, uratsiil 0,08 g/l, histidiin, leutsiin 0,08 g/l, trüptofaan 0,04 g/l, adeniin 0,02 g/l, lüsiin 0,04 g/l.

### Lisa 3

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

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

<b>Praimer</b>	<b>Järjestus</b>
Yaf9KO_5'	5' ACCTATTTACGGCATCACAAAGAAAGCGAGATGGCTCC GACAATAAGCAA GATAGCTCATTTTGGAGTTTCG 3'
Yaf9KO_3'	5' CTAACTTCCGTTAATGGCTTCTTGTTTTACCAAGTTTTCC AGTTTCTGCT CAGGAAACAGCTATGACCATG 3'
FBA_CTRL2	5' CGAACTCCAAAATGAGCTATC 3'
Yaf9_CTRL	5' CAGCGGTAAAATGGGGAGGAG 3'
Yaf9_SacI_R	5' TCAGTGAGCTCGTCCTCCTATTAGAAGGAAGAGCAG 3'
Yaf9_NotI_F	5' CATCTGCGGCCGCGCCTCCACTGTGGGTTTACTAG 3'
HO <sub>cut</sub> -F	5'CTCTGGTAACTTAGGTAAATTACAGC3'
HO <sub>cut</sub> -R	5'GAATGATGCTAAGAATTGATTGTTTGC3'
VPSq2.6 F	5'ACGTTAATTACTCTTCTGGTTCCG3'
VPSq3.5 R	5'AGGTGCCTTGATTACTATGTCCATT3'

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

Mina, Ronald Varik,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

### **Yaf9 valgu vajalikkus DNA kaheahelaliste katkete parandamisel**

#### **pagaripärmis (*Saccharomyces cerevisiae*),**

mille juhendajad on PhD Kadri Peil ja Prof. Arnold Kristjuhan,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Ronald Varik

29.05.2023